

Información Importante

La Universidad Santo Tomás, informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan **finalidad académica**, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el Artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, la Universidad Santo Tomás informa que “los derechos morales sobre documento son propiedad de los autores, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.”

Bibliotecas Bucaramanga
Universidad Santo Tomás

**UTILIZACIÓN DE ZUMOS DE FRUTAS CON ALTO CONTENIDO DE VITAMINA C
PARA LA REMEDIACIÓN DE AGUAS CONTAMINADAS CON CROMO**

YULY STHEFANY MENDOZA LANDAZABAL

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
DIVISION DE INGENIERIAS Y ARQUITECTURA
FACULTAD DE QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2015**

**UTILIZACIÓN DE ZUMOS DE FRUTAS CON ALTO CONTENIDO DE VITAMINA C
PARA LA REMEDIACIÓN DE AGUAS CONTAMINADAS CON CROMO**

YULY STHEFANY MENDOZA LANDAZABAL

Trabajo de grado para optar el título de Química Ambiental

**Director del proyecto
Julio Roberto Pinzón Joya
Químico, PhD**

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
DIVISION DE INGENIERIAS Y ARQUITECTURA
FACULTAD DE QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2015**

DEDICATORIA

Dedico esta tesis principalmente a Dios y a esos seres especiales que fueron muy importantes a lo largo del desarrollo de mi proyecto, gracias doy a ustedes porque pude terminar mi proyecto de grado y logré salir adelante a pesar de mi enfermedad y los tropiezos que tuve en el pasado...

También quiero dedicar mi proyecto de grado a mis papás, mis hermanos, mi novio, mis tías, tíos y demás familiares quienes fueron mi apoyo incondicional y con la ayuda especialmente de mis padres pude terminar este anhelado título.

Sthefany Mendoza

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a Dios porque siempre ha estado ahí para ayudarme, me ha dado la capacidad de terminar mi carrera como un paso más para continuar con mi proceso de aprendizaje; me fortaleció para superar todas las dificultades y tropiezos que tuve a lo largo de mi trayectoria en la universidad, también me regaló deseos, fuerza, sueños e ilusión durante este tiempo, te alabo Padre por amarme tanto.

También doy gracias a mis padres, quienes me brindaron la oportunidad de estudiar, de terminar mi carrera profesional y poder salir adelante. A mis hermanos y toda mi familia, en especial mis tías: Mercedes, Pola, Zara, Betsy y María quienes me han apoyado en todo momento y han sido ese apoyo incondicional para culminar esta etapa como debe ser. Tía Mechass gracias a tí y tu familia pude también terminar esta gran meta tan importante en mi vida. También le agradezco de manera profunda a mis tíos Fernando, Lionardo y demás, quienes me colaboraron económicamente con parte del viaje a USA que realicé el pasado mes de marzo en Denver - Colorado, en representación de la Universidad Santo Tomás y en el cual se expuso este proyecto en la conferencia internacional de la ACS.

Por otra parte, quiero resaltar la maravillosa labor del Colegio Reina de la Paz, todo su personal administrativo, servicios generales y la Comunidad Hijas de Jesús, mis profes de bachillerato, con quienes entablé y tengo fuertes lazos de amistad... Les doy infinitas gracias por haberme ayudado a crecer como persona, y ser *“juventud sencilla, solidaria y generadora de paz”*.

Agradezco a la Universidad Santo Tomás, todos los profesores y personal administrativo que me ayudaron de una u otra forma con sus aportes y conocimientos, la facilidad de espacios como laboratorios, algunos reactivos, material de laboratorio y demás para terminar mi proyecto de grado. En especial a mi director, el profesor, Julio Roberto Pinzón Joya quien me tuvo paciencia, para ayudarme a lo largo de mi trabajo de grado, quien me brindó sus conocimientos, su apoyo y gran parte de tiempo para ayudarme a crecer como buena estudiante y persona; también a Laura Viviana Herrera Sandoval, coordinadora del laboratorio de Ciencias Básicas e Investigación, quien con su paciencia, su tiempo, su cariño y con su gran esfuerzo me ayudó a que esto fuera posible. Le agradezco a mis compañeras Yolanda Serrano, Johanna Carrero y los demás que me acompañaron a lo largo de mi carrera profesional, con quien pude tener buenos lazos de amistad y se han convertido en parte de mi familia. Los llevo en mi corazón. Agradezco también a mi novio Ricardo Suárez quien también fue muy importante en la parte final de mi proyecto con su apoyo, paciencia y amor me ha impulsado a terminar este proyecto... En fin, muchas gracias a todos y los llevo en lo más profundo de mi corazón!

CONTENIDO

Pág.

INTRODUCCIÓN	17
1 UTILIZACIÓN DE ZUMOS DE FRUTAS CON ALTO CONTENIDO DE VITAMINA C PARA LA REMEDIACIÓN DE AGUAS CONTAMINADAS CON CROMO	18
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
1.2 JUSTIFICACIÓN	20
1.3 OBJETIVOS	21
1.3.1 OBJETIVO GENERAL	21
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
2 MARCO REFERENCIAL	22
2.1 MARCO TEÓRICO	22
2.1.1 Antioxidantes presentes en las frutas	22
2.1.2 Importancia del ácido ascórbico o Vitamina C	22
2.1.3 Análisis de Vitamina C en jugos de frutas	23
2.1.4 Método de adición estándar	24
2.1.5 Reacción de la Vitamina C con metales pesados en altos estados de oxidación	24
2.2 ANTECEDENTES	25
2.2.1 Contenido de vitamina C en frutas exóticas	25
2.2.2 Contaminación en aguas por metales pesados	26
2.2.3 Contaminación en aguas por cromo	26
3 DISEÑO METODOLÓGICO	28
3.1 Método de HPLC para la determinación de Vitamina C	28
3.2 Análisis de las 32 frutas por HPLC utilizando el método de adición estándar	28
3.2.1 Selección del material de fruta	29
3.2.2 Procedimiento del corte de la fruta y obtención del zumo	29
3.3 Estudio de la reacción de la vitamina C con cromo	30
3.3.1 Cromo hexavalente	30
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1 Equipos	33
4.2 Reactivos y Materiales	33
4.3 Instrumentación y condiciones	33
4.4 Normalización del método de HPLC	34
4.4.1 Optimización de flujo	34

4.4.2	Optimización de composición de fase móvil	35
4.4.3	Parámetros estadísticos del método	37
4.5	Determinación de la concentración de Vitamina C en cada una de las frutas estudiadas	44
4.6	Tratamiento de aguas contaminadas con cromo utilizando dos zumos de frutas con alto contenido de Vitamina C	46
4.6.1	Titulación de cromo Cr(VI) utilizando un estándar primario de Vitamina C	47
4.6.2	Titulación de Cr(VI) utilizando una solución del zumo de noni (<i>Moringa citrifolia</i>)	49
4.6.3	Titulación de Cr(VI) utilizando una solución del zumo de marañón (<i>Anarcadium occidentale</i>)	53
4.6.4	Tabla comparativa de la vitamina C, utilizando el estándar primario de vitamina C, una solución de zumo de noni y una de marañón	57
4.6.5	Utilización de la Norma para Cr(VI) en aguas contaminadas según el Decreto 3930 de 2010	57
5	CONCLUSIONES	59
6	DIVULGACIÓN DE RESULTADOS	60
	BIBLIOGRAFÍA	61
	ANEXOS	64

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Condiciones cromatográficas para el análisis de vitamina C.	28
Tabla 2. Datos obtenidos de cada uno de los 6 patrones preparados para la determinación del % RSD	40
Tabla 3. Datos obtenidos de cada uno de los 6 patrones preparados para la determinación la repetitibilidad del método	43
Tabla 4. Contenido de HA encontrado en cada una de las 32 frutas exóticas analizadas.	45
Tabla 5. Resultados obtenidos de la titulación de Vitamina C en 10 muestras de Cr(VI)	48
Tabla 6. Resultados obtenidos de la titulación de zumo de noni (<i>Moringa citrifolia</i>) en 10 muestras de Cr(VI)	52
Tabla 7. Resultados obtenidos de la titulación de zumo de marañón (<i>Anarcadium occidentale</i>) en 10 muestras de Cr(VI)	55
Tabla 8. Resultados obtenidos de los agentes reductores utilizados para la reducción química de 200 µg de Cr(VI)	57
Tabla 9. Aguas residuales industriales que contienen Cr(VI) ⁵⁶	58

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Listado e información de interés de cada una de las 32 frutas exóticas analizadas.	31
Cuadro 2. Condiciones del método colorimétrico para la determinación de Cr(VI)	46

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Reacción del ácido ascórbico y formación del ácido dehidroascórbico	23
Figura 2. Reacción entre el Cr(VI) y la vitamina C	30
Figura 3. Gráfica de Van Deemter utilizando las columnas C18 de 25 y 15 cm	34
Figura 4. Composición de fase móvil a diferentes intervalos de concentración utilizando metanol, agua desionizada y ácido o- fosfórico	37
Figura 5. Curva de calibración obtenida de las diferentes concentraciones de estándar primario para la determinación de los límites de detección y cuantificación	39
Figura 6. Área de precisión medido como RSD (% para seis muestras en cada nivel de concentración).	41
Figura 7. Curva de calibración obtenida de estándar primario	42
Figura 8. Cromatogramas de cada uno de los estándar primario utilizados a diferentes concentraciones de Vitamina C	43
Figura 9. Curva de calibración del Cr(VI)	47
Figura 10. Gráfica de reducción de Cr(VI) a Cr(III) utilizando una solución de Vitamina C + Difenilcarbazida	49
Figura 11. Curva de calibración del noni	51
Figura 12. Gráfica de reducción de Cr(VI) utilizando una solución de zumo de noni (1:4) y una solución de difenilcarbazida	52
Figura 13. Curva de calibración del marañon	54
Figura 14. Gráfica de reducción de Cr(VI) utilizando una solución del zumo de marañon (1:4) y una solución de difenilcarbazida	56

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Cromatogramas de la fruta anón	64
Anexo 2. Curva de calibración de la fruta anón	64
Anexo 3. Cromatogramas de la fruta arazá	65
Anexo 4. Curva de calibración de la fruta arazá	65
Anexo 5. Cromatogramas de la fruta borojó	66
Anexo 6. Curva de calibración de la fruta borojó	66
Anexo 7. Cromatogramas de la fruta carambolo	67
Anexo 8. Curva de calibración de la fruta carambolo	67
Anexo 9. Cromatogramas de la fruta cidra	68
Anexo 10. Curva de calibración de la fruta cidra	68
Anexo 11. Cromatogramas de la fruta cóngolo	69
Anexo 12. Curva de calibración de la fruta cóngolo	69
Anexo 13. Cromatogramas de la fruta curuba	70
Anexo 14. Curva de calibración de la fruta curuba	70
Anexo 15. Cromatogramas de la fruta granadilla	71
Anexo 16. Curva de calibración de la fruta granadilla	71
Anexo 17. Cromatogramas de la fruta guama	72
Anexo 18. Curva de calibración de la fruta guama	72
Anexo 19. Cromatogramas de la fruta guanábana	73
Anexo 20. Curva de calibración de la fruta guanábana	73
Anexo 21. Cromatogramas de la fruta guayaba	74
Anexo 22. Curva de calibración de la fruta guayaba	74
Anexo 23. Cromatogramas de la fruta icaco	75
Anexo 24. Curva de calibración de la fruta icaco	75
Anexo 25. Cromatogramas de la fruta limón	76
Anexo 26. Curva de calibración de la fruta limón	76
Anexo 27. Cromatogramas de la fruta lulo	77
Anexo 28. Curva de calibración de la fruta lulo	77
Anexo 29. Cromatogramas de la fruta mamón	78
Anexo 30. Curva de calibración de la fruta mamón	78
Anexo 31. Cromatogramas de la fruta mandarina	79
Anexo 32. Curva de calibración de la fruta mandarina	79
Anexo 33. Cromatogramas de la fruta mangostino	80
Anexo 34. Curva de calibración de la fruta mangostino	80
Anexo 35. Cromatogramas de la fruta maracuyá	81
Anexo 36. Curva de calibración de la fruta maracuyá	81
Anexo 37. Cromatogramas de la fruta marañón	82
Anexo 38. Curva de calibración de la fruta marañón	82
Anexo 39. Cromatogramas de la fruta melón	83

Anexo 40. Curva de calibración de la fruta melón	83
Anexo 41. Cromatogramas de la fruta mora	84
Anexo 42. Curva de calibración de la fruta mora	84
Anexo 43. Cromatogramas de la fruta naranja	85
Anexo 44. Curva de calibración de la fruta naranja	85
Anexo 45. Cromatogramas de la fruta noni	86
Anexo 46. Curva de calibración de la fruta noni	86
Anexo 47. Cromatogramas de la fruta pitaya	87
Anexo 48. Curva de calibración de la fruta pitaya	87
Anexo 49. Cromatogramas de la fruta pomarrosa	88
Anexo 50. Curva de calibración de la fruta pomarrosa	88
Anexo 51. Cromatogramas de la fruta sandia	89
Anexo 52. Curva de calibración de la fruta sandia	89
Anexo 53. Cromatogramas de la fruta tamarindo	90
Anexo 54. Curva de calibración de la fruta tamarindo	90
Anexo 55. Cromatogramas de la fruta tomate de árbol	91
Anexo 56. Curva de calibración de la fruta tomate de árbol	91
Anexo 57. Cromatogramas de la fruta uchuva	92
Anexo 58. Curva de calibración de la fruta uchuva	92

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AA	Aminoácido
Cr(III)	Cromo trivalente
Cr(VI)	Cromo Hexavalente
DHA	Ácido dehidroascórbico
DFC	1,5-Difenilcarbazida
HA	Ácido ascórbico
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
pH	Potencial de Hidrógeno
RSD	Porcentaje de desviación relativa
UV-VIS	Ultravioleta visible

GLOSARIO

ANTIOXIDANTE: hace referencia a cualquier sustancia que cuando se encuentra expuesta en concentraciones bajas en comparación a las de un sustrato, retrasa o impide la oxidación de dicho sustrato.¹

BIOREMEDIACIÓN: hace alusión a cualquier método que utiliza microorganismos para reciclar materiales orgánicos y separar iones inorgánicos. Los microorganismos deben estar presentes en la cantidad y diversidad adecuada.²

CONTAMINACIÓN: hace alusión a la introducción intencional, provocada o accidental de algún material en un lugar que es perjudicial para la integridad de cualquier ser o cosa que puede extraerse de cualquier investigación hecha de la misma.³

CROMATOGRAFÍA: según la Unión Internacional de Química Pura y aplicada (IUPAC) el término cromatografía es un método físico de separación donde los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una que permanece inmóvil (fase estacionaria) mientras que la otra (fase móvil) se mueve en una dirección determinada a través de la primera.⁴

FLAVONOIDES: son compuestos que se encuentran en los jugos celulares y en los pétalos de las flores de algunas plantas en forma de glucósidos de diversos azúcares (como la glucosa, galactosa, ramnosa o una pentosa), los aglucones presentes en ellos son derivados del núcleo fundamental de la fenilbenzopirona. Normalmente son encontrados en la corteza de los árboles y se utilizan como colorantes naturales; también son usados en aplicaciones terapéuticas por su carácter vitamínico.⁵

METALES PESADOS: es un término utilizado para los metales que poseen una densidad mayor o igual a 6 g/cm^3 , o cuando tienen un número atómico mayor a 20.⁶ Desde el punto de vista de los seres vivos entre los metales pesados existen nutrientes esenciales (tales como Fe, Mn, Zn, Cu, Mo), otros denominados elementos beneficiosos en ciertas circunstancias (como Ni, Cr, V, Ti, etc.) y algunos elementos que hoy en día no se considera tengan alguna función en los seres vivos (como Cd, Pb, Hg, etc.) y por lo general son considerados tóxicos.⁷

OXIDACIÓN: hace referencia al proceso por el cual el oxígeno u otros *no metales* activos (como por ejemplo el Cl_2 o Br_2) son combinados con otros elementos o compuestos y posteriormente oxidados. Se dice que las sustancias que son combinadas con el oxígeno son oxidadas pero con el paso del tiempo, mediante estudios se obtuvo que no solamente el oxígeno sino también el cloro u otros *no metales* activos son capaces de realizar este mismo proceso.⁸

REDUCCIÓN: es un término utilizado para explicar el proceso contrario de la oxi-

dación, es decir cuando el hidrógeno se combina con oxígeno para permitir la formación de agua. En esta reacción el hidrógeno se oxida pero al mismo tiempo el oxígeno se reduce. La oxidación y reducción son reacciones simultáneas y en proporciones exactamente equivalentes.⁸

VERTIMIENTOS: hace referencia a cualquier descarga líquida hecha a un cuerpo de agua. Según el uso ambiental este término es utilizado para designar la corriente de desperdicios, ya sean de forma líquida, sólida o gaseosa y es introducida en el medio ambiente.⁹

VITAMINAS: según los fines nutritivos una vitamina es definida como un compuesto orgánico distinto de grasas, carbohidratos y proteínas que es esencial en cantidades necesarias para la función fisiológica normal (lo que equivale al crecimiento, desarrollo, mantenimiento y/o producción) del organismo. Las vitaminas son un componente natural de los alimentos en las que suelen estar presente en mínimas o grandes cantidades; su ausencia o subutilización genera un síndrome de deficiencia específico en el organismo al no ser sintetizada en cantidades adecuadas para satisfacer las necesidades fisiológicas normales.^{10,11}

UTILIZACIÓN DE ZUMOS DE FRUTAS CON ALTO CONTENIDO DE VITAMINA C PARA LA REMEDIACIÓN DE AGUAS CONTAMINADAS CON CROMO

Y. S. Mendoza, J. R. Pinzón.

RESUMEN

El cromo es un elemento utilizado en la industria metalúrgica para producir aleaciones con acabado brillante, en la fabricación de vidrio coloreado, en la industria química para la fabricación de oxidantes y catalizadores y en el procesamiento de cuero. Estas últimas aplicaciones generan residuos acuosos con contenidos apreciables de Cr^{6+} que en muchos casos son vertidos de manera irresponsable contaminando las fuentes hídricas.¹² En este trabajo se utilizaron zumos de "marañón" (*Anarcadium occidentale*) y de "noni" (*Moringa citrifolia*) para reducir químicamente al Cr^{6+} presente en las aguas contaminadas para convertirlo en Cr^{3+} una especie menos dañina para el medio ambiente^{12,13}. En la primera etapa se normalizó un método cromatográfico para la determinación de vitamina C en los jugos de 32 frutas disponibles en el mercado colombiano utilizando un estándar primario de ácido L-ascórbico; posteriormente fue analizado por cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC. Los jugos de frutas con alto contenido de Vitamina C y no apreciados por sus propiedades organolépticas fueron seleccionados para el estudio de la reacción entre los zumos de fruta y los iones Cr^{6+} en solución acuosa, mediante un análisis por espectrofotometría ultravioleta visible. Luego, se realizó un estudio del comportamiento de estas soluciones acuosas con cromo utilizando el zumo de las dos frutas con mayor contenido de vitamina C. Tanto el zumo de marañón (*Anarcadium occidentale*) y el de noni (*Moringa citrifolia*) contienen (0,920–1,219) mg/mL respectivamente, fueron capaces de reducir químicamente Cr^{6+} a Cr^{3+} como se evidencia por análisis UV-Vis.

PALABRAS CLAVE: Ácido ascórbico, frutas, cromo, industria química.

UTILIZATION OF FRUIT JUICE WITH HIGH VITAMIN C CONTENT FOR THE REMEDIATION OF WASTEWATER CONTAMINATED WITH CHROMIUM

Y. S. Mendoza, J. R. Pinzón.

ABSTRACT

Chromium is an element used by the metallurgical industry to produce alloys with a glossy finish, to manufacture colored glass in the chemical industry, to produce oxidants and catalysts and to process leather. These latter applications generate aqueous waste with appreciable contents of Cr^{6+} which in many cases are disposed irresponsibly, therefore, polluting the water sources.¹² In this paper, juices of cashew “marañón” *Anacardium occidentale* and “noni” *Moringa citrifolia* were used to chemically reduce the Cr^{6+} present in polluted waters to Cr^{3+} , which is less harmful to the environment.^{12,13} In the first step, an HPLC method was used to measure the content of vitamin C in the juices of 32 fruits available in the Colombian market. The fruit juices with high content of vitamin C and not known for their organoleptic properties were selected to study the reaction between juices and Cr^{6+} in aqueous solution. Both the cashew (*Anacardium occidentale*) and “noni” (*Moringa citrifolia*) juices containing (0.920 – 1.219) mg/mL respectively were able to chemically reduce Cr^{6+} to Cr^{3+} as evidenced by UV-vis analysis.

KEYWORDS: Ascorbic acid, fruits, chromium, chemical industry.

INTRODUCCIÓN

El cromo es un metal utilizado en la industria para diferentes procesos y la fabricación de diversos productos químicos por sus propiedades fisicoquímicas.¹⁴ En el medio ambiente, el cromo es encontrado principalmente en los estados de oxidación Cr(III) y Cr(VI), siendo el Cr(VI) más tóxico y mutagénico en comparación con el Cr(III) que es inmóvil en el ambiente. En la actualidad, existen diversos métodos utilizados para la eliminación de Cr(VI), una problemática que afecta los cuerpos de agua en general; se han utilizado microorganismos, nanopartículas y otro tipo de materiales que absorben el cromo y lo eliminan de las fuentes de agua mediante procesos físicos o químicos, pero son procesos que por su elevado costo y baja eficacia no son frecuentemente utilizados por las industrias.

El presente proyecto se planteó el propósito de atender la creciente contaminación generada por la utilización de metales pesados en especial el cromo hexavalente Cr(VI) y su posterior vertimiento a los ríos y fuentes de agua. Específicamente, la vitamina C es una opción amigable con el medio ambiente, que permite la reducción química de los metales pesados en este caso utilizando cromo y contribuye a la disminución de la contaminación en los cuerpos de agua.

Teniendo en cuenta lo anterior, se propone utilizar el ácido ascórbico o vitamina C contenida en las frutas como una alternativa viable para la reducción química del Cr(VI) a Cr(III).¹⁵ Para lograr lo anterior, se utilizaron dos zumos de frutas, las de mayor contenido de Vitamina C que no afectan la cadena alimenticia de la población humana y que por sus propiedades organolépticas en la mayoría de casos es más elevada la producción de la fruta que su consumo y así poder utilizarlas en la descontaminación de aguas. Esto es importante porque se podría crear un mercado alternativo que permita darle un uso opcional, ya que en la mayoría de los casos son desechadas sin brindarle un uso razonable. Se debe tener en cuenta que el residuo generado entre la reacción de la Vitamina C y el cromo es completamente biodegradable y no afectan los suelos ni los cuerpos de agua en general.

1. UTILIZACIÓN DE ZUMOS DE FRUTAS CON ALTO CONTENIDO DE VITAMINA C PARA LA REMEDIACIÓN DE AGUAS CONTAMINADAS CON CROMO

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El aumento de la contaminación del medio ambiente ha generado preocupación por parte de las Agencias de Protección Ambiental de algunos países. Razón por la cual, la investigación y el análisis de dicha contaminación ha incitado el estudio de los metales pesados; entre ellos, se destaca el cromo por su alta toxicidad.^{16,17} El cromo tiene mayor prioridad por lo que se determina su concentración a nivel de trazas en suelos y aguas para la agricultura y en los cuerpos de agua en general.¹⁸ Los cuerpos de agua son contaminados por la utilización de sustancias químicas con alto contenido de metales pesados; en la gran mayoría de los casos, los residuos generados por dichas sustancias son desechados en forma de vertimientos a los ríos y cuerpos de agua más cercanos.¹⁹ Frente a esto, se hace necesario buscar métodos que disminuyan la presencia de metales pesados en aguas contaminadas.¹³

Teniendo en cuenta la contaminación generada por metales pesados, la disponibilidad de reactivos químicos y equipos de laboratorio para el análisis de estos metales, el estudio de este proyecto estuvo relacionado principalmente con el Cr(VI). Los compuestos de Cr(VI) son considerados toxinas que desencadenan efectos carcinógenos. La inhalación de partículas de Cr(VI) son encontradas en el polvo, la niebla, el humo; por tanto la frecuente exposición pueden generar enfermedades respiratorias como: cáncer de pulmón, asma, fibrosis pulmonar, bronquitis crónica entre muchas otras.^{20,21} Con base en lo anterior, el mayor número de exposiciones ocurren principalmente en los trabajadores de las industrias que manejan este tipo de compuestos derivados del Cr(VI) como por ejemplo el cromato, los colorantes y pigmentos, el acero mecanizado, la soldadura y el revestimiento de cromo, entre muchos otros procesos químicos a los cuales es sometido el cromo.²¹ Entre mayor sea la exposición a Cr(VI) mayor es el riesgo de padecer cáncer de pulmón u otro tipo de enfermedad respiratoria, debido a que la exposición es acumulativa. Por otra parte, la exposición en la piel puede generar reacciones alérgicas como ulceraciones en la piel y dermatitis debido al trabajo con materiales que contienen cromo como: el cemento, los pigmentos de cromato, el curtido de cuero, la soldadura y muchos otros.²¹

La química del cromo ha sido estudiada por muchos autores, el cromo existe en los estados de oxidación en el rango de (+6) a (-1), siendo los estados más comunes encontrados en el ambiente el Cr(III) y el Cr(VI).²² El cromato (CrO_4^{2-}) y dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) son las dos formas más comunes de encontrar el Cr(VI) en el medio ambiente; la concentración relativa de cada una de las especies depende del pH del

agua contaminada y de la concentración del Cr(VI).²²

Por tanto, fue necesario implementar un mecanismo para modificar el estado de oxidación del cromo (un metal pesado tóxico en su más alto número de oxidación) y convertirlo en una forma menos dañina para así disminuir las concentraciones letales para los seres vivos, lo que conllevaría a evitar problemas ambientales que afecten al recurso agua.¹⁵

1.2. JUSTIFICACIÓN

La contaminación por metales pesados es una problemática que afecta los cuerpos de agua que muchas veces utiliza el ser humano para su consumo.^{23,24} Se han implementado algunas estrategias para disminuir dicho problema, entre esas la utilización de microorganismos que absorben el contaminante y contribuyen así a disminuir la contaminación ocasionada,¹³ en otros casos se han realizado estudios para la eliminación de Cr(VI) utilizando nanopartículas, materiales magnéticos que adsorben este tipo de cromo en las aguas contaminadas con dicho metal,²⁵ pero estos métodos no son muy eficaces ni son utilizados por la mayoría de las industrias.¹³

Según Xu Xiang-Rong, *et al.*,¹³ la vitamina C es un agente reductor de mucha importancia en el metabolismo del ser humano y no posee algún grado de toxicidad si es consumido moderadamente. La vitamina C tiene alta solubilidad en el agua (330 g/L) a una temperatura de (24 °C) por lo que se puede disolver en agua e infiltrar fácilmente en los diferentes tipos de suelo. Sus propiedades reductoras pueden ser utilizadas para reducir metales pesados a estados de oxidación más bajos y menos tóxicos para los seres vivos en general. Varios estudios científicos han permitido demostrar que la vitamina C es un agente reductor que permite reducir metales pesados de valencias altas a bajas, por ejemplo el cromo (VI) utilizado en las diversas industrias y frecuentemente encontrado en aguas contaminadas puede ser reducido a cromo (III).^{13,26}

El par redox ácido L-ascórbico/ácido dehidroascórbico con un $E_R^0 = +0,06V$ a pH 7,0 puede reducir iones en estado de oxidación de metales como: Cr, Co, Ce, Fe, Ir, Pb, Mn, Hg, Rh entre otros. Esto contribuiría a disminuir su toxicidad y mejoraría la calidad de los cuerpos de agua contaminados por vertimientos de las industrias que utilizan metales pesados para su funcionamiento.^{15,27}

Con base en lo anterior, se buscó implementar el uso de la Vitamina C para disminuir la contaminación ocasionada por la utilización de productos que contienen metales pesados. Inicialmente se pretende utilizar Cr(VI) para demostrar que el principio del método es viable y por tanto se puede utilizar en el resto de metales pesados cuyo potencial de reducción estándar (E_R^0) sea mayor al de la Vitamina C, de esta forma la reacción entre dicho metal y la Vitamina C sea espontánea. Por otra parte, el método puede resultar viable económicamente, ya que existen algunas frutas exóticas que poseen un alto contenido de vitamina C y muchas veces son desechadas o se dañan por la falta de uso o consumo en el mercado local.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

- ✓ Proponer la utilización de zumos de frutas exóticas con alto contenido de vitamina C para la remediación de aguas contaminadas con cromo

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Normalizar un método para determinar el contenido de Vitamina C en frutas por HPLC
- ✓ Determinar el contenido aproximado de vitamina C en 32 frutas disponibles en el mercado colombiano.
- ✓ Realizar el tratamiento de aguas contaminadas con cromo utilizando zumos de dos frutas con alto contenido de Vitamina C

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. MARCO TEÓRICO

2.1.1. Antioxidantes presentes en las frutas

El término antioxidante es definido como: “una sustancia que inhibe la oxidación o aquellas reacciones que son promovidas por el oxígeno, los peróxidos o los radicales libres”.²⁸ Teniendo en cuenta la anterior definición, existen diversos tipos de antioxidantes presentes en las plantas entre los que se destacan principalmente los flavonoides, los carotenoides y algunas vitaminas.

Flavonoides: son considerados compuestos químicos que pertenecen al grupo de los compuestos fenólicos. Constituyen un considerable grupo de metabolitos secundarios encontrados en las plantas debido a sus aplicaciones así como de sus propiedades bioquímicas.²⁹ Los flavonoides existen en forma de agliconas y glucósidos, éstos son consumidos en la mayoría de las frutas, legumbres y verduras; se caracterizan por hacer parte de la dieta diaria del ser humano.^{30,31}

Carotenoides: son metabolitos secundarios de las plantas y se dividen en dos grupos estructurales principales: las xantofilas oxigenadas y los hidrocarburos carotenos tales como el α y β -caroteno y el licopeno.^{32,33}

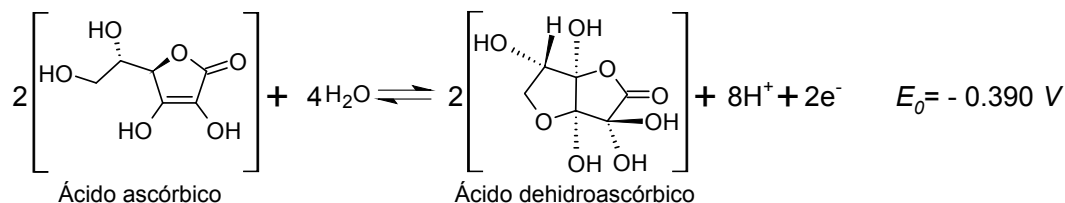
Vitaminas: pueden ser definidas como un grupo de sustancias orgánicas que son esenciales para el metabolismo del organismo en mínimas cantidades. Son clasificadas en vitaminas solubles e insolubles, lo cual hace referencia a las vitaminas que son solubles en agua como la vitamina C, y las vitaminas solubles en grasa o insolubles en agua como las vitaminas A, D, E y K. El consumo exagerado de vitaminas puede ocasionar una enfermedad conocida como hipervitaminosis. La función de las vitaminas es numerosa, algunas de sus funciones son: la participación en los genes como inductores de la biosíntesis de proteínas y de agentes redox, también actúan como coenzimas.¹¹

2.1.2. Importancia del ácido ascórbico o Vitamina C

El ácido ascórbico es un antioxidante muy importante en el metabolismo de los seres humanos. Se encuentra ampliamente distribuido en el material vegetal y el cuerpo humano no puede sintetizarlo. Este se encuentra principalmente en frutas y verduras en diferentes cantidades que son fuentes principales para la dieta humana. El ácido L-ascórbico, isómero biológicamente activo de la vitamina C (o en su abreviatura AA) es utilizado como antioxidante que al oxidarse se convierte en ácido dehidroascórbico (DHA) que recibe su nombre por la presencia de dos grupos hidroxilo en su estructura.

Para evitar la rápida oxidación de la vitamina C en los productos alimenticios, se

Figura 1. Reacción del ácido ascórbico y formación del ácido dehidroascórbico



FUENTE: Autora

utilizan conservantes como el ácido cítrico o benzoico que previenen o inhiben el crecimiento de microorganismos. A pesar de que éstos conservantes se encuentran contenidos de manera natural en las frutas y alimentos, se deben adicionar en cantidades mínimas para aumentar la vida útil de la vitamina C. Las cantidades máximas establecidas por las entidades de control para el uso del ácido benzoico en zumos de frutas está entre (400–600) mg/mL, pero existe una gran preocupación acerca de la liberación de benceno generado por la reacción entre el ácido benzoico y el ácido ascórbico bajo ciertas condiciones.³⁴

La reacción de oxidación de la vitamina C para convertirse en ácido deshidroascórbico depende del pH. A un pH ácido el equilibrio estará desplazado hacia los reactivos por lo que la decadencia del ácido dehidroascórbico (DHA) es más lenta cuando se mantiene o se utiliza un pH 3,0, de modo que no existe una diferencia significativa entre la concentración inicial y final del analito, por tal razón podría inferirse que este pH es el más adecuado para éste tipo de análisis.³⁵ Por otra parte, estudios realizados para el análisis de Vitamina C, demuestran que la cantidad de ácido ascórbico disminuye a medida que transcurre el tiempo debido a condiciones externas como la temperatura ambiente, el pH y la presencia de oxidantes en el medio, entre muchas otras.

2.1.3. Análisis de Vitamina C en jugos de frutas

El método utilizado en el análisis de Vitamina C en jugos de frutas es el (AOAC 967,22). Este método utiliza cromatografía líquida de alta eficiencia o HPLC con un detector UV, la cual permite cuantificar la cantidad de ácido ascórbico presente en un zumo de fruta; también utiliza el ácido benzoico como conservante para aumentar la estabilidad de la vitamina C durante el análisis. El jugo es obtenido al aplicar presión sobre la fruta seguido de centrifugado para facilitar su extracción.³⁴

2.1.4. Método de adición estándar

El método de adición estándar consiste en adicionar volúmenes iguales de solución problema en varios estándares de solución a excepción de una y posteriormente todas las soluciones se diluyen a un mismo volumen.³⁶ En todas las soluciones el efecto de la matriz es el mismo. Se puede observar el aumento de la señal emitida por el equipo (en este caso utilizando HPLC) y se determina la cantidad de analito que se encuentra en la muestra desconocida. El método de adición estándar es ideal para ser utilizado en muestras donde la composición de la matriz es desconocida o considerada compleja y afecta la señal analítica. Por tanto, un efecto de la matriz es un cambio en la señal analítica emitida y es causado por otro componente presente en la muestra (ya sea en su contenido o las condiciones en las que se encuentra).²⁷

2.1.5. Reacción de la Vitamina C con metales pesados en altos estados de oxidación

El cálculo del potencial de una reacción redox utilizando los potenciales de reducción estándar E^0 permite establecer si la reacción es espontánea. La vitamina C es una sustancia ácida en solución acuosa, por lo tanto su potencial de reducción depende del pH. A un pH 0 la vitamina C es un agente reductor más eficiente que el ácido succínico, mientras que a pH 7, éste orden se invierte. Por tanto, el potencial redox de la reacción hace referencia al potencial de reducción en un determinado conjunto de condiciones donde se incluyen factores como el pH, la fuerza iónica y la concentración de agentes complejantes.²⁷ La reacción de oxidación del ácido ascórbico para formar ácido dehidroascórbico ocurre de manera electroquímicamente reversible pero químicamente irreversible.²⁷

La ecuación de Nerst (ver ecuación 1) para la oxidación del ácido ascórbico (ver Figura~1) puede escribirse como:

$$E = E^0 - \frac{0,05916}{2} \log_{10} \frac{[H_2A]}{[D] [H^+]^2} \quad (1)$$

Donde D representa al ácido dehidroascórbico y su actividad puede aproximarse a su concentración molar (Ver ecuación 2). De otra parte para la vitamina C como es un ácido diprótico H_2A (Vitamina C) se utiliza la ecuación 3 que expresa $[H_2A]$ en términos de F_{H_2A} :

$$[D] = F_D \quad (2)$$

$$[H_2A] = \frac{[H^+]^2 F_{H_2A}}{[H^+]^2 + [H^+] K_1 + K_1 K_2} \quad (3)$$

Reemplazando las ecuaciones 2 y 3 en la ecuación 1 se obtiene:

$$E = E^0 - \frac{0,05916}{2} \log_{10} \frac{\left[\frac{[H^+]^2 F_{H_2A}}{[H^+]^2 + [H^+] K_1 + K_1 K_2} \right]}{[F_D] [H^+]^2} \quad (4)$$

Reorganizando la ecuación 4 se obtiene:

$$E = E^0 - \frac{0,05916}{2} \log_{10} \frac{1}{[H^+]^2 + [H^+] K_1 + K_1 K_2} - \frac{0,05916}{2} \log_{10} \frac{F_{H_2A}}{F_D} \quad (5)$$

Al reemplazar en la ecuación 5 E^0 , el valor de las constantes de acidez $K_1 = 7,94 \times 10^{-5}$, $K_2 = 1,62 \times 10^{-12}$ y la concentración de $[H^+] = 1,00 \times 10^{-7}$ a pH 7,0 se encuentra que el potencial de reducción del ácido ascórbico a pH 7,0 es de 0,062 V.

2.2. ANTECEDENTES

2.2.1. Contenido de vitamina C en frutas exóticas

Recientemente la producción de frutas exóticas ha aumentado de manera considerable. La gran mayoría de dichas frutas presentan alto contenido de vitaminas y muchas otras sustancias que contribuyen al metabolismo del organismo y su consumo moderado evita muchas enfermedades.³⁷ Existen diversos métodos analíticos con diferentes tecnologías que son utilizados para determinar de manera cuantitativa el ácido ascórbico en los alimentos, de manera especial en frutas y verduras, tales como los métodos espectrofotométricos, cromatográficos, colorimétricos, etc.^{38,39} Dichos métodos son empleados de acuerdo a sus ventajas; por ejemplo,

algunos tienen tiempo de análisis corto, otros alta sensibilidad y en otros el costo del análisis es bajo.³⁷

Por otra parte, Colombia es considerado a nivel mundial como el segundo país con la mayor diversidad de frutas. Esto se debe a su biodiversidad, el espacio geográfico, los tipos de suelo y los climas que tiene. Por tal razón, el consumo de frutas tropicales ha aumentado de manera considerable en los últimos tiempos. La exportación de frutas exóticas, de plantas originarias de nuestra región ha permitido que nuestro país haya incrementado su producción y mercado.

2.2.2. Contaminación en aguas por metales pesados

Los cuerpos de agua son empleados en diferentes usos, ya sea de tipo doméstico, agrícola o industrial, pero éstos pueden contaminarse. La utilización de metales pesados pueden contaminar dichos cuerpos de agua, lo cual afectan la salud de animales, plantas y del ser humano. Dichos metales pesados son utilizados en las actividades realizadas por el hombre como son la minería, las curtiembres de cuero y aquellas industrias cuya producción genera residuos que son muchas veces vertidos a los ríos sin un tratamiento adecuado. Por tal razón, se han implementado técnicas para mitigar esta problemática y así disminuir las concentraciones de metales pesados presentes en aguas en su mayoría subterráneas y residuales.⁴⁰

2.2.3. Contaminación en aguas por cromo

La contaminación por cromo (VI) en aguas (principalmente subterránea y potable) y en suelos es considerada una problemática a nivel mundial. El cromo (VI) es un contaminante muy común generado por las industrias de cuero, en la producción de acero inoxidable, en la industria química, entre muchas otras, donde los vertimientos generados contienen en su mayoría complejos de cromo que son extremadamente tóxicos y afectan la salud de los seres vivos; muchos de éstos vertimientos terminan desembocando en los ríos sin un adecuado tratamiento y por tanto afectan las condiciones de los suelos y de las mismas aguas que lo contienen.¹²

Por su parte, el cromo es un metal que presenta estados de valencia de (II) a (VI); es predominante encontrarlo en sus estados (II) y (III) en la naturaleza, pero su forma (VI) es la más utilizada por las industrias que generan compuestos altamente oxidantes.¹² El cromo (III) es considerado como uno de los elementos químicos importantes en el desarrollo de los seres vivos de especialmente en los animales y el ser humano en donde es requerido a nivel de trazas para el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Por tal razón se hace necesario convertir el cromo hexavalente (VI) en cromo trivalente (III), ya que el segundo es menos perjudicial, inmóvil y de cierta manera contribuye a disminuir la contaminación en aguas residuales y subterráneas donde cada día aumenta la concentración de cromo (VI).^{12,13}

El cromo (VI) es la forma más tóxica para los seres vivos; en los seres humanos puede producir dermatitis pero también está asociado con daños en el sistema respiratorio y en otros órganos.¹³ Con el propósito de disminuir la contaminación generada por el cromo (VI), se han implementado técnicas de biorremediación que permiten disminuir las concentraciones de cromo presentes en aguas y suelos; una de ellas es la implementación de cultivos de bacterias que convierten el cromo (VI) en cromo (III) (de menor toxicidad para los seres vivos). También se ha sugerido la utilización de compuestos como: el sulfuro de hidrógeno H_2S ,^{41,42} las sales de $Fe(II)$,⁴³⁻⁴⁵ el glicerol¹⁷ y la vitamina C¹⁵ pero entre los primeros también se generan residuos tóxicos que ocasionan problemas ambientales, por lo cual no son muy efectivos para remover éste tipo de contaminación.¹³

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Método de HPLC para la determinación de Vitamina C

En la primera parte del proyecto, se normalizó el método que se empleó en la determinación de vitamina C, utilizando un estándar primario de ácido L-ascórbico certificado. Fue utilizado un equipo de HPLC (cromatografía líquida de alta eficiencia) AGILENT 1200 equipado con una columna C18 con tamaño de partícula de 5,0 μm de diámetro, 250 mm de longitud, 4,6 mm de diámetro, un detector DAD (Fotoarreglo de diodos) y una bomba cuaternaria con flujo de hasta 5,0 mL/min. El volumen de inyección se fijó en 1,0 μL y se realizó una detección a (254) nm. Los parámetros iniciales de composición de fase móvil se ajustaron según lo reportado en la literatura.⁴⁶

Para optimizar el flujo de fase móvil se realizó una curva de Van Deemter⁴⁷ y la composición de fase móvil inicial se modificó para minimizar el gasto de metanol sin perder eficiencia en la separación.³⁴ Luego se realizó una curva de calibración inyectando 6 soluciones estándar en el rango de (0,010–0,404) mg/mL para determinar el límite de detección (LD), el límite de cuantificación (LC), la linealidad del método y el porcentaje de error relativo. En la tabla Tabla~1 se presentan los parámetros utilizados en el método para la determinación de vitamina C.

Tabla 1. Condiciones cromatográficas para el análisis de vitamina C.

Parámetro	Sistema Cromatográfico Agilent 1200
Temperatura	25 °C
Longitud de onda	254 nm
Fase móvil A	Agua grado HPLC - 85 %
Fase móvil B	Metanol 5 %
Fase móvil C	Ácido o-fosfórico 5 % - 10 %
Flujo	0,4 mL/min
Volúmen de inyección	1,0 μL

3.2. Análisis de las 32 frutas por HPLC utilizando el método de adición estándar

En la segunda parte del proyecto, se realizó el análisis de vitamina C en 32 frutas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para determinar las frutas con mayor contenido y posteriormente utilizarlas en el tratamiento de aguas contaminadas con Cr(VI).

3.2.1. Selección del material de fruta

El material de partida fue seleccionado a partir de frutas exóticas adquiridas en las principales plazas de mercado de Bucaramanga y de algunos lugares del país donde se cultivan; estas se obtuvieron en diferentes periodos de tiempo donde la cosecha era óptima y las condiciones ambientales favorecían su crecimiento, teniendo en cuenta la calidad de la fruta y el tamaño. En la 1 se presenta el nombre de la fruta, la familia a la que pertenece y su nombre científico.

3.2.2. Procedimiento del corte de la fruta y obtención del zumo

La fruta fue pelada en dos mitades, donde las semillas fueron retiradas con mucho cuidado para evitar posibles pérdidas del zumo de fruta y fueron presionadas manualmente y en algunos casos posteriormente maceradas para así obtener el zumo. Luego, el zumo de fruta obtenido fue centrifugado durante 5 minutos a 2500 rev/min para clarificar el zumo. En algunas frutas ej: pomarrosa fue necesario añadir agua, macerar la fruta y homogeneizar la pasta resultante en el baño de ultrasonido.

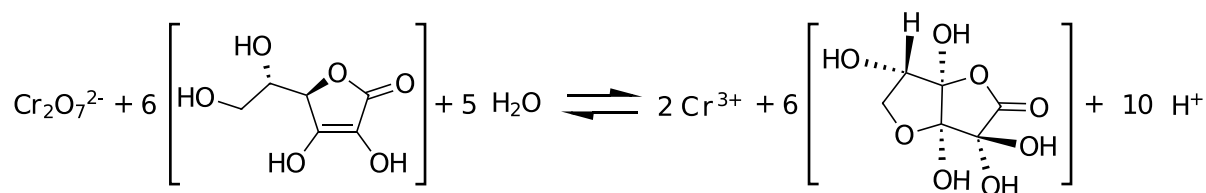
El extracto obtenido fue la muestra de interés y de ella se tomó 1,0 mL para introducirlo en cada uno de los 6 balones aforados 50,00 mL) que se utilizaron para realizar la curva de calibración por el método de adición estándar. Por otra parte, se preparó un patrón a concentración de 1,0 mg/mL de ácido L-ascórbico y de ahí se extrajeron volúmenes diferentes 0; 0,50; 1,00; 2,00; 5,00; 10,0 mL para luego adicionarlos en cada uno de los balones aforados y de esta manera poder diluir hasta el aforo. Luego de las respectivas diluciones, éstos patrones fueron filtrados individualmente utilizando filtros con tamaño de poro de 0,45 μ m antes del análisis. Fue realizado el mismo procedimiento para siguientes 32 frutas exóticas y finalmente se escogieron las 2 frutas con mayor contenido de vitamina C que no alteran la cadena alimenticia del ser humano para el posterior análisis en aguas con metales pesados.

3.3. Estudio de la reacción de la vitamina C con cromo

3.3.1. Cromo hexavalente

Los complejos ascorbato de cromo son muy importantes para el estudio de la química de coordinación, siendo el ascorbato uno de los principales reductores metabólicos para el cromo (VI). La reacción entre el cromo (VI) y el ácido ascórbico produce cromo (III) y ácido deshidroascórbico como productos finales de la reacción (ver figura Figura~2).¹⁵

Figura 2. Reacción entre el Cr(VI) y la vitamina C



FUENTE: Autora

Con base en lo anterior, el método que fue utilizado para observar la reducción química del cromo (VI) a cromo (III) fue el método colorimétrico por UV-Vis, que se encuentra referenciado en el libro *Standard Methods for examination of water and wastewater*.⁴⁸

Para la determinación de Cr(VI) se tuvo en cuenta los siguientes pasos:

Preparación de la curva de calibración: Se preparó una solución estándar de Cr(VI) a partir de una solución Stock de (500 µg/mL). La solución Stock de Cr(VI) fue preparada al disolver 141,4 mg de K₂Cr₂O₇ en 100 mL de agua desionizada; de esta solución Stock fue tomado 1,00 mL y diluido en 100 mL de agua desionizada, para así obtener la solución estándar de Cr(VI) (5,00 µg/mL).

Se transfirieron volúmenes en el rango de 2,00 a 20,0 mL de la solución estándar de cromo preparada anteriormente a vasos plásticos de 100 mL; para preparar estándares en el rango de 100 a 1000 µg/L de cromo. Luego fueron adicionadas entre (1 a 5) gotas de H₃PO₄ concentrado para ajustar el pH en el rango de 2,0 ± 0,5. El pH fue medido utilizando un pHmetro. Luego, las soluciones fueron transferidas cuantitativamente a balones aforados de 100 mL, diluidas al aforo y agitadas para homogeneizar.

Para desarrollar el color en cada uno de los balones fueron adicionados 2,0 mL de una solución de 1,5-difenilcarbazida, se agitaron nuevamente hasta homogeneizar y al cabo de aproximadamente 10 min se transfirieron alícuotas a una celda de cuarzo de 1,00 cm de longitud y medidas en el espectrofotómetro Ultravioleta Visible a una longitud de onda de 540 nm; se utilizó un blanco que contenía todos los reactivos utilizados disueltos en agua desionizada excepto el Cr(VI). Con los resultados ob-

Cuadro 1. Listado e información de interés de cada una de las 32 frutas exóticas analizadas.

Nombre común	Nombre científico	Familia
Anón	<i>Annona squamosa</i>	Annonaceae
Arazá	<i>Eugenia stipitata</i>	Myrtaceae
Borojó	<i>Borojoa patinoi</i>	Rubiaceae
Carambolo	<i>Averrhoa carambola</i>	Oxalidaceae
Cóngolo	<i>Couratari guianensis</i>	Lecythidoideae
Cidra	<i>Citrus limetta</i>	Rutaceae
Curuba	<i>Passiflora tarminiana</i>	Passifloraceae
Granadilla	<i>Passiflora ligularis</i>	Passifloraceae
Guama	<i>Inga edulis</i>	Fabaceae
Guanábana	<i>Annona muricata</i>	Annonaceae
Guayaba	<i>Psidium guajava</i>	Myrtaceae
Guayaba pera	<i>Psidium guajava</i> spp.	Myrtaceae
Icaco	<i>Chrysobalanus icaco</i>	Chrysobalanaceae
Limón	<i>Citrus limon</i>	Rutaceae
Lulo	<i>Solanum quitoense</i>	Solanaceae
Mamón	<i>Melicoccus bijugatus</i>	Sapindaceae
Mandarina	<i>Citrus</i> sp.	Rutaceae
Mangostino	<i>Garcinia mangostana</i>	Clusiaceae
Maracuyá	<i>Passiflora edulis</i>	Passifloraceae
Marañón	<i>Anarcadium occidentale</i>	Anarcadiaceae
Melón	<i>Cucumis melo</i>	Cucurbitoideae
Mora	<i>Rubus</i> spp.	Rosaceae
Moringa	<i>Moringa ovalifolia</i>	Moringaceae
Naranja	<i>Citrus sinensis</i>	Rutaceae
Noni	<i>Moringa citrifolia</i>	Rubiaceae
Piña	<i>Bromelia ananas</i>	Bromeliáceas
Pitaya	<i>Hylocereus trigonus</i>	Cactaceae
Pomarrosa	<i>Eugenia malaccensis</i>	Myrtaceae
Sandia	<i>Citrullus lanatus</i>	Cucurbitaceae
Tamarindo	<i>Tamarindos indica</i> L.	Papilionacea
Tomate de árbol	<i>Solanum betaceum</i>	Solanaceae
Uchuva	<i>Physalis peruviana</i>	Solanaceae

tenidos, las absorbancias fueron utilizadas para construir una curva de calibración.⁴⁸

Reacción de Cr(VI) con una solución de Vitamina C: en esta parte de la metodología se determinó la cantidad de Cr(VI) que se reduce a partir de una solución con Vitamina C. Utilizando la solución Stock de Cr(VI) (500 µg/mL), fueron tomados 10 mL y diluidos en 250 mL de agua desionizada, de esta forma se pudo obtener la solución de 20 µg/mL de Cr(VI), utilizada para calcular la cantidad de Cr(VI) que permanece en solución al reaccionar con la vitamina C. Luego, fueron tomadas 10 alícuotas de 10 mL de la solución anteriormente preparada de Cr(VI) (20 µg/mL) y a cada una se le adicionó un volumen creciente (desde 0 hasta 10 mL) de solución de vitamina C (0,01 mg/mL). Las muestras fueron agitadas y se dejaron reposar durante 10 min; luego, estas muestras fueron tratadas de forma similar que el numeral anterior y el contenido de Cr(VI) remanente en cada una de ellas fue determinado utilizando la curva de calibración.

Reacción de Cr(VI) con una solución del extracto de las frutas (noni y marañón): en esta última parte del trabajo se determinó inicialmente el contenido de Vitamina C en cada una de las frutas de interés, teniendo en cuenta que su contenido varía según las condiciones ambientales, el lugar donde se cultivan las frutas y al momento de extraer el zumo. Utilizando el método descrito en la sección 3.1, se determinó el contenido de Vitamina C presente en cada una de las frutas. Luego, se estudió la reacción entre el Cr(VI) y la Vitamina C presente en cada una de las frutas se evaluó siguiendo la metodología descrita en el numeral 3.3.1

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Equipos

El contenido de vitamina C en las frutas fue determinado utilizando un cromatógrafo líquido Agilent 1200. La determinación de Cr(VI) por UV-Vis se analizó con un espectrofotómetro (Agilent 8453).

4.2. Reactivos y Materiales

Dentro del análisis fueron utilizados los siguientes reactivos:

- ✓ Ácido ascórbico estandar primario, $C_6H_8O_6$
- ✓ Ácido L-ascórbico, $C_6H_8O_6$ (CARLO ERBA)
- ✓ Dicromato de potasio, $K_2Cr_2O_7$ (CARLO ERBA)
- ✓ 1,5-Difenilcarbazida (PANREAC)
- ✓ Ácido o-fosfórico 85 %, H_3PO_4 (MERCK)
- ✓ Ácido clorhídrico 35 %, HCl (CARLO ERBA)
- ✓ Ácido sulfúrico (95–97) %, H_2SO_4 (MERCK)
- ✓ Ácido nítrico 65 %, HNO_3 (CARLO ERBA)
- ✓ Hidróxido de sodio, NaOH (MERCK)
- ✓ Ácido benzoico, C_6H_5-COOH (CARLO ERBA)
- ✓ Acetona, C_3H_6O (MERCK)
- ✓ Metanol grado HPLC, CH_3OH (J.T. BAKER)
- ✓ Agua grado HPLC (agua desionizada)

4.3. Instrumentación y condiciones

En la primera parte del proyecto fue utilizado un cromatógrafo Agilent Technologies HPLC de serie 1200 acoplado a un detector de fotoarreglo de diodos (DAD) con detección de 254 nm, con una columna SORBAX C18, de 250 mm de longitud, 4,6 mm de diámetro y un tamaño de partícula de 5,0 μm . En la segunda parte del proyecto, se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible de referencia 8453, 2001-2008.

4.4. Normalización del método de HPLC

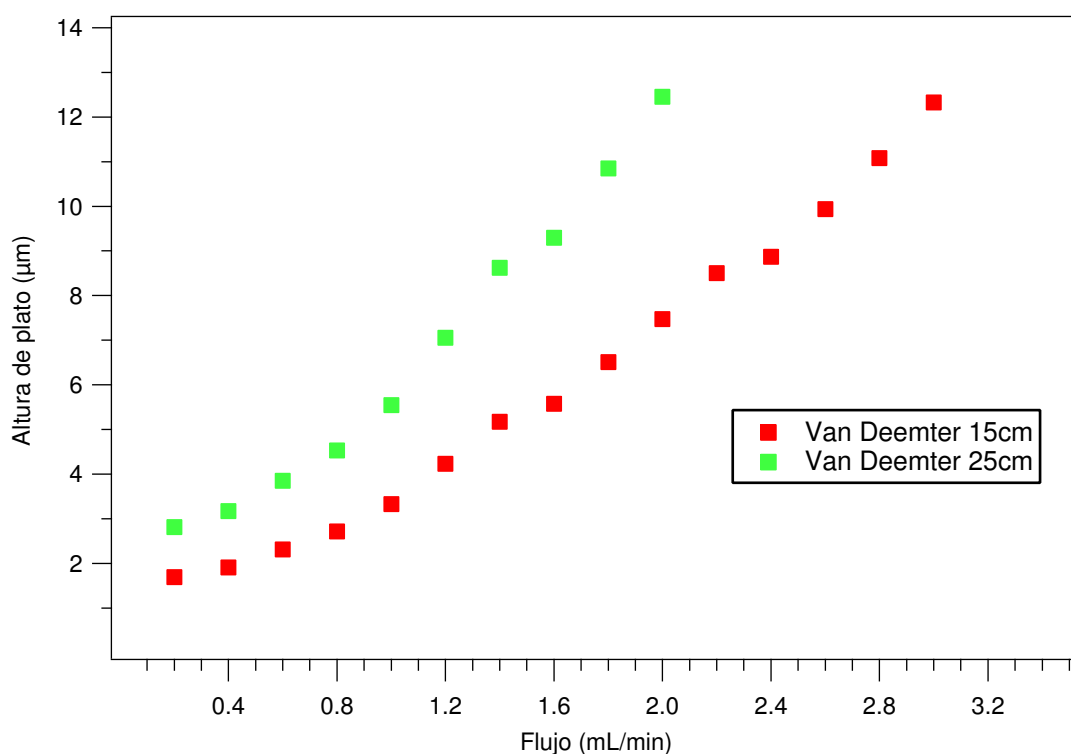
Teniendo en cuenta los procedimientos 3.1 y 3.2 utilizados para la determinación del contenido de Vitamina C en diferentes frutas, se ajustaron los parámetros que se mencionan a continuación:

4.4.1. Optimización de flujo

Para encontrar el flujo óptimo en este análisis de Vitamina C, se utilizó la ecuación de Van Deemter (Ecuación 6); esta ecuación relaciona la altura de plato (H) con la velocidad lineal de la fase móvil (u_x).⁴⁹ A, B y C son constantes que dependen de la fase estacionaria. La gráfica de Van Deemter (Figura 3) se contruyó al relacionar la altura de plato vs. el flujo volumétrico ya que este es directamente proporcional al flujo lineal (u_x)

$$H = A + \frac{B}{u_x} + Cu_x \quad (6)$$

Figura 3. Gráfica de Van Deemter utilizando las columnas C18 de 25 y 15 cm



FUENTE: Autora

Determinación de la altura de plato

Como se observa en la Figura 3, inicialmente se utilizaron dos columnas; en la columna de 15 cm se puede aumentar el flujo volumétrico sin perder eficiencia en el análisis, pero en este estudio fue utilizada la columna de 25 cm de longitud porque al ser más larga, tiene un mayor número de platos, por lo tanto la separación es más eficiente.

De otro lado, el flujo óptimo equivale a aquel valor que tiene menor altura de plato, por tanto el valor obtenido según la Figura 3 es (0,2 mL/min) utilizando la columna C18 de 25 cm; este valor no fue tenido en cuenta porque el tiempo total de análisis es de 30 min, por razones de tiempo y costos se decidió emplear un flujo de (0,4 mL/min). Aunque a este valor, hay una pequeña pérdida de eficiencia y resolución en el análisis, el tiempo de total de análisis es la mitad del tiempo en comparación con el anterior. No se utilizó un flujo mayor a (0,4 mL/min) porque las frutas analizadas son matrices complejas.

A continuación se observa una muestra de cálculos: se obtuvo una altura de plato de 12,7 μm y un número de platos 19694,82, el cual es un valor cercano al reportado por los fabricantes de la columna ($N = 25000$).

$$N = 5,54 * \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (7)$$

Siendo;

$$t_R = 8,246 \text{ min}$$

$$w_{1/2} = 0,1383$$

Reemplazando los valores se obtiene:

$$N = 5,54 * \left(\frac{8,246}{0,1383} \right)^2 = 1,97 * 10^4 \quad (8)$$

Con base en lo anterior, la altura de plato se determina utilizando la siguiente ecuación 9:

$$H = \frac{L}{N} \quad (9)$$

Reemplazando:

$$H = \frac{25 \text{ cm}}{1,97 * 10^4} \times \frac{1,0 \mu\text{m}}{1,0 * 10^{-4} \text{ cm}} = 12,7 \mu\text{m} \quad (10)$$

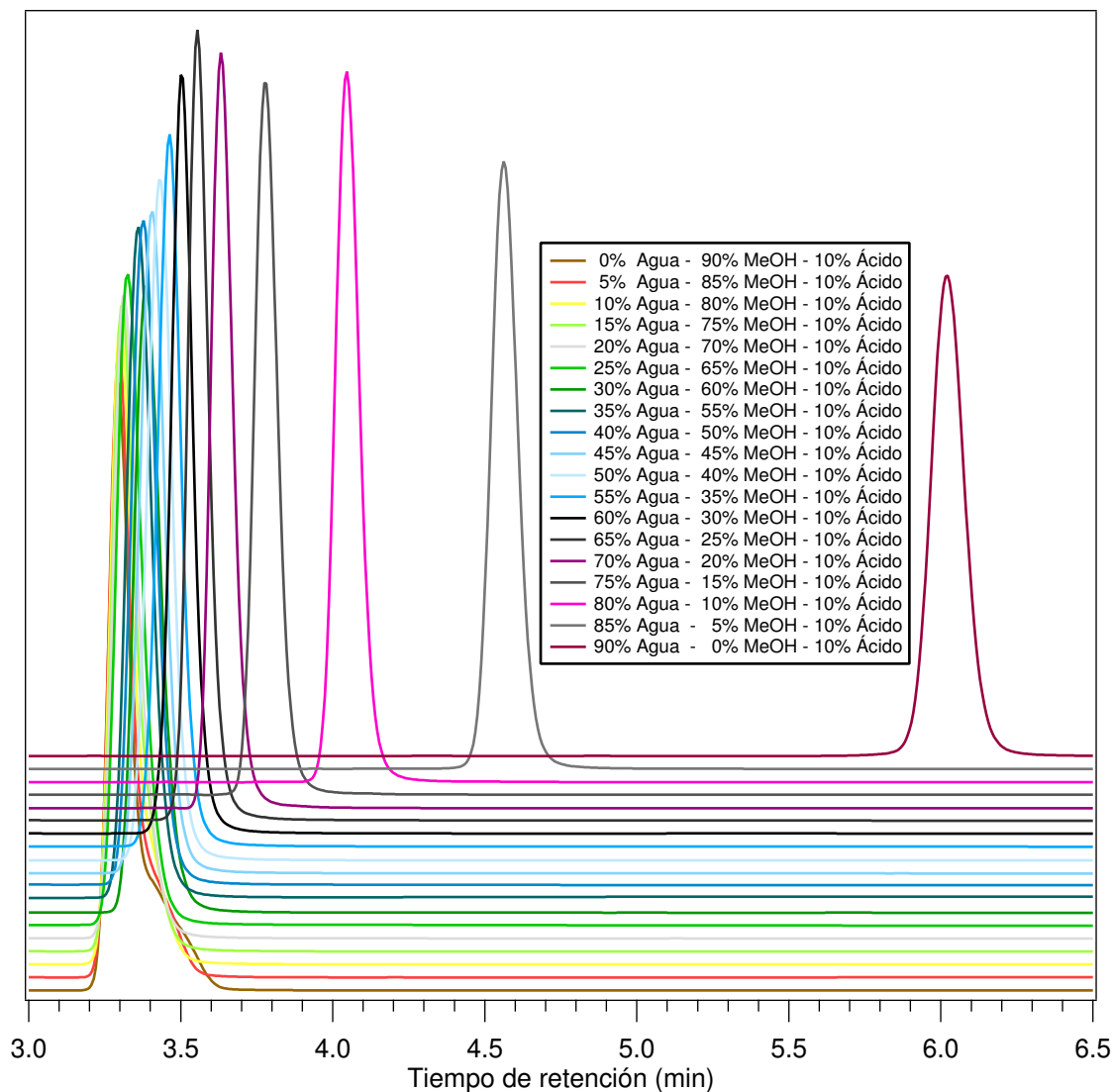
4.4.2. Optimización de composición de fase móvil

Según lo reportado en la literatura para la determinación de vitaminas por HPLC se utiliza una composición de 70 % metanol y 30 % de ácido acético al 0,05 %, (sol-

ventes de grado HPLC).⁴⁶ Teniendo en cuenta los costos y la serie eluotrópica, fue empleado un solvente de polaridad similar y menos costoso para el análisis de vitamina C; con base en esto se decidió utilizar la siguiente mezcla de solventes grado HPLC: agua desionizada, metanol y ácido *o*-fosfórico para mantener el pH por debajo del pKa del ácido ascórbico y así evitar la disociación. A pesar de las posibles variaciones en el valor del pH, se evitó utilizar un búffer porque este se puede precipitar por un cambio en la composición y tapar la columna cromatográfica o promover el crecimiento de microorganismos que pueden dañar el equipo.

Por otro lado, la optimización de fase móvil se determinó utilizando una columna de 15 cm con un flujo de 0,4 mL/min, un volumen de inyección de 1,0 μ L y como analito se empleó una solución de estándar secundario de vitamina C (1 mg/mL). Esta columna fue empleada porque los tiempos de análisis son más cortos y contiene la misma fase estacionaria que la columna utilizada en el análisis. La composición de la fase móvil se cambió desde 90 % H₂O desionizada, 0 % CH₃OH y 10 % H₃PO₄ al 5 %, en incrementos del 5 % de CH₃OH mientras disminuía la de agua en la misma proporción hasta llegar a una composición de 0 % H₂O desionizada, 90 % CH₃OH y 10 % H₃PO₄ al 5 % como se observa en la Figura 4. La eficiencia de cada composición se estableció al medir el número de platos y se encontró que la composición óptima encontrada fue de 85 % de H₂O, 5 % CH₃OH y 10 % H₃PO₄ al 5 %.

Figura 4. Composición de fase móvil a diferentes intervalos de concentración utilizando metanol, agua desionizada y ácido *o*- fosfórico



FUENTE: Autora

4.4.3. Parámetros estadísticos del método

- ✓ Sensibilidad del método: La sensibilidad del método fue establecida utilizando los límites de detección y cuantificación.

Determinación del límite de detección Según la definición de la IUPAC, el límite de detección es definido como: "la mínima concentración de un analito que dentro de un proceso analítico se puede detectar de forma confiable".^{50,51} La mayoría

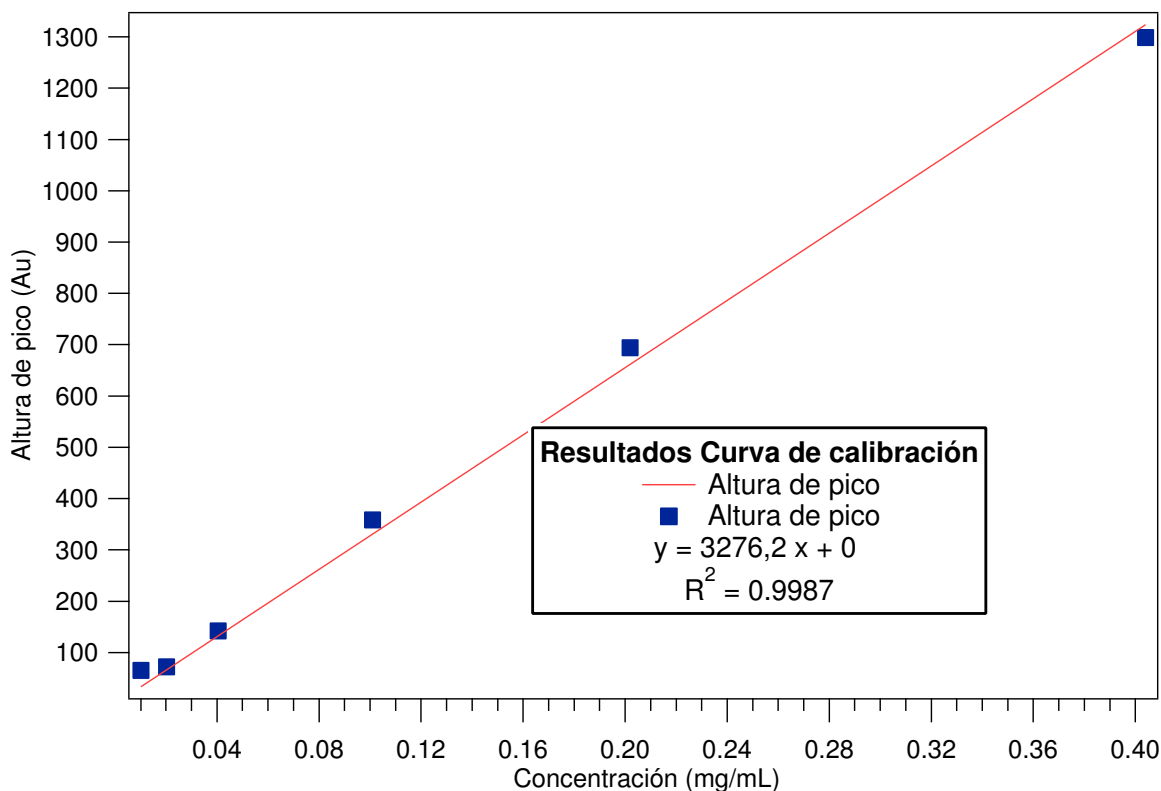
de los métodos analíticos requieren la construcción de curvas de calibración para la determinación de la concentración de un analito. Estas curvas normalmente son construídas al correlacionar la señal del detector (y) vs. la concentración del analito (x). Se utiliza como criterio aquella señal que tiene una intensidad al menos 3 veces superior a la del ruido.⁵¹ Para este análisis se determinó el límite de detección utilizando el método (ASTM E 685-93) que es basado en la práctica estándar para análisis variable de longitud de onda en detectores fotométricos usados en cromatografía líquida y definido por la “American Society for Testing and Materials”.⁵² Éste es basado en la medida del rango de tiempo de un análisis cromatográfico donde se empleó el método pico a pico para obtener los valores de señal a ruido.⁵² En este caso fue utilizada la determinación de ruido a corto plazo para un intervalo de tiempo seleccionado entre 1 y 10 minutos en el análisis de un estándar primario de Vitamina C preparado a diferentes concentraciones (0,010; 0,020; 0,040; 0,101; 0,202; 0,404 mg/mL). De los datos obtenidos, se utilizó la altura de pico de las regiones de los cromatogramas donde no habían indicios de señal del analito ni de otra especie para así determinar el ruido. Las alturas de pico obtenidas fueron promediadas y el valor obtenido fue multiplicado por 3. Al finalizar, este valor fue reemplazado en la ecuación de la recta calculada para el estándar primario (Concentración vs. Altura de pico) y de esta manera obtener el límite de detección.

Determinación del límite de cuantificación El límite de cuantificación hace referencia al mínimo contenido del analito que puede ser cuantificable y se calcula mediante una confianza estadística razonable utilizando un procedimiento analítico, en este caso equivale cuando la relación señal a ruido es mayor 10.^{52,53} El límite de cuantificación fue calculado utilizando el método anterior para la determinación del límite de detección a diferencia que, en lugar de multiplicar por 3 veces el promedio de las alturas de pico en este caso es por 10.

Dentro de los parámetros para determinar la sensibilidad del método, se tuvo en cuenta el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC). La concentración del analito que proporciona la relación señal a ruido cuando se considera mayor a 3 se determinó como el límite de detección, mientras que la relación señal a ruido cuando es mayor a 10 se consideró como límite de cuantificación.³⁴ En este análisis el límite de detección encontrado fue de 0,0035 mg/L mientras que el límite de cuantificación fue de 0,0112 mg/L.

En la Figura 5 se observa la curva de calibración obtenida para el estándar primario; se tuvo en cuenta la altura de pico para determinar el ruido, la concentración equivalentes a los límites de detección y cuantificación y la ecuación de la recta obtenida para determinar la concentración equivalente a dichos valores.

Figura 5. Curva de calibración obtenida de las diferentes concentraciones de estándar primario para la determinación de los límites de detección y cuantificación



FUENTE: Autora

Porcentaje de desviación relativa y desviación estándar del método

El porcentaje de desviación estándar relativa (*RSD*) es definido como: la relación entre la desviación estándar (*s*) y el promedio ($\bar{X}$) de los datos analizados multiplicado por 100 como se observa en la siguiente ecuación 11:⁵³

$$RSD = \frac{s}{\bar{X}} 100 \% \quad (11)$$

Teniendo en cuenta la ecuación anterior,

Siendo, “*s*” la desviación estándar de los valores del área de pico, se obtuvieron los siguientes valores de cada uno de los patrones preparados en rangos de concentración (desde 0,0101 mg/mL hasta 0,2020 mg/mL) y “ $\bar{X}$ ” equivalente a los promedios obtenidos de las alturas de pico de las 6 repeticiones de cada patrón preparado.

Un ejemplo del cálculo del porcentaje de desviación estándar relativa se observa a continuación, teniendo en cuenta los datos mostrados en la Tabla 2:

Para la concentración 0,0202 mg/mL:

$$RSD = \frac{17,64}{579,0} * 100 \% \quad (12)$$

$$\%RSD = 3,04$$

Con base en lo anterior, se obtuvo la siguiente tabla de resultados:

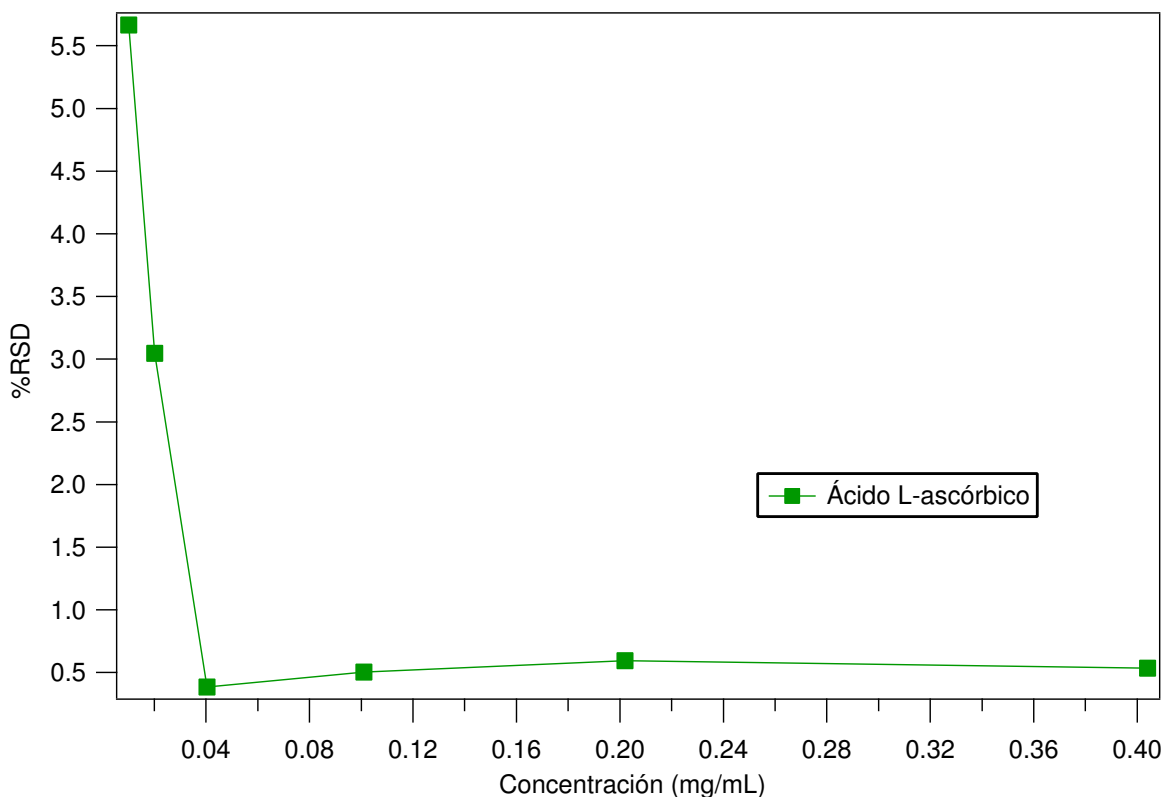
Tabla 2. Datos obtenidos de cada uno de los 6 patrones preparados para la determinación del % RSD

Concentración mg/mL	Promedio de área ($\bar{X}$)	Desviación estándar (s)	(% <i>RSD</i>)
0,0102	612,0	34,67	5,67
0,0202	579,0	17,64	3,04
0,0404	1162,2	4,473	0,38
0,1010	2929,6	14,75	0,50
0,2020	5775,6	34,38	0,60
0,4040	11 440,0	61,16	0,53

La precisión del área de pico fue medida como RSD (porcentaje de desviación estándar relativa) en el rango lineal del método.³⁴

El valor máximo de RSD para el ácido ascórbico fue de 5,67 % como se observa en la Figura~6; este valor es considerado alto para este tipo de análisis, lo cual indica que valores por debajo de una concentración de 0,030 mg/mL tienen un porcentaje de error relativo superior al 2 %. Con respecto a los demás valores obtenidos se indican los bajos valores de RSD que expresan la buena reproducibilidad y precisión aceptable del método. La representación gráfica de los valores asignados de RSD de altura de pico se observan en la Figura~6.

Figura 6. Área de precisión medido como RSD (%) para seis muestras en cada nivel de concentración).

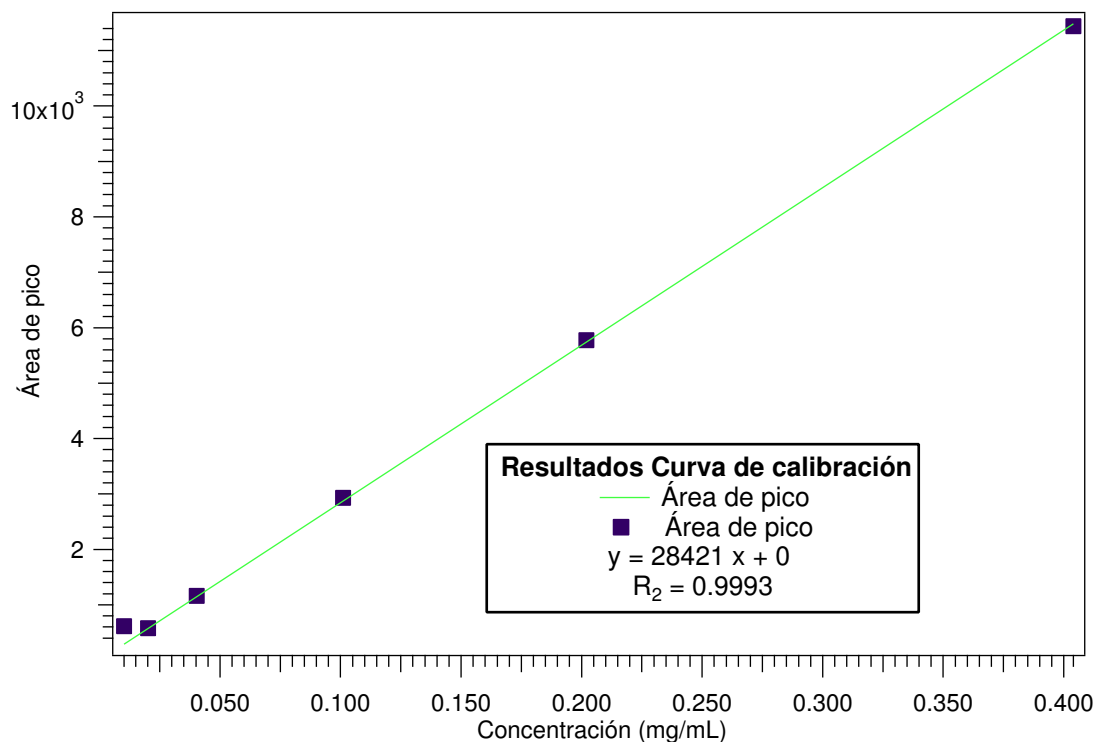


FUENTE: Autora

Determinación de la linealidad del método

La linealidad del método fue evaluada en el rango de concentraciones de (0,010–0,404) mg/mL como se observa en la Figura~7. Cada solución de estándar primario certificado fue inyectada 6 veces y el promedio de las mismas fue utilizado para construir la curva de calibración. La linealidad de la curva está representada por el coeficiente de correlación R^2 .⁵² Teniendo en cuenta la curva de calibración, se obtuvo un criterio de linealidad de $R^2 = 0,9982$, lo cual indica una buena correlación en los datos.

Figura 7. Curva de calibración obtenida de estándar primario



FUENTE: Autora

Repetitibilidad del método

La repetitibilidad del método hace referencia a la máxima diferencia esperada entre dos resultados obtenidos por la repetida aplicación de un procedimiento analítico a la misma muestra bajo condiciones idénticas. La medida para la repetitibilidad (r) está relacionada con la desviación estándar. Para una serie de mediciones de un tamaño suficiente (por lo general no inferior a 6), la repetitibilidad se define como⁵³:

$$r = 2,8 \times s_r \quad (13)$$

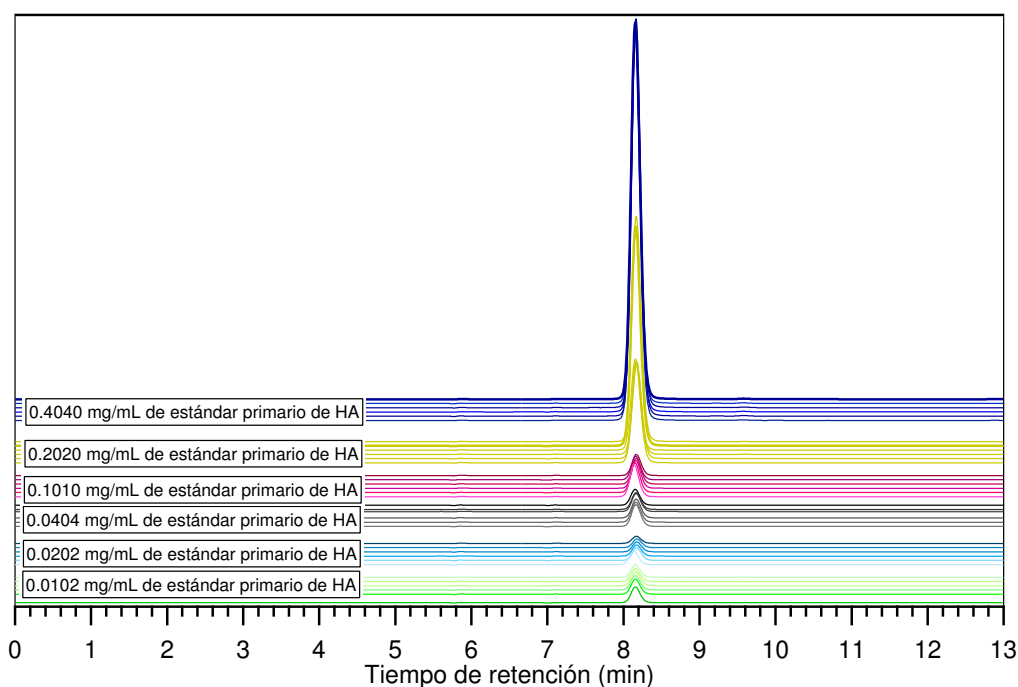
Utilizando un estándar primario certificado (Reference Standard) de ácido L-ascórbico se realizaron 6 inyecciones a 6 niveles de concentración en el rango de (0,010–0,404) mg/mL, realizado el mismo día de análisis y en el mismo laboratorio, obteniendo los siguientes valores de repetitibilidad como se observa Tabla~3

Tabla 3. Datos obtenidos de cada uno de los 6 patrones preparados para la determinación la repetitibilidad del método

Concentración mg/mL	$(\bar{X})$ de área de pico	$\%(s_r)$	Repetitibilidad (r)
0,0102	612,0	5,67	12,88
0,0202	579,0	3,05	8,540
0,0404	1162,2	0,38	1,064
0,1010	2929,6	0,50	1,400
0,2020	5775,6	0,60	1,680
0,4040	11 440,0	0,53	1,484

La repetitibilidad es más baja a mayor concentración del estándar de ácido ascórbico, porque las variaciones en el porcentaje de desviación estándar relativa son mucho menores a diferencia de las bajas concentraciones, por tanto el porcentaje de error también es bajo.

Figura 8. Cromatogramas de cada uno de los estándar primario utilizados a diferentes concentraciones de Vitamina C



FUENTE: Autora

4.5. Determinación de la concentración de Vitamina C en cada una de las frutas estudiadas

La concentración de Vitamina C fue determinada en 32 frutas disponibles en el mercado colombiano; para ello fue necesario seleccionar las de mejor apariencia y calidad. El zumo de cada fruta fue extraído usando la metodología descrita en las secciones 3.2.1 y 3.2.2. Luego el contenido de vitamina C fue determinado utilizando la metodología descrita en la sección 3.2.2. A continuación, se presenta un ejemplo de los cálculos necesarios para determinar la cantidad de vitamina C.

La ecuación de la curva de calibración se puede expresar como:

$$y = bx + a \quad (14)$$

Se utilizó la metodología en la que se mantenía constante la concentración del analito y se adicionaban cantidades conocidas del estándar. De acuerdo a la literatura, la concentración de la muestra está dada por la ecuación 15.⁵⁴

$$C_x = \frac{aV_t}{bV_x} \quad (15)$$

C_x equivale a la concentración del zumo de fruta.

V_t equivale al volumen final de dilución.

V_x equivale al volumen adicionado de zumo de fruta.

a hace referencia al intercepto con el eje y .

b hace referencia a la pendiente de la recta de la curva de calibración.

Teniendo en cuenta lo anterior, el contenido de vitamina C en el noni equivale a:

$$y = 5890,1x + 160,56$$

$$C_x = \frac{160,56 * 50,00}{5890,1 * 1,00}$$

$$C_x = 1,360 \text{ mg/mL}$$

El análisis dimensional se muestra en la ecuación 16:

$$C_x = \frac{\cancel{\text{área}} \times \cancel{\text{mL}}}{\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times \cancel{\text{mL}}} = \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \quad (16)$$

Con base en los resultados obtenidos en cada una de las curvas de calibración realizadas para la determinación de vitamina C en las frutas de interés, se obtuvo la siguiente tabla con los valores obtenidos de la concentración de vitamina C en cada una de las 32 frutas exóticas.

Tabla 4. Contenido de HA encontrado en cada una de las 32 frutas exóticas analizadas.

Nombre común	Nombre científico, familia	Contenido de vitamina C en el zumo (mg/mL)
Anon	<i>Annona squamosa</i> , Annonaceae	No cuantificable
Arazá	<i>Eugenia stipitata</i> , Myrtaceae	0,182
Borojó	<i>Borojoa patinoi</i> , Rubiaceae	No cuantificable
Carambolo	<i>Averrhoa carambola</i> , Oxalidaceae	0,522
Cóngolo	<i>Couratari guianensis</i> , <i>Lecythidoideae</i>	0,109
Cidra	<i>Citrus limetta</i> , Rutaceae	0,238
Curuba	<i>Passiflora tarminiana</i> , <i>Passifloraceae</i>	0,810
Granadilla	<i>Passiflora ligularis</i> , Passifloraceae	0,197
Guama	<i>Inga edulis</i> , Fabaceae	No cuantificable
Guanábana	<i>Annona muricata</i> , Annonaceae	0,124
Guayaba	<i>Psidium guajava</i> , Myrtaceae	0,890
Guayaba pera	<i>Psidium guajava</i> spp., Myrtaceae	0,360
Icaco	<i>Chrysobalanus icaco</i> , <i>Chrysobalanaceae</i>	0,049
Limón	<i>Citrus limon</i> , Rutaceae	0,417
Lulo	<i>Solanum quitoense</i> , Solanaceae	0,043
Mamón	<i>Melicoccus bijugatus</i> , <i>Sapindaceae</i>	No cuantificable
Mandarina	<i>Citrus</i> sp., Rutaceae	0,308
Mangostino	<i>Garcinia mangostana</i> , Clusiaceae	No cuantificable
Maracuyá	<i>Passiflora edulis</i> , Passifloraceae	0,073
Marañón	<i>Anarcadium occidentale</i> , <i>Anarcadiaceae</i>	1,24
Melón	<i>Cucumis melo</i> , Cucurbitoideae	0,522
Mora	<i>Rubus</i> spp., Rosaceae	0,123
Moringa	<i>Moringa ovalifolia</i> , Moringaceae	No cuantificable
Naranja	<i>Citrus sinensis</i> , Rutaceae	0,452
Noni	<i>Moringa citrifolia</i> , Rubiaceae	1,36
Piña	<i>Bromelia ananas</i> , Bromeliáceas	0,321
Pitaya	<i>Hylocereus trigonus</i> , Cactaceae	0,019
Pomarrosa	<i>Eugenia malaccensis</i> , Myrtaceae	0,067
Sandia	<i>Citrullus lanatus</i> , Cucurbitaceae	0,050
Tamarindo	<i>Tamarindos indica</i> L., Papilionacea	No cuantificable
Tomate de árbol	<i>Solanum betaceum</i> , Solanaceae	0,223

Continúa en la siguiente página . . .

Tabla 4. Contenido de HA encontrado en las 32 frutas analizadas (**Continuación**)

Nombre común	Nombre científico, familia	Contenido de vitamina C en el zumo (mg/mL)
Uchuva	<i>Physalis peruviana</i> , <i>Solanaceae</i>	0,425

4.6. Tratamiento de aguas contaminadas con cromo utilizando dos zumos de frutas con alto contenido de Vitamina C

En la tercera parte del proyecto, fueron escogidas las dos frutas con mayor contenido de vitamina C para la reducción química de cromo hexavalente en aguas contaminadas. Como modelo de agua contaminada se utilizó una solución de $K_2Cr_2O_7$ a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$. Fueron seleccionadas el noni y el marañón teniendo en cuenta los altos contenidos de vitamina C y que no tienen una alta demanda para consumo humano.

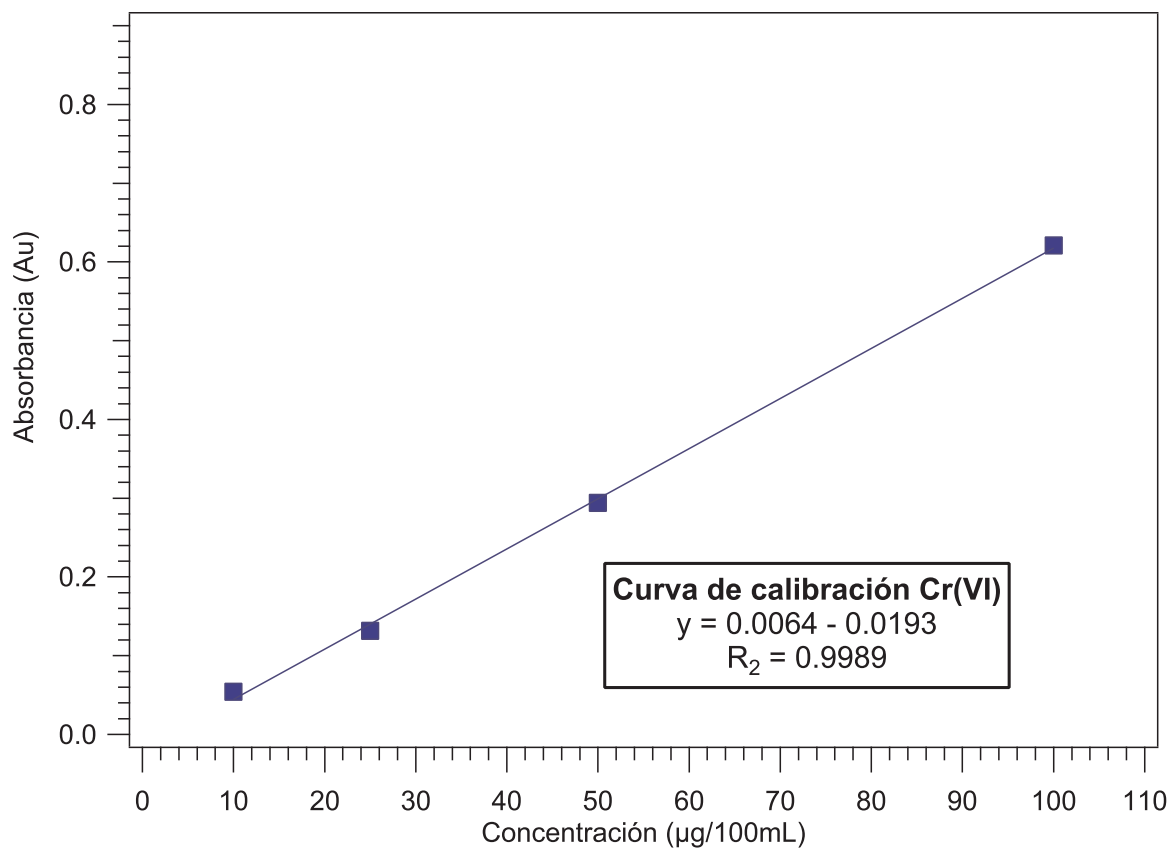
Para este paso, se utilizó un método colorimétrico para la determinación de cromo en agua natural o tratada (*Method 3500-Cr/colorimetric method, Standard for examination water and wastewater*).⁴⁸ El cromo hexavalente fue calculado colorimétricamente por la reacción con la 1,5-difenilcarbazida en solución ácida a una longitud de onda de 540 nm. Las condiciones del método se expresan en el siguiente cuadro 2:

Cuadro 2. Condiciones del método colorimétrico para la determinación de Cr(VI)

Parámetro	Condiciones
Rango de determinación de cromo (VI) en un agua natural o tratada	Desde 100 hasta 1000 $\mu\text{g/L}$
Longitud de onda	540 nm
Preparación de la curva de calibración	Fueron utilizados soluciones estándar de $K_2Cr_2O_7$ en el rango de 100 - 1000 $\mu\text{g/L}$ de Cr(VI)
Tratamiento de la muestra	Si sólo se desea medir el Cr(VI), el análisis comienza dentro de las 24 horas de colección de la muestra
Desarrollo del color y medición	Fue utilizada una solución de 1,5 –difenilcarbazida para el desarrollo del color y luego medida la absorbancia de cada una de las soluciones a la longitud de onda de referencia

Teniendo en cuenta lo anterior, inicialmente fue realizada una curva de calibración con las soluciones estándar de $K_2Cr_2O_7$ para así determinar el contenido de Cr(VI) presente.

Figura 9. Curva de calibración del Cr(VI)



FUENTE: Autora

Teniendo en cuenta la anterior curva de calibración, se utilizó el procedimiento descrito en la sección 3.3.1 para determinar el contenido de cromo presente según la adición con un estándar de vitamina C, luego se utilizó la misma metodología utilizando zumos de noni y marañón como frutas de interés; en estos casos se cuantificó la vitamina C como se describe en la sección 3.2.

4.6.1. Titulación de cromo Cr(VI) utilizando un estándar primario de Vitamina C

Para esta parte del proyecto fue preparada una solución estándar de 20 µg/mL de Cr(VI). De esta solución se transfirieron alícuotas de 10,00 mL en 10 vasos plásticos; luego se añadieron volúmenes en el rango de (1–9) mL de una solución de vitamina C (0,25 mg/mL). La muestra fue tratada según el método colorimétrico 3.3.1 y se obtuvieron los siguientes resultados que se observan en la Figura 10 y la Tabla 5:

Tabla 5. Resultados obtenidos de la titulación de Vitamina C en 10 muestras de Cr(VI)

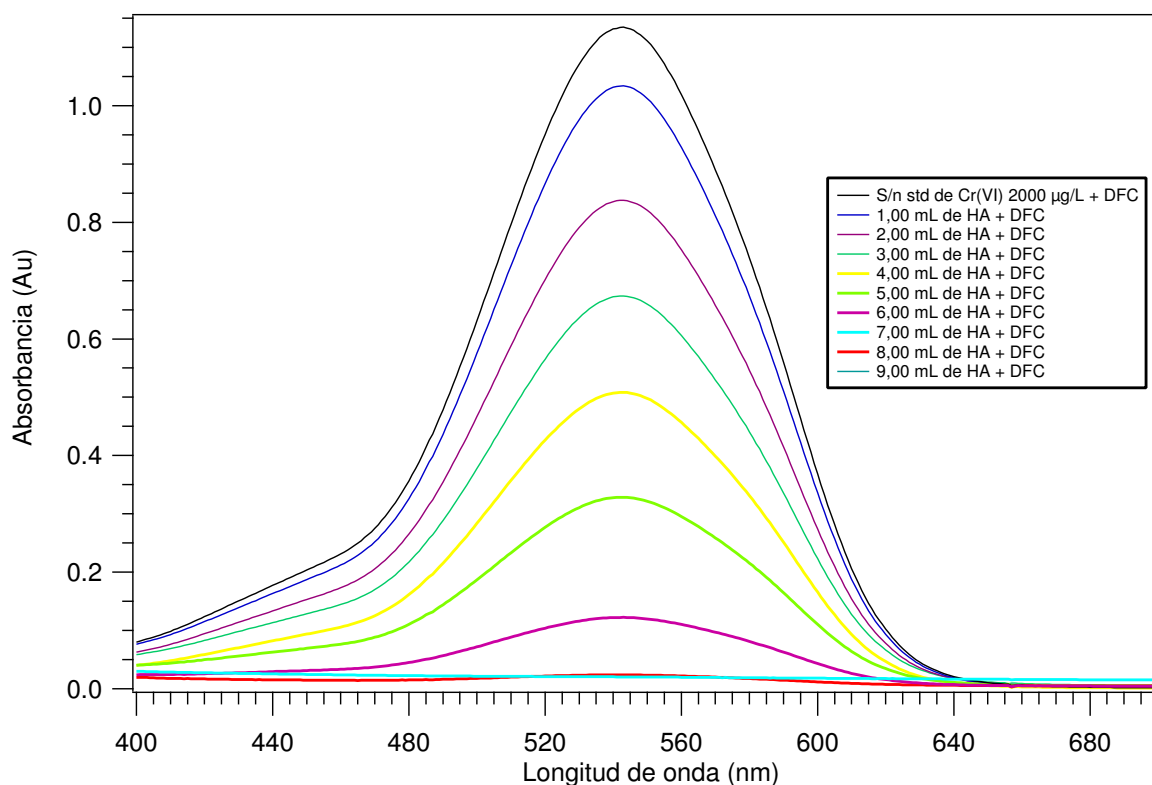
Volumen adicionado de Vitamina C (mL)	Absorbancia (Au)	Contenido de cromo vitamina C en el zumo µg	Concentración de Cr(VI) mg/L
Solución estándar de Cr(VI) 2000 µg/L	1,131	173,8	17,38
1,00	1,070	164,2	16,42
2,00	0,755	114,9	11,49
3,00	0,620	93,86	9,386
4,00	0,428	63,81	6,381
5,00	0,288	41,98	4,198
6,00	0,080	9,484	0,948
7,00	0,009	Por debajo del LC	No cuantificable
8,00	0,001	Por debajo del LC	No cuantificable
9,00	0,001	Por debajo del LC	No cuantificable

Pendiente por corregir Con base en los resultados obtenidos, partiendo de una solución de Vitamina C 0,38 mg/mL;

$$0,25 \text{ mg/mL} * 7,00 \text{ mL} = 1,70 \text{ mg} \quad (17)$$

$$= \frac{1750 \text{ µg de HA}}{200 \text{ µg de Cr(VI)}} \quad (18)$$

Figura 10. Gráfica de reducción de Cr(VI) a Cr(III) utilizando una solución de Vitamina C + Difenilcarbazida



FUENTE: Autora

4.6.2. Titulación de Cr(VI) utilizando una solución del zumo de noni (*Moringa citrifolia*)

Se pesaron 206,38 g de noni, de los cuales fueron obtenidos 150 mL de zumo utilizando presión manual. La vitamina C presente en el zumo obtenido fue cuantificado por HPLC utilizando la metodología descrita en la sección 3.2. La ecuación 19 corresponde la ecuación de correlación de la curva de calibración y se empleó para determinar la concentración de vitamina C en noni y se obtuvo una concentración de 1,22 mg/mL como se observan en las ecuaciones 20 y 21. Para tener una concentración similar a la empleada con el estándar de vitamina C, se hizo una dilución al zumo de noni de 1:4 (como se observa en la ecuación 22), obteniendo una concentración de 0,305 mg/mL.

$$y = bx + a \quad (19)$$

$$y = 5999,4x + 146,29$$

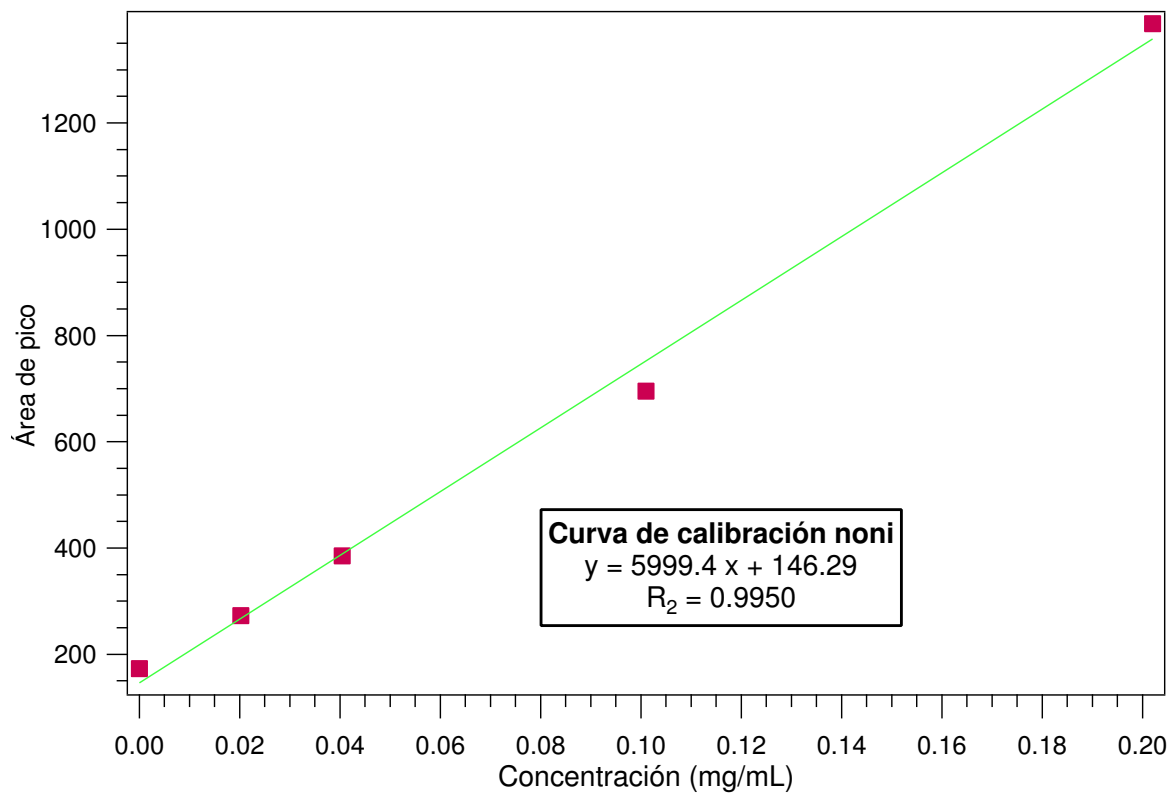
$$C_x = \frac{146,29 * 50,00}{5999,4 * 1,00} \quad (20)$$

$$C_x = 1,22 \text{ mg/mL} \quad (21)$$

$$1,22 \text{ mg/mL} * \frac{25,0 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} = 0,305 \text{ mg/mL} \quad (22)$$

Siguiendo el mismo procedimiento utilizado en la sección anterior, se realizó una titulación con zumo de noni utilizando una solución estándar de 20 µg/mL de Cr(VI); se prepararon 11 alícuotas de 10 mL en 11 vasos plásticos; a cada una de las alícuotas fueron adicionados volúmenes de 0; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,00; 9,00 y 10,00 mL de una solución de zumo de noni. Las muestras fueron tratadas según el método colorimétrico 3.3.1.

Figura 11. Curva de calibración del noni



FUENTE: Autora

Luego, la cantidad de vitamina C presente en el zumo de noni que reduce los 200 μg presentes en la solución, se determinó al multiplicar el volumen adicionado de la solución de zumo de noni por la concentración utilizada en la reacción:

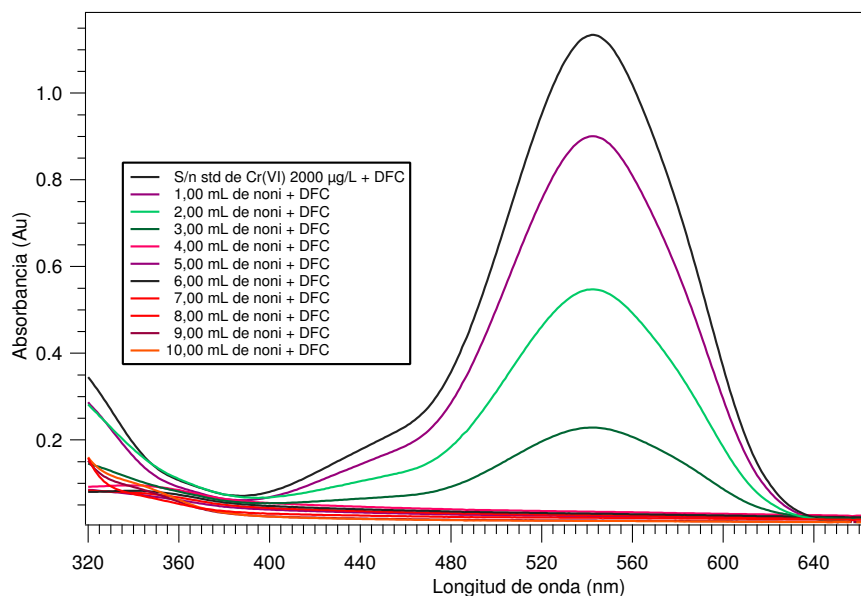
$$0,305 \text{ mg/mL} * 4,00 \text{ mL} = 1,22 \text{ mg} \quad (23)$$

$$= \frac{1220 \mu\text{g de HA}}{200 \mu\text{g de Cr(VI)}} \quad (24)$$

Tabla 6. Resultados obtenidos de la titulación de zumo de noni (*Moringa citrifolia*) en 10 muestras de Cr(VI)

Volumen adicionado de Vitamina C (mL)	Absorbancia (Au)	Contenido de cromo vitamina C en el zumo de noni (µg)	Concentración de Cr(VI) (mg/L)
Solución estándar de Cr(VI) 2000 µg/L	1,131	173,8	17,38
1,00	0,886	135,4	13,07
2,00	0,460	68,93	10,20
3,00	0,274	39,80	6,892
4,00	0,015	Por debajo del LC	No cuantificable
5,00	0,014	Por debajo del LC	No cuantificable
6,00	0,012	Por debajo del LC	No cuantificable
7,00	0,005	Por debajo del LC	No cuantificable
8,00	0,003	Por debajo del LC	No cuantificable
9,00	0,002	Por debajo del LC	No cuantificable
10,00	0,000	Por debajo del LC	No cuantificable

Figura 12. Gráfica de reducción de Cr(VI) utilizando una solución de zumo de noni (1:4) y una solución de difenilcarbazida



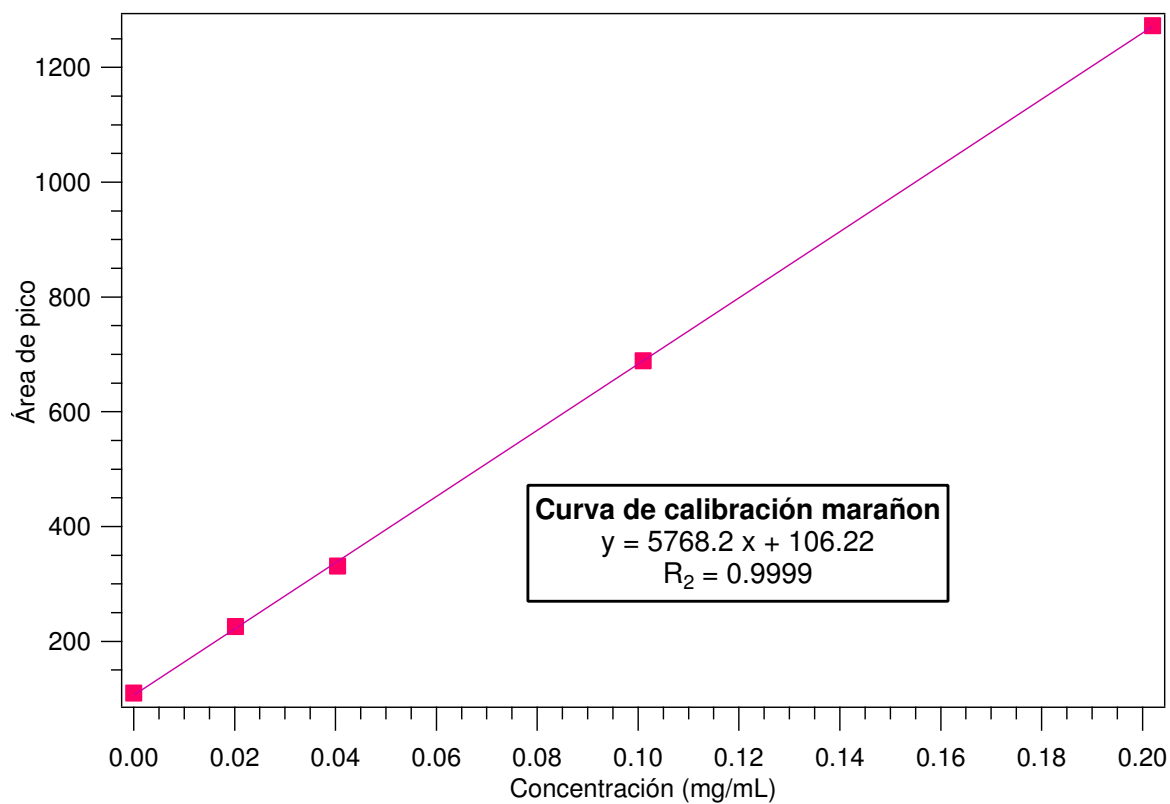
FUENTE: Autora

4.6.3. Titulación de Cr(VI) utilizando una solución del zumo de marañon (*Anacardium occidentale*)

Teniendo en cuenta el procedimiento anterior con el noni, se realizó una titulación con zumo de marañon. Se pesaron 145,79 g de fruta, de los cuales fueron obtenidos mediante presión manual 110 mL de zumo. El zumo anterior fue cuantificado por HPLC empleando la metodología 3.2 y según la curva de calibración realizada como se observa en la Figura 13, se obtuvo una concentración de 0,920 mg/mL de Vitamina C. Para tener una concentración similar a la empleada con el estándar de vitamina C, se hizo una dilución al zumo de noni de 1:4, obteniendo una concentración de 0,230 mg/mL.

Al igual que el estándar de Vitamina C, se realizó una titulación con zumo de marañon utilizando una solución estándar de 20 µg/mL de Cr(VI); se prepararon 11 alícuotas de 10 mL en 11 vasos plásticos; a cada una de las alícuotas fueron adicionados volúmenes de 0; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,00; 9,00 y 10,00 mL de una solución de zumo de marañon (0,230 mg/mL). Las muestras fueron tratadas según el método colorimétrico 3.3.1 y fueron obtenidos los siguientes resultados que se presentan a continuación:

Figura 13. Curva de calibración del marañón



FUENTE: Autora

Utilizando la ecuación de la recta (19) se determinó la concentración de Vitamina C presente en el zumo de marañón:

$$y = bx + a \quad (25)$$

$$y = 5768,2x + 106,22$$

La ecuación de concentración por el método de adición estándar (15) es usada para determinar la concentración de Vitamina C en el zumo de marañón:

$$C = \frac{aV_t}{bV_x} \quad (26)$$

$$C_x = \frac{106,22 * 50,00}{5768,2 * 1,00} \quad (27)$$

$$C_x = 0,920 \text{ mg/mL} \quad (28)$$

Para lograr que la concentración del marañón fuera similar a la empleada por la vitamina C como se observa en la metodología 4.6 fue necesario hacer una dilución 1:4 de la concentración del zumo de marañón en agua como se presenta a continuación:

$$0,920 \text{ mg/mL} * \frac{25,0 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} \quad (29)$$

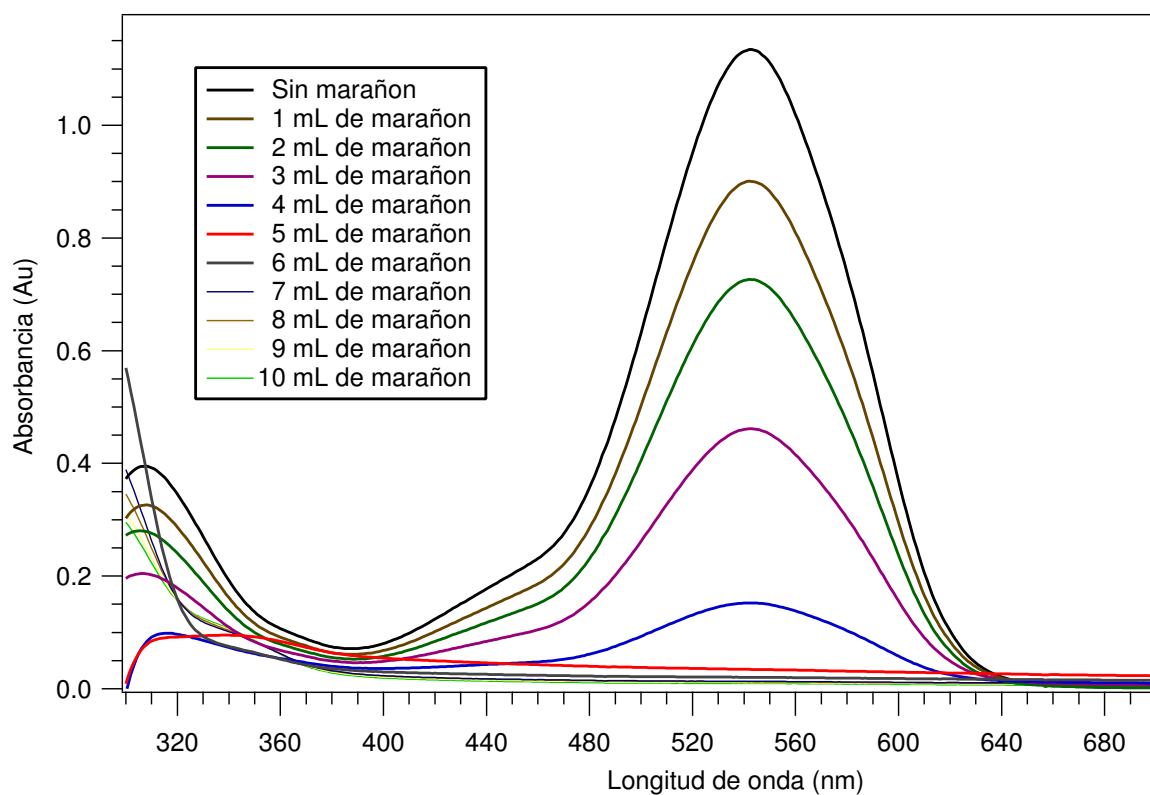
$$0,230 \text{ mg/mL} * 6,00 \text{ mL} = 1,38 \text{ mg} \quad (30)$$

$$= \frac{1380 \text{ } \mu\text{g de HA}}{200 \text{ } \mu\text{g de Cr(VI)}} \quad (31)$$

Tabla 7. Resultados obtenidos de la titulación de zumo de marañón (*Anacardium occidentale*) en 10 muestras de Cr(VI)

Volumen adicionado de Vitamina C (mL)	Absorbancia (Au)	Contenido de cromo vitamina C en el zumo de marañón (μg)	Concentración de Cr(VI) (mg/L)
Sin marañón	1,131	173,8	17,38
1,00	0,898	137,4	13,73
2,00	0,672	102,0	10,20
3,00	0,460	68,92	6,892
4,00	0,152	20,74	2,074
5,00	0,024	0,815	0,081
6,00	0,018	0	0
7,00	0,012	0	0
8,00	0,004	0	0
9,00	0,003	0	0
10,00	0,002	0	0

Figura 14. Gráfica de reducción de Cr(VI) utilizando una solución del zumo de marañón (1:4) y una solución de difenilcarbazida



FUENTE: Autora

4.6.4. Tabla comparativa de la vitamina C, utilizando el estándar primario de vitamina C, una solución de zumo de noni y una de marañón

Tabla 8. Resultados obtenidos de los agentes reductores utilizados para la reducción química de 200 µg de Cr(VI)

Agente reductor	Concentración del agente reductor (mg/mL)	Volumen adicionado de vitamina C del agente reductor (mL)	Contenido de vitamina C utilizado por el agente reductor (µg)
Estándar de vitamina C	0,250	7,00	1750
Solución de zumo de noni	0,305	4,00	1220
Solución de zumo de marañón	0,230	6,00	1380

4.6.5. Utilización de la Norma para Cr(VI) en aguas contaminadas según el Decreto 3930 de 2010

Según el Decreto 3930 de 2010 fue expedida la **Resolución No. 0631 del 17 de marzo de 2015** *"por la cual se establecen los parámetros y los valores máximos permisibles en los vertimientos puntuales a cuerpos de aguas superficiales y a los sistemas de alcantarillado público y se dictan otras disposiciones finales"*.

Dentro de esta resolución se expresan los valores permisibles para el Cr(VI) en los diferentes tipos de vertimientos puntuales de aguas residuales. En este caso fueron tenidos en cuenta los valores permisibles para Cr(VI) los vertimientos puntuales de aguas residuales no domésticas a cuerpos de agua superficiales y al alcantarillado público y también los valores permisibles para Cr(VI) en los vertimientos puntuales de aguas residuales no domésticas a los cuerpos de aguas superficiales de actividades asociadas con la fabricación y manufactura de bienes, teniendo en cuenta los valores máximos que deben manejar en sus vertimientos las curtiembres de cuero y la industria que maneja cromados para sus diferentes actividades. Los valores permisibles que expresa la resolución en ambos casos es de 0,50 mg/L, sólo en la industria que maneja la fabricación del curtido y adobo de pieles expresa valores permisibles de 1,50 mg/L de Cr(VI).⁵⁵

Con base en lo anterior, citando un ejemplo de agua contaminada con cromo (VI),⁵⁶ se encontraron los siguientes resultados de aguas residuales industriales que contienen Cr(VI):

Tabla 9. Aguas residuales industriales que contienen Cr(VI)⁵⁶

Industria	Concentración de Cr(VI) (mg/L)
Fabricantes de computadores	60,0 ⁵⁷
Fábrica de curtido de cromo	3,7 ⁵⁸
Planta de cromados	42,8 ⁵⁹
Planta de curtiembre	3950,0 ⁶⁰
Planta de curtiembre	100,0 ⁶¹

Teniendo en cuenta los valores anteriores, en el caso de la planta de curtiembre fue tomado como ejemplo el valor de 100,0 mg/L de Cr(VI):
utilizando la concentración del zumo de noni, se estimará la cantidad necesaria de vitamina C para reducir el valor obtenido del agua residual en una planta de curtiembre como se observa en la ecuación 32:

$$100,0 \text{ mg de Cr(VI)/L} \times \frac{1,22 \text{ mg de HA}}{0,2 \text{ mg de Cr(VI)}} \times \frac{1 \text{ mL de zumo de noni}}{1,22 \text{ mg de HA}} \times \frac{206,38 \text{ g de pulpa de noni}}{150 \text{ mL de zumo de noni}} = 687,9 \text{ g/L de pulpa de noni} \quad (32)$$

Se realizó el mismo cálculo para determinar la cantidad de marañón que se necesita para reducir 100,0 mg/L de Cr(VI)

$$100,0 \text{ mg de Cr(VI)/L} \times \frac{1,38 \text{ mg de HA}}{0,2 \text{ mg de Cr(VI)}} \times \frac{1 \text{ mL de zumo de marañón}}{0,920 \text{ mg de HA}} \times \frac{145,79 \text{ g de pulpa de noni}}{110 \text{ mL de zumo de marañón}} = 994,0 \text{ g/L de pulpa de marañón} \quad (33)$$

La relación indica que por cada mg de Cr(VI) se necesita entre 6 a 9 veces la cantidad de vitamina C para reducir completamente el Cr(VI) y convertirlo en Cr(III), cumpliendo así con la normatividad para vertimientos en aguas contaminadas que contienen Cr(VI). Esto depende del contenido de vitamina C en cada una de las frutas y en el volumen obtenido del zumo de fruta. En este caso es más viable utilizar el zumo de noni para la reducción química de Cr(VI) por su alto contenido de vitamina C y de otros antioxidantes que también participan en la reducción de Cr(VI) a Cr(III).

5. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, se puede concluir que:

La utilización de zumos de frutas con alto contenido de Vitamina C principalmente noni y marañón, es una opción amigable con el medio ambiente para la reducción química de Cr(VI) a Cr(III) ya que los costos son mínimos, las frutas se encuentran fácilmente en varias regiones del país y estas muchas veces son desechadas donde no tienen un uso en el medio ambiente o a la cadena alimenticia.

Es importante tener presente al momento de realizar un análisis de vitamina C cuantificar la fruta, debido a que por efectos de las condiciones ambientales y la forma de extracción del zumo, existen cambios significativos en los contenidos de Vitamina C presente en cada una de las frutas analizadas.

Cabe resaltar la importancia de las frutas de interés para este tipo de análisis, principalmente del zumo de noni, porque es una de las frutas con mayor contenido de vitamina C que puede reducir determinadas cantidades de Cr(VI) sin generar cambios significativos en la producción de materia orgánica a los cuerpos de agua ni alterar el oxígeno disuelto en la misma, por tanto es una alternativa ecológica, económica y sostenible para el medio ambiente.

6. DIVULGACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados fueron divulgados por presentación oral en la 249th *American Chemical Society National Meeting and Exposition*, realizada en Denver CO, por la *American Chemical Society (ACS)*, el pasado mes de marzo los días 22 al 26 del año en curso (2015).

Por otra parte, los resultados serán divulgados en la revista internacional *Environmental Science and Technology*, revista que tiene la ACS y de la cual se piensa enviar el artículo en los próximos días.

BIBLIOGRAFÍA

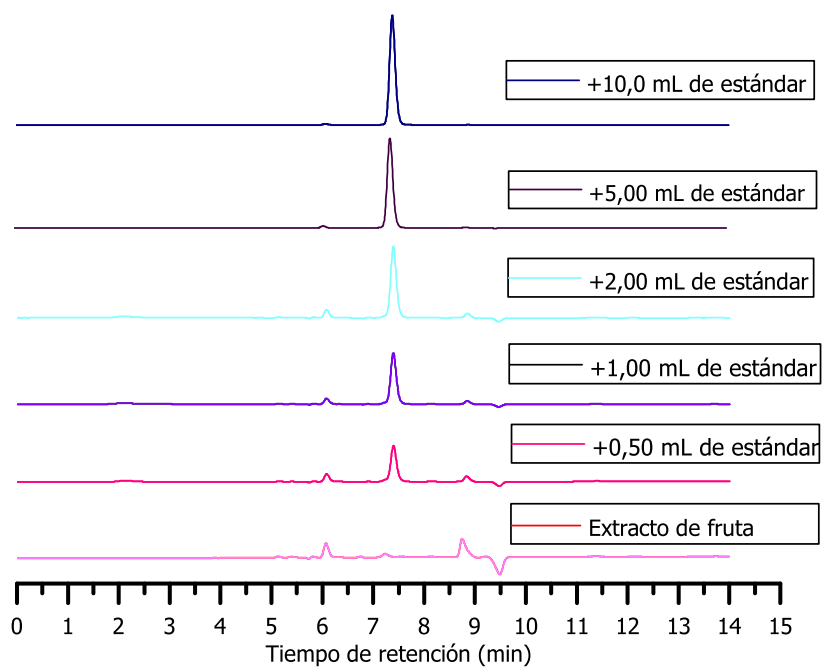
1. Halliwell, B. *Adv. Pharmacol.* **1996**, Volume 38, ed. por Sies, H., 3-20.
2. Rodríguez, F., *Biotecnología ambiental*; Tebar: 2005.
3. Millen, P. en *Encyclopedia of Forensic Sciences*, Houck, J. A. S. P. J. S. M., ed.; Academic Press: Waltham, 2013, págs. 337-340.
4. Ruiz, S.; Alonso, I. y Quintanilla, D., *Análisis Instrumental*; Bello, L., ed.; Análisis Instrumental, vol. 1; Netbiblo: 2009.
5. Primo Yufera, E., *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria*; Primo Yufera, E., ed.; Colección Sophia, vol. 2; Reverté: 1995.
6. Zúñiga, F., *Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados*; de Yucatán, U. A., ed.; Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados v. 1; Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán: 1999.
7. Ramos Miras, J. J. Estudio de la contaminación por metales pesados y otros procesos de degradación química en los suelos en los invernaderos del poniente almeriense., Tesis doct., Universidad de Almería, 2009.
8. Hill, J. y Kolb, D., *Química para el nuevo milenio*; Roxana, M.-L., ed.; Prentice-Hall: 1999; vol. 1.
9. Restrepo, N., *Diccionario Ambiental*; Ediciones, E., ed.; Coleccion Textos Universitarios, vol. 1; Ecoe Ediciones: 2007.
10. Jr., G. F. C. en *The Vitamins*, Combs, G. F., ed., Fourth Edition; Academic Press: 2012, págs. 3 -6.
11. Spitzer, V. y Haller, U. en *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*, Poole, P. W. T., ed., Second Edition; Elsevier: Oxford, 2005, págs. 147 -159.
12. Cheung, K. y Gu, J.-D. *Int. Biodeter. Biodegr.* **2007**, 59, 8 -15.
13. Xu, X.-R.; Li, H.-B.; Li, X.-Y. y Gu, J.-D. *Chemosphere* **2004**, 57, 609 -613.
14. Carl, D. P. y Puls, R. W. *EPA Ground Water Issue - United States Environmental Protection Agency* **1994**, 1-12.
15. Zúmreoglu-Karan, B *Coord. Chem. Rev.* **2006**, 250, 2295-2307.
16. Wielinga, B.; Mizuba, M. M.; Hansel, C. M. y Fendorf, S. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, 35, PMID: 11351723, 522-527.
17. Yurkow, E. J. y et al. *Environ. Pollut.* **2002**, 117, 1-3.
18. Marqués, M. J.; Salvador, A.; Morales-Rubio, A. y de la Guardia, M. *J. Anal. Chem.* **2000**, 367, 601-613.
19. Kalidhasan, S. y Rajesh, N. *J. Hazard. Mater.* **2009**, 170, 1079-1085.

20. Becker, N. y et al. *Br. J. Ind. Med.* **1991**, 48, 675-683.
21. Safety, O. y Administration, H. *Occupational exposure to hexavalent chromium: final rule*; Final rules 71:10099-10385; United States Department Of Labor, 2006.
22. Cheryl Martín; Boone, D. R. y Carl, D. P. *Environ. Sci. Eng.* 191-204.
23. Chabukdhara, M. y Nema, A. K. *Chemosphere* **2012**, 87, 945 -953.
24. El-Latif, M. A. y Elkady, M. *Desalination* **2010**, 255, 21 -43.
25. Jiang, W.; Pelaez, M.; Dionysiou, D. D.; Entezari, M. H.; Tsoutsou, D. y O'Shea, K. *Chem. Eng. J.* **2013**, 222, 527-533.
26. Chemicals, M. K. Ficha de Seguridad, ácido ascórbico.; 2012.
27. Harris, D. C., *Quantitative Chemical Analysis*, 8.^a ed.; Freeman, W. H. y Company, eds.; Clancy Marshall: 2010; vol. 1.
28. Aguirre, A. y Borneo, R. en *Bioactive Food as Dietary Interventions for Liver and Gastrointestinal Disease*, Preedy, V. y Ross, W. R., eds.; Academic Press: 2013; cap. 34, págs. 527 -535.
29. Valbuena, A. O. y et al., *Estudio sobre el contenido en flavonoides de las mieles de La Alcarria: su aplicación a la caracterización geográfico-botánica*; CSIC, ed.; Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha: 1994.
30. Aherne, S. y O'Brien, N. *Nutrition* **2002**, 18, 75-81.
31. Magiera, S.; Baranowska, I. y Lautenszleger, A. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, 102, 468 -475.
32. Sandmann, G. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, 385, 4 -12.
33. Zaripheh, S. y Jr., E. *J. Nutr* **2002**, 132, 531-534.
34. Salman, S. L. Analysis of ascorbic acid, citric acid and benzoic acid in orange juice.; 2011.
35. Pettine Mauricio; Campanella, L. y Millero, F. J. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, 36, 901-907.
36. Miller, J. C. y Miller, J. N. en, Iberoamericana, A. W., ed., 2.^a ed.; Addison Wesley Iberoamericana: 1993; cap. Capítulo 5: Errores en análisis instrumental; regresión y correlación, págs. 104-107.
37. Valente, A.; Albuquerque, T. G.; Sanches-Silva, A. y Costa, H. S. *Food Res. Int.* **2011**, 44, 2237-2242.
38. De Quirós, A. R.-B.; Fernández-Arias, M. y López-Hernández, J. *Food Chem.* **2009**, 116, 509 -512.
39. Pénicaud, C.; Peyron, S.; Bohuon, P.; Gontard, N. y Guillard, V. *Food Res. Int.* **2010**, 43, 838 -847.

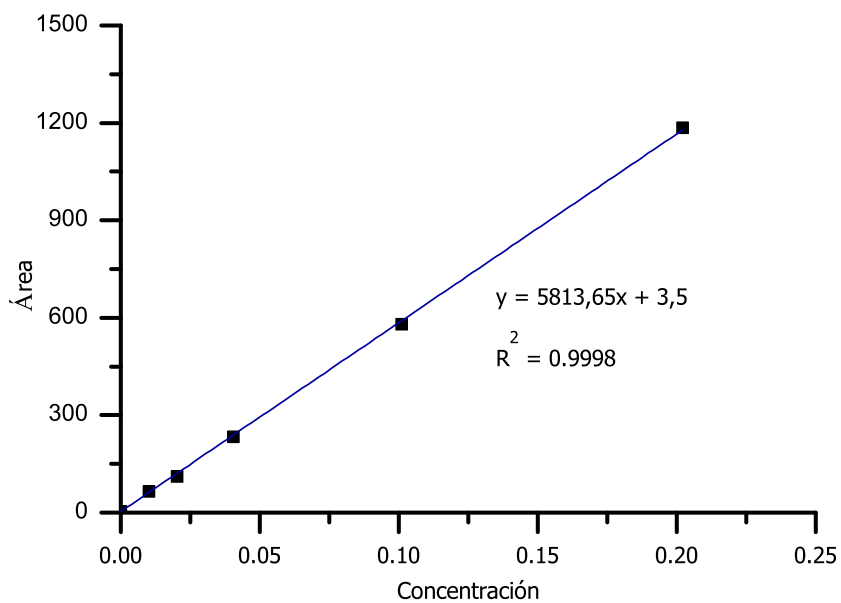
40. Sun, H.-f.; Li, Y.-h.; Ji, Y.-f.; Yang, L.-s.; Wang, W.-y. y Li, H.-r. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* **2010**, *20*, 308-314.
41. Kim, C.; Zhou, Q.; Deng, B.; Thornton, E. C. y Xu, H. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 2219-2225.
42. Thornton, E. C. y Amonette, J. E. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 4096-4101.
43. Eary, L. E. y Rai, D. *Environ. Sci. Technol.* **1988**, *22*, 972-977.
44. Fendorf, S. E. y Li, G. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 1614-1617.
45. Buerge, I. J. y Hug, S. J. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*, 1426-1432.
46. Novakova, L.; Solich, P. y Solichova, D. *TrAC. Trends. Anal. Chem.* **2008**, *27*, 942 -958.
47. Van Deemter, J.; Zuiderweg, F. y Klinkenberg, A. *Chem. Eng. Sci.* **1956**, *5*, 271 -289.
48. Andrew, D. E. y et al. en, Mary, A. H. F., ed., 21.^a ed.; American Public Health Association: 2005; cap. Part 3000: metals. Págs. 3-104, 3-106; 3-67,3-68.
49. Harris, D. y Navarro, V. en, Navarro, V. B., ed., 3.^a ed.; Reverté: 2007; cap. 23: introducción a las separaciones analíticas, págs. 567-569.
50. Currie, L. A. en *IUPAC Recommendations*; 10; Chemical Science, Technology Laboratory, National Institute of Standards y Technology: 1995; vol. 67, págs. 1699 -1723.
51. Long, G. L. y Winefordner, J. D. *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 712 -724 A.
52. Technologies, A. Evaluating System Suitability CE, GC, LC and A/D ChemStation Revisions: A. 03.0x - A.08.0x., 2010.
53. Burgess, C., *Valid Analytical Methods and Procedures*, 1st; The Royal Society of Chemistry: 2000.
54. Bader, M. *J. Chem. Educ.* **1980**, *57*, 702-705.
55. De Ambiente y Desarrollo Sostenible, M. Resolución 0631 del 17 de marzo de 2015.; 2015.
56. Owlad, M. y et al. *Water Air Soil Pollut.* **2008**, *200*, 59 -77.
57. Xu, Y. y et al. *J. Zhejiang Uni. Sci.* **2005**, *6*, 574 -579.
58. Gupta, V.; Mohan, D.; Sharma, S. y Park, K. *Environmentalist* **1998**, *19*, 129-136.
59. Davis, A. y et al. en *In. Sengupta, Arup K. Proceedings of the Twenty-Seventh Mid-Atlantic Industrial Waste Conference: hazardous and industrial wastes*. Lancaster, Technomic Publishing: 1995, págs. 62-71.
60. Esmaeili, A. y et al. *Am. J. Applied Sci.* **2005**, *2*, 1471-1473.
61. Song, Z y et al. *Water Res.* **2000**, *34*, 2171 -2176.

ANEXOS

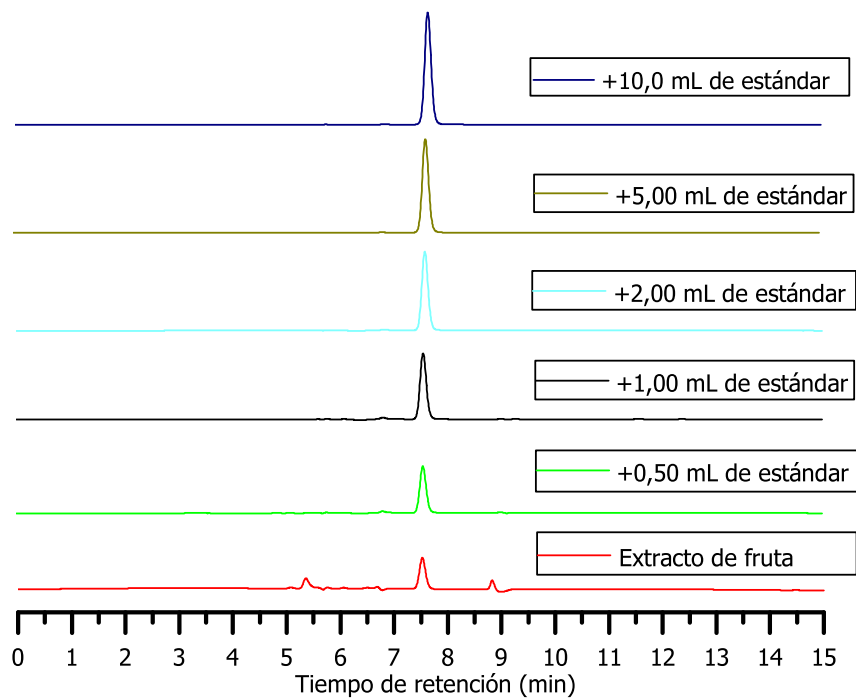
Anexo 1. Cromatogramas de la fruta anón



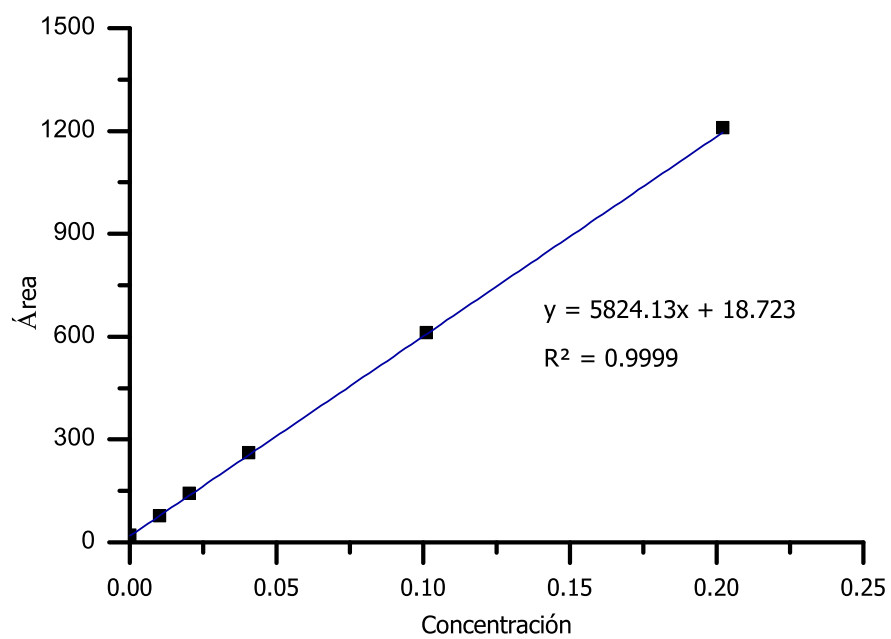
Anexo 2. Curva de calibración de la fruta anón



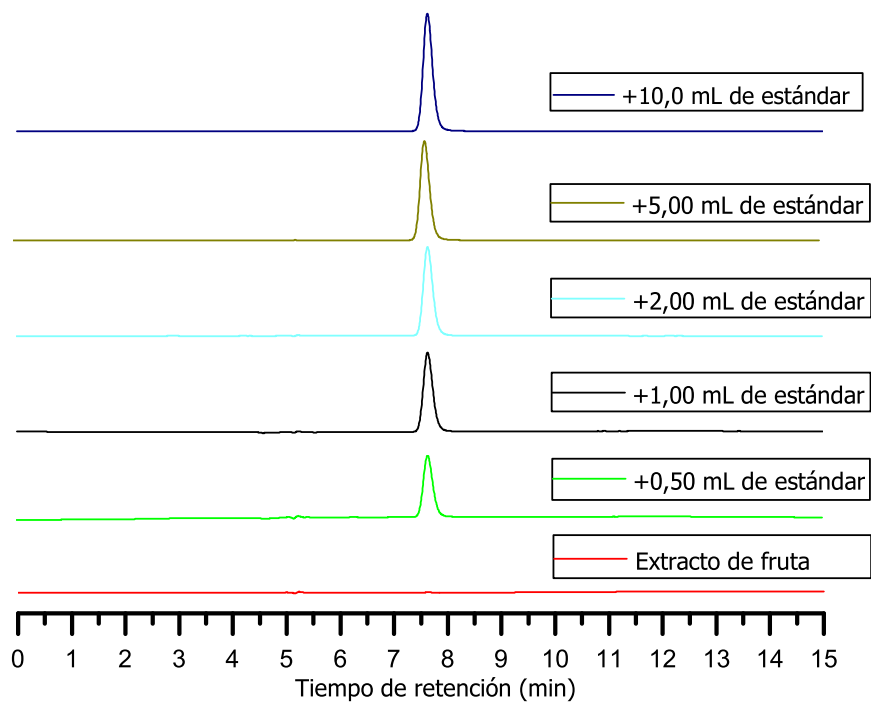
Anexo 3. Cromatogramas de la fruta arazá



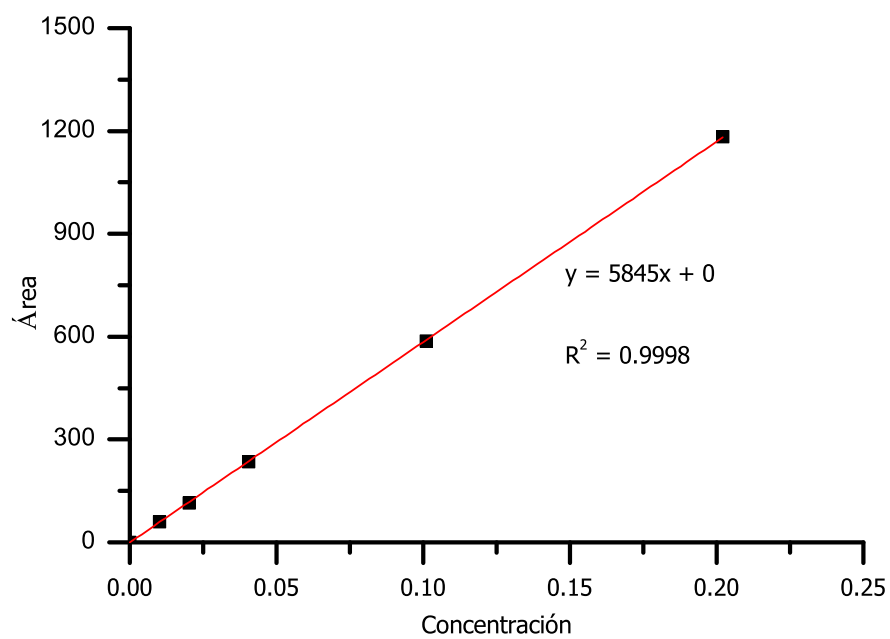
Anexo 4. Curva de calibración de la fruta arazá



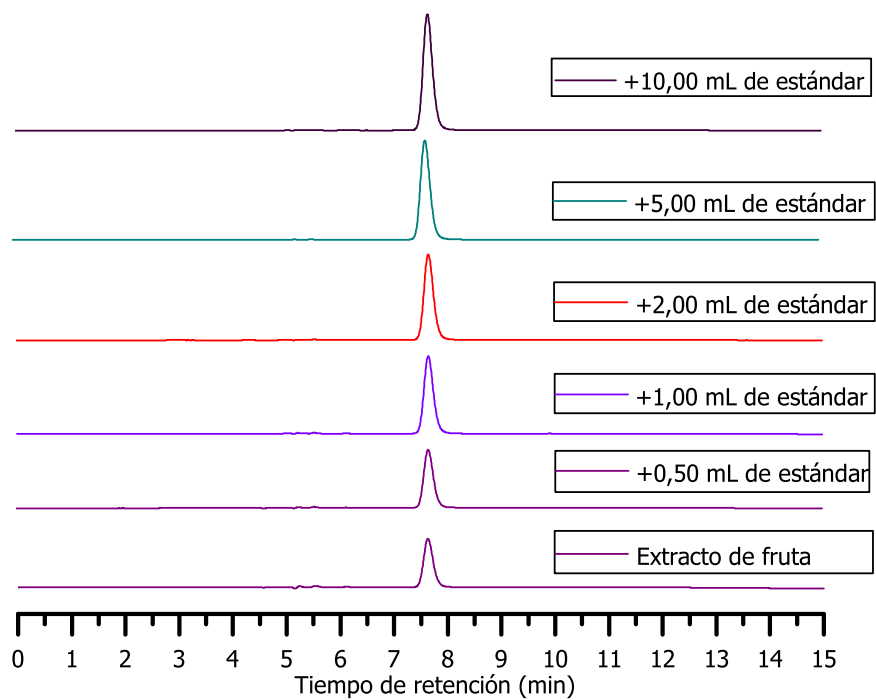
Anexo 5. Cromatogramas de la fruta borojó



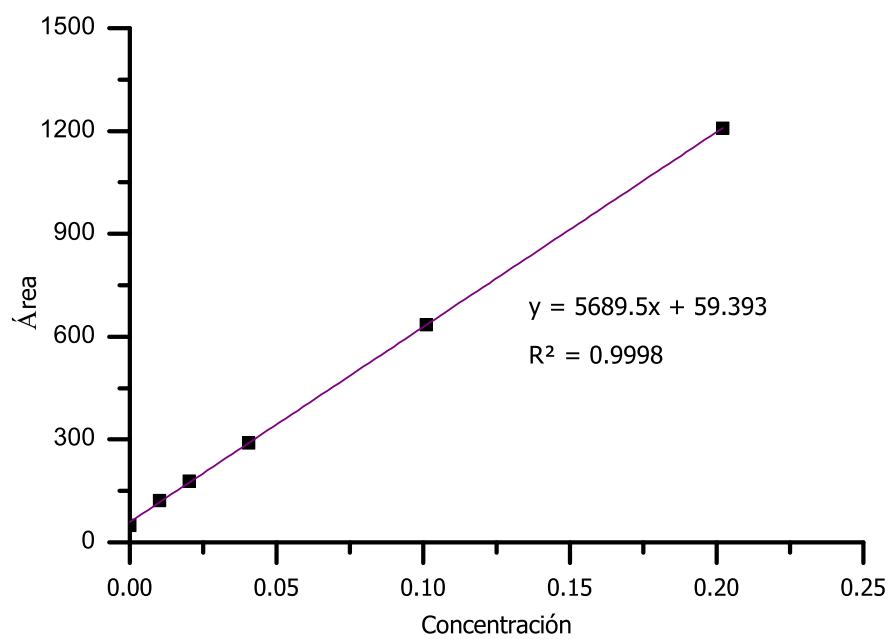
Anexo 6. Curva de calibración de la fruta borojó



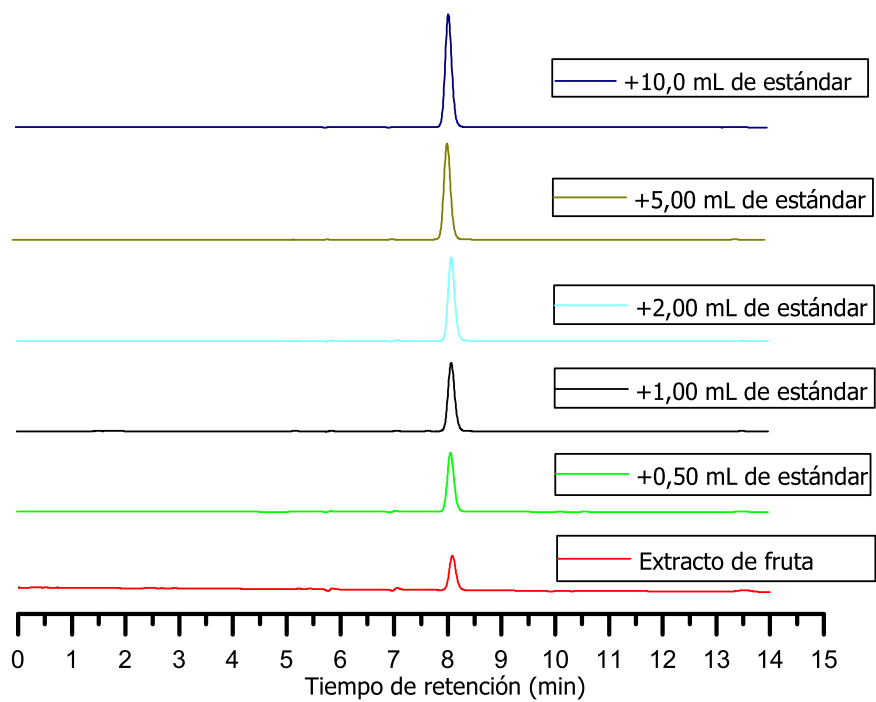
Anexo 7. Cromatogramas de la fruta carambolo



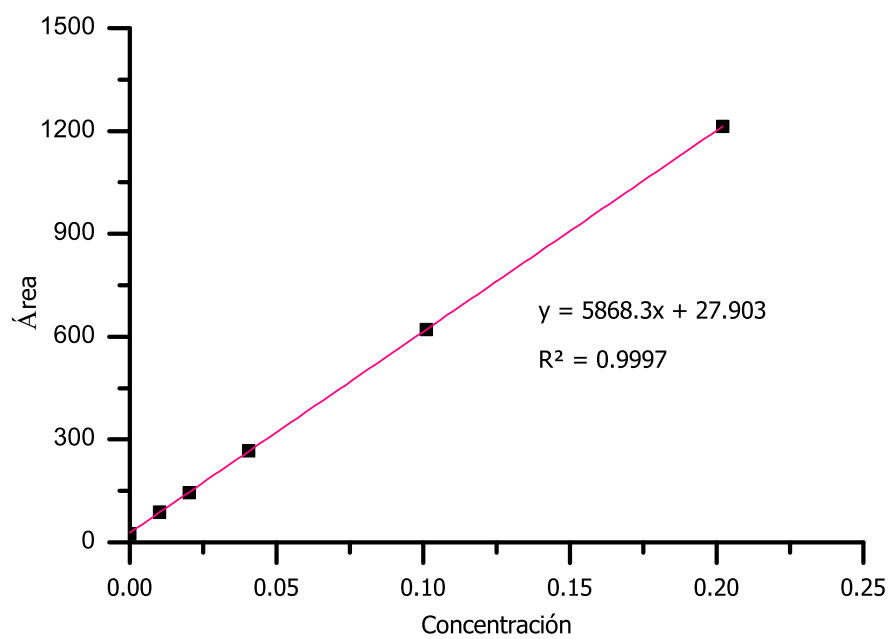
Anexo 8. Curva de calibración de la fruta carambolo



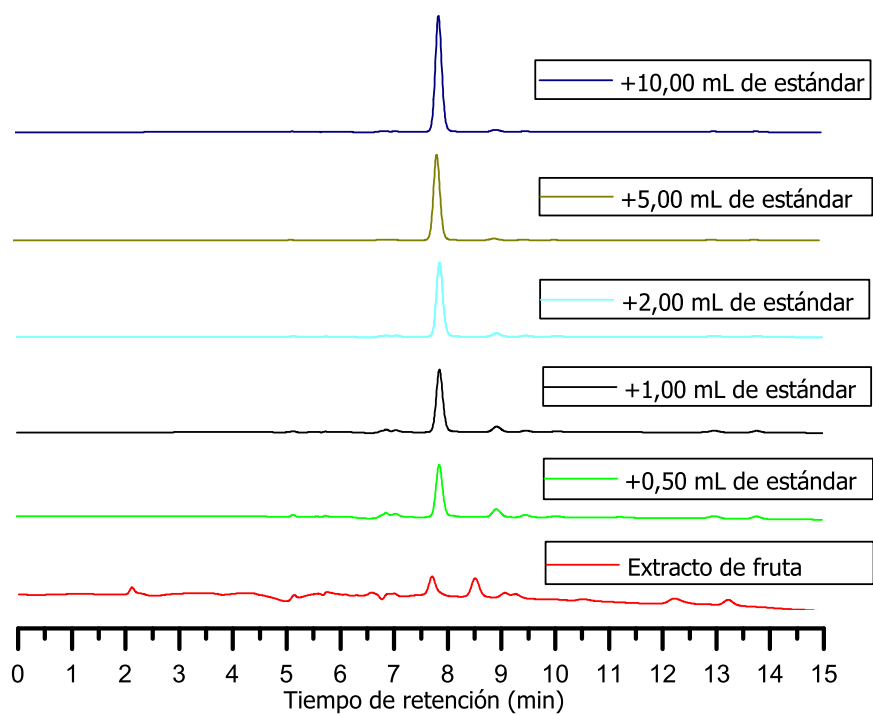
Anexo 9. Cromatogramas de la fruta cidra



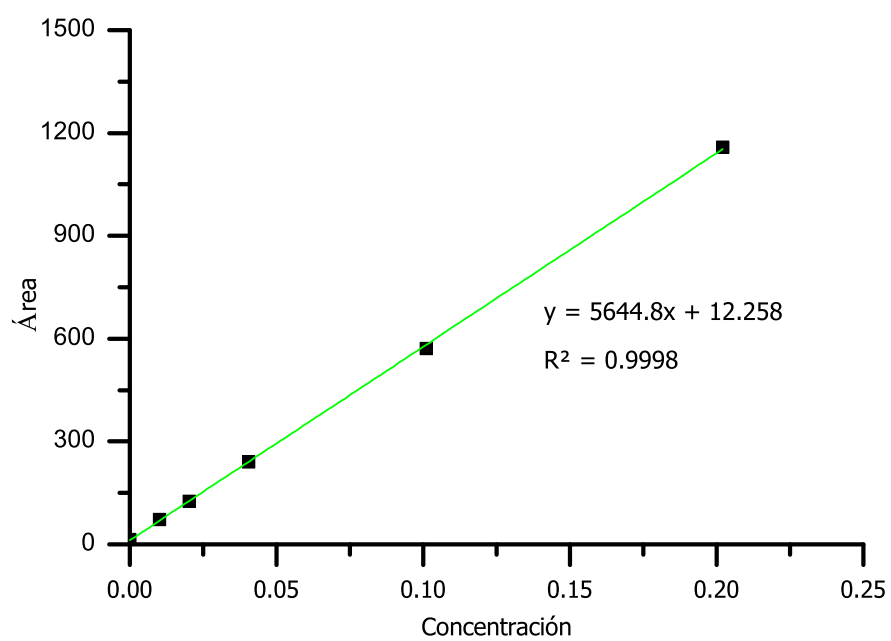
Anexo 10. Curva de calibración de la fruta cidra



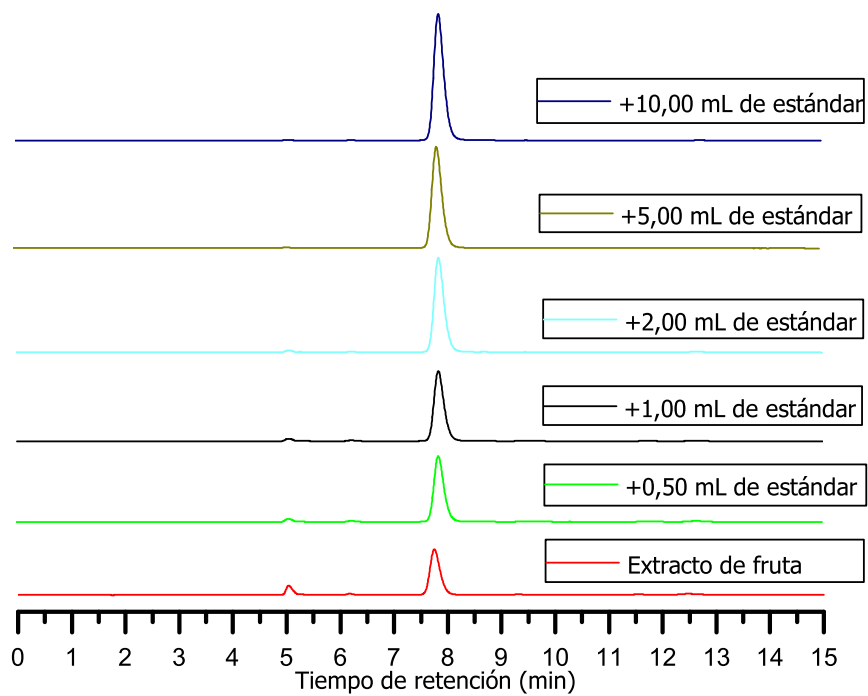
Anexo 11. Cromatogramas de la fruta cóngolo



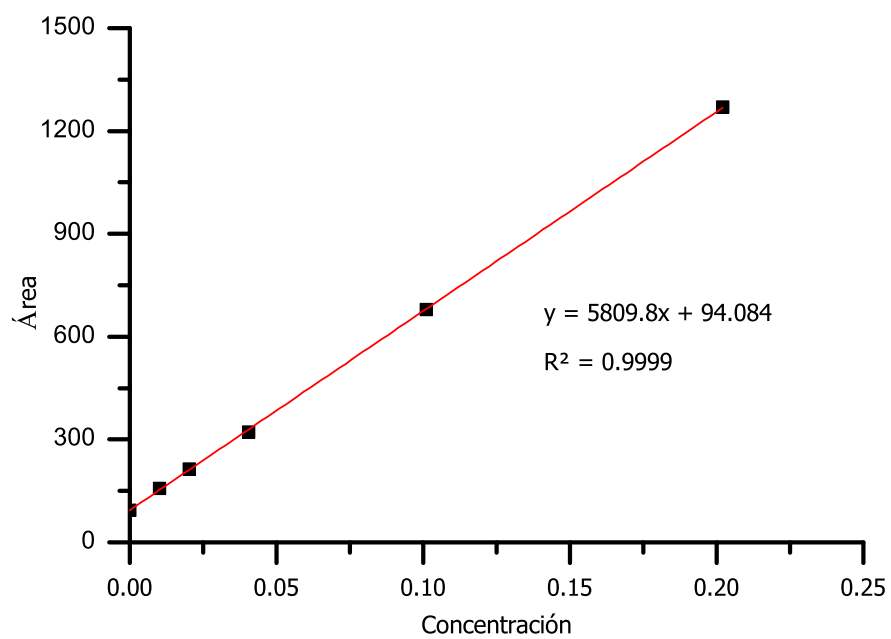
Anexo 12. Curva de calibración de la fruta cóngolo



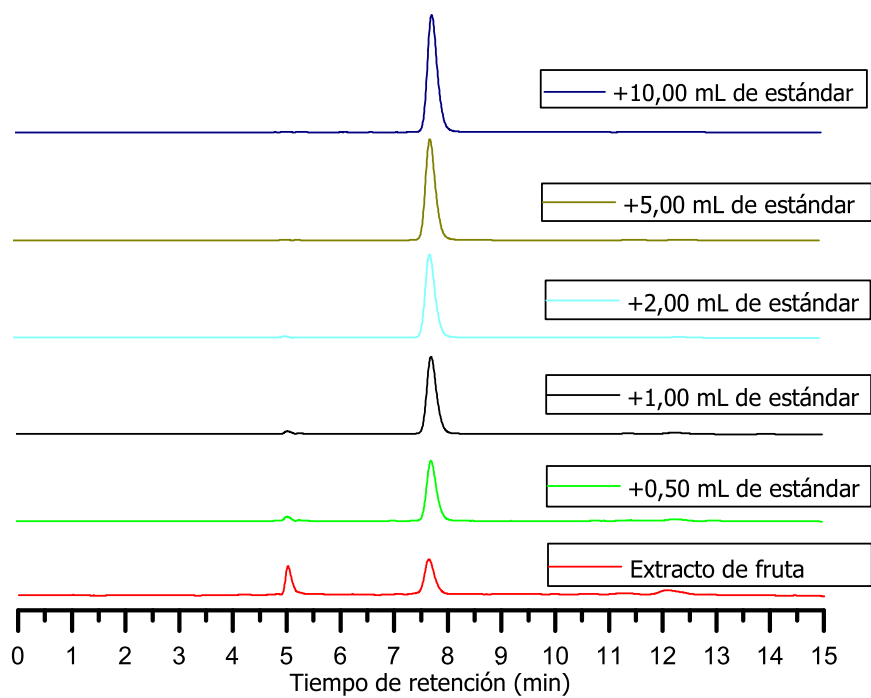
Anexo 13. Cromatogramas de la fruta curuba



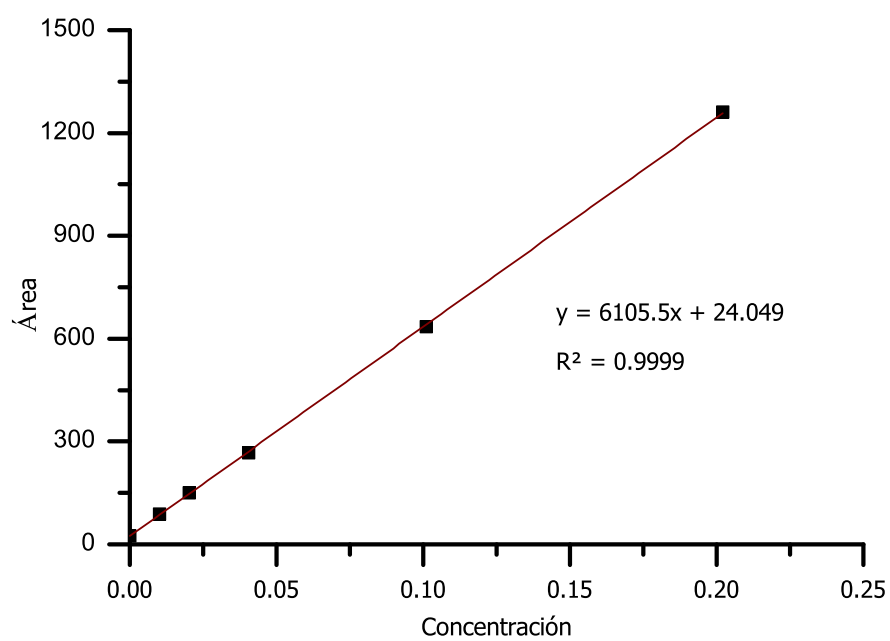
Anexo 14. Curva de calibración de la fruta curuba



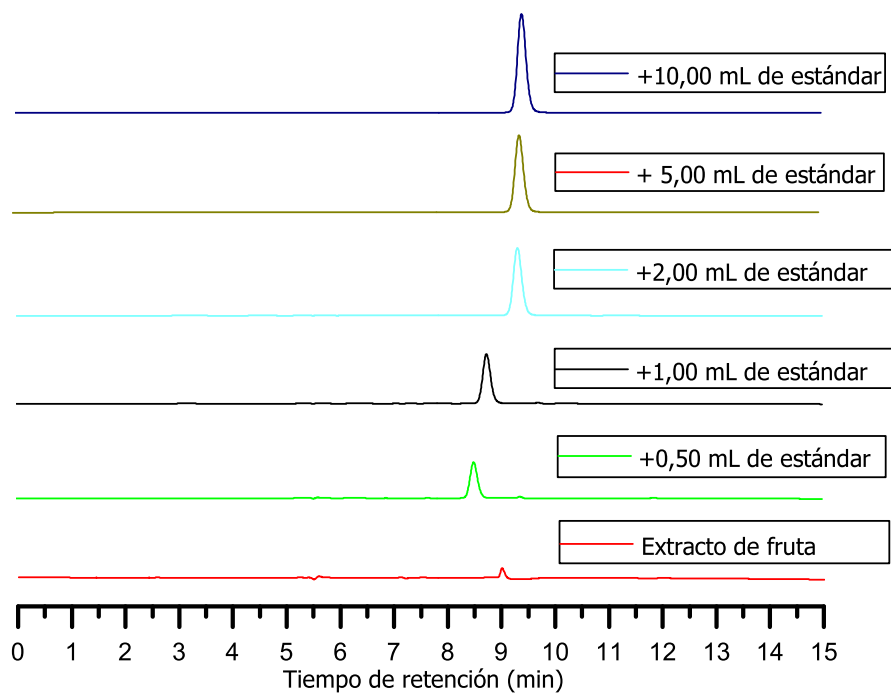
Anexo 15. Cromatogramas de la fruta granadilla



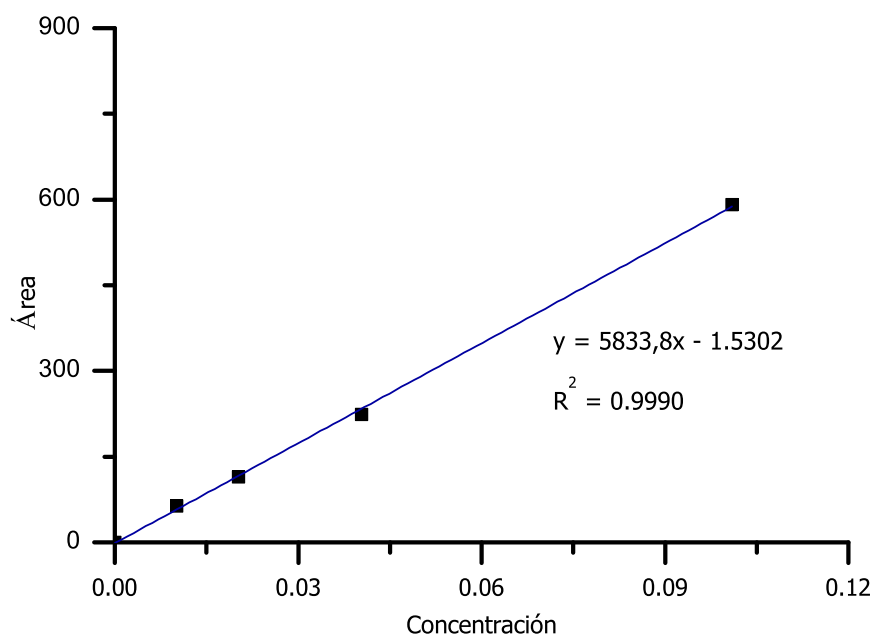
Anexo 16. Curva de calibración de la fruta granadilla



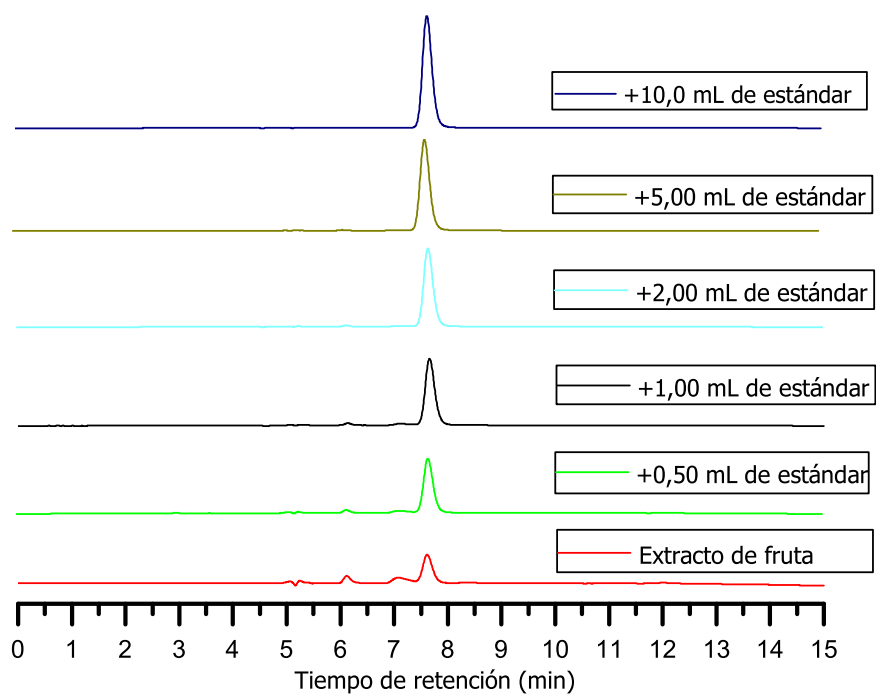
Anexo 17. Cromatogramas de la fruta guama



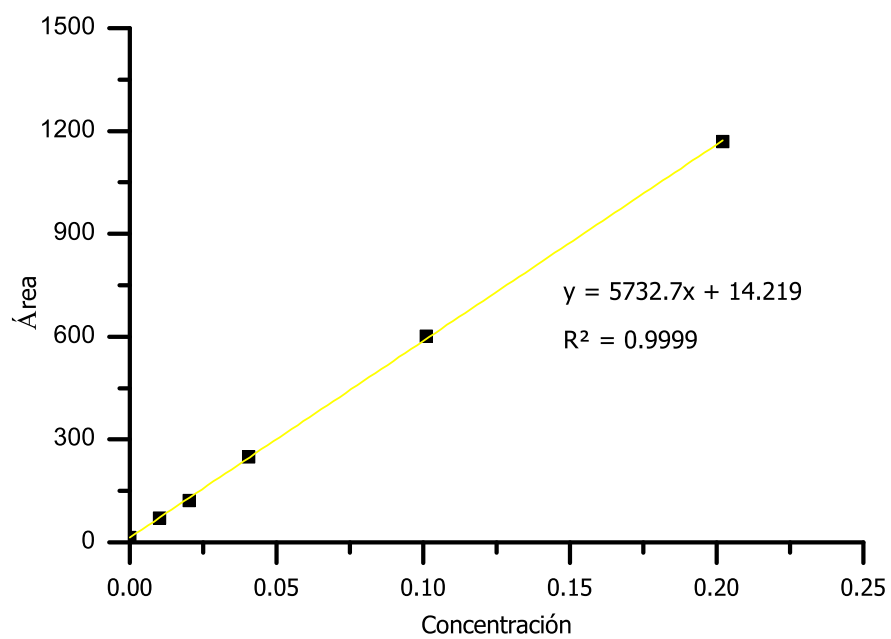
Anexo 18. Curva de calibración de la fruta guama



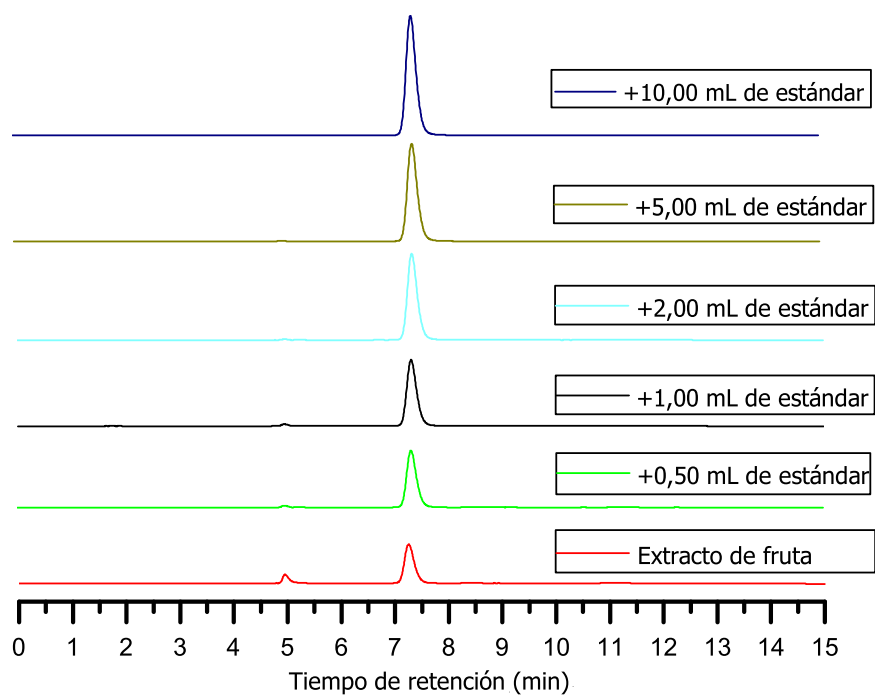
Anexo 19. Cromatogramas de la fruta guanábana



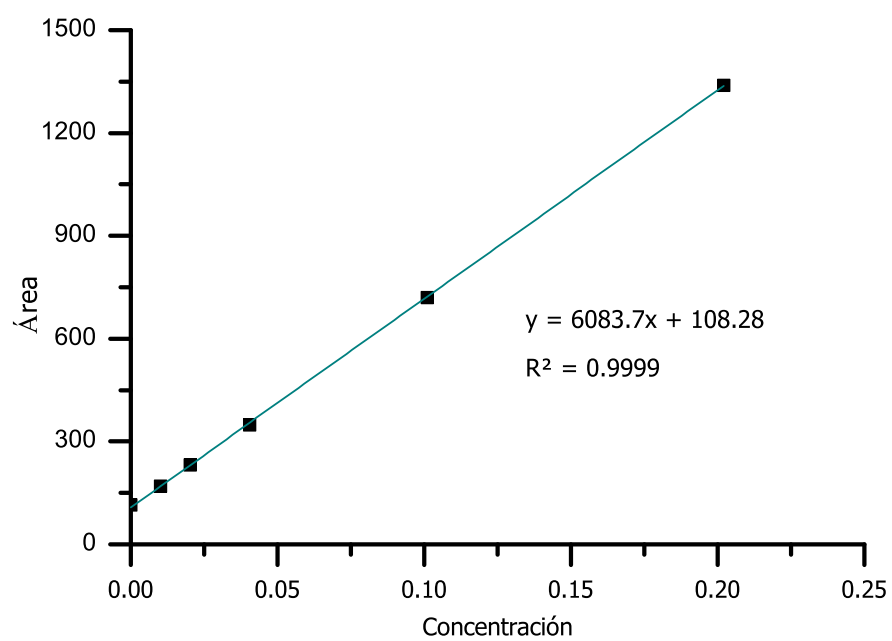
Anexo 20. Curva de calibración de la fruta guanábana



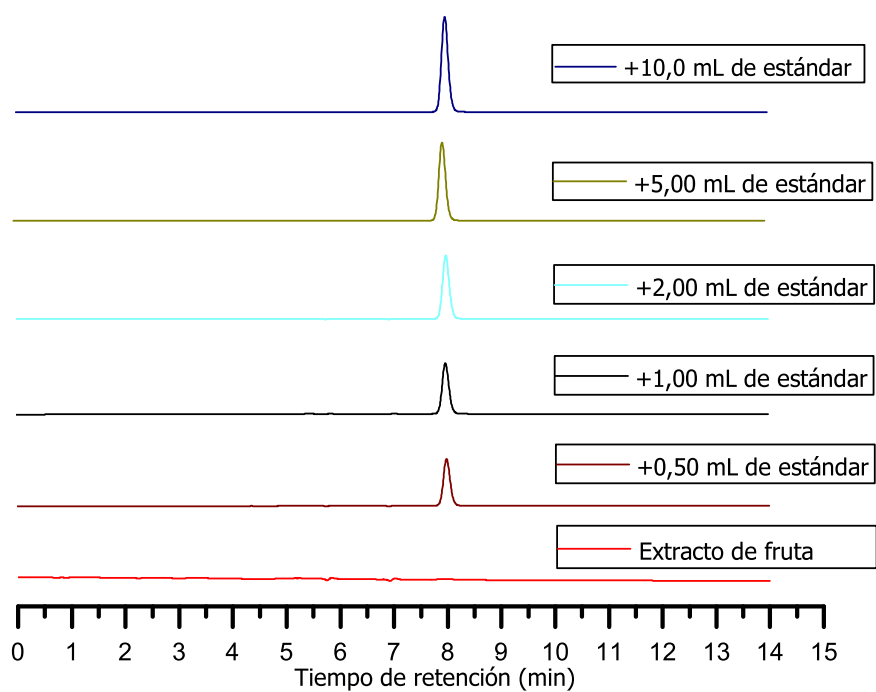
Anexo 21. Cromatogramas de la fruta guayaba



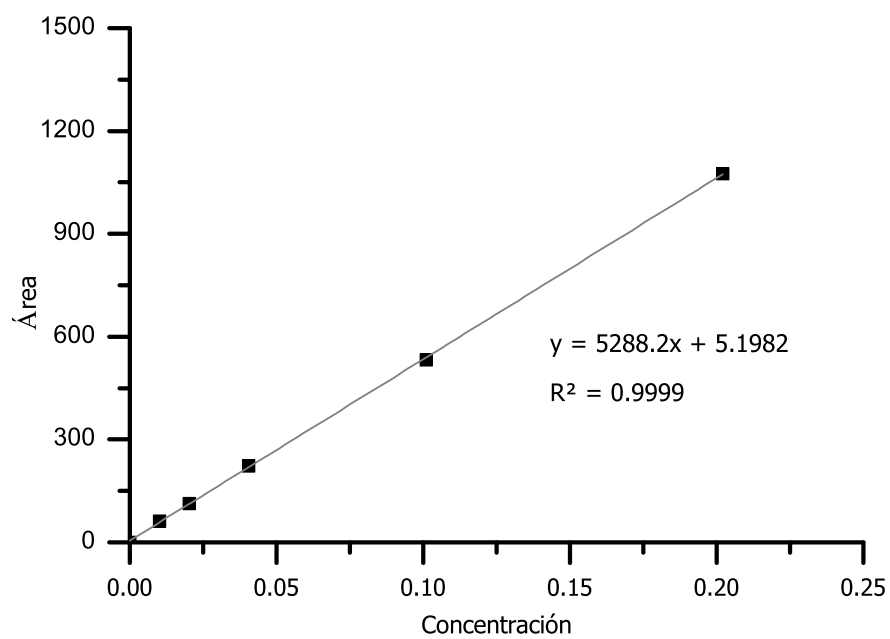
Anexo 22. Curva de calibración de la fruta guayaba



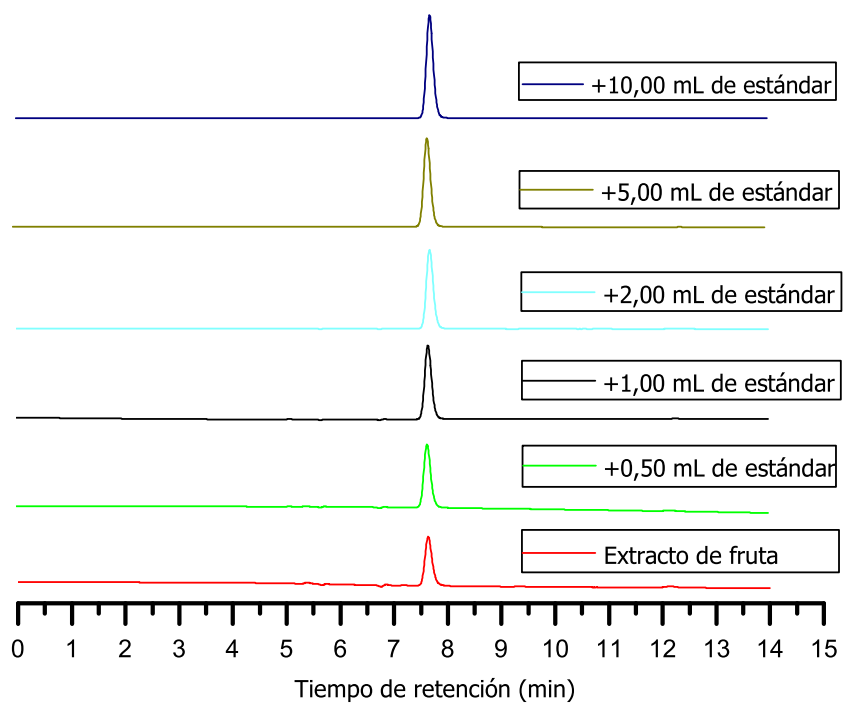
Anexo 23. Cromatogramas de la fruta icaco



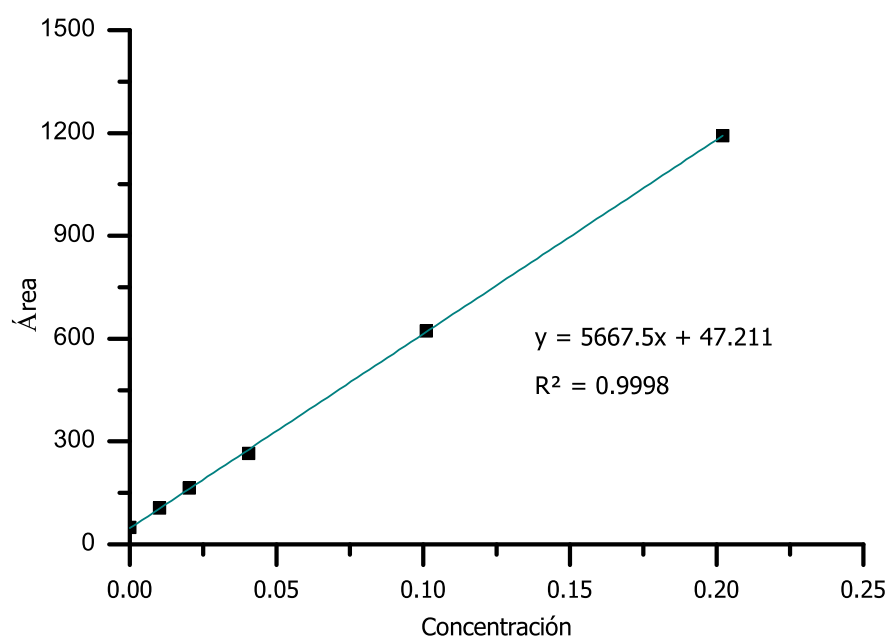
Anexo 24. Curva de calibración de la fruta icaco



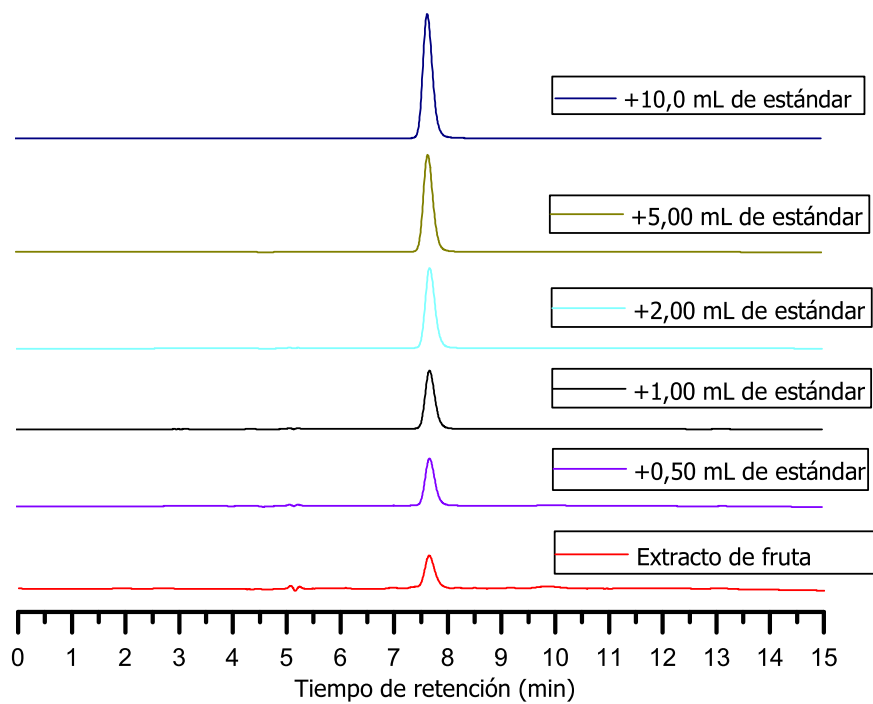
Anexo 25. Cromatogramas de la fruta limón



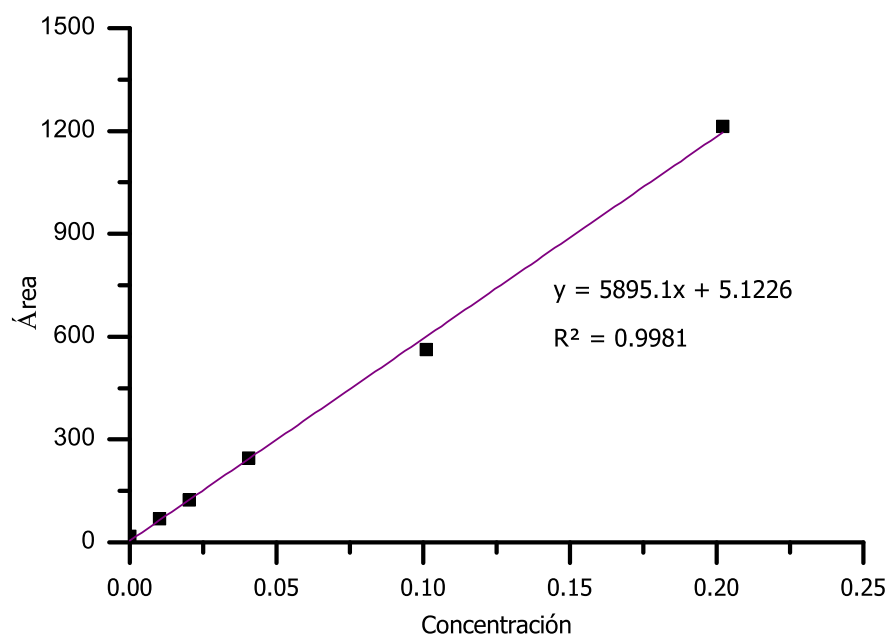
Anexo 26. Curva de calibración de la fruta limón



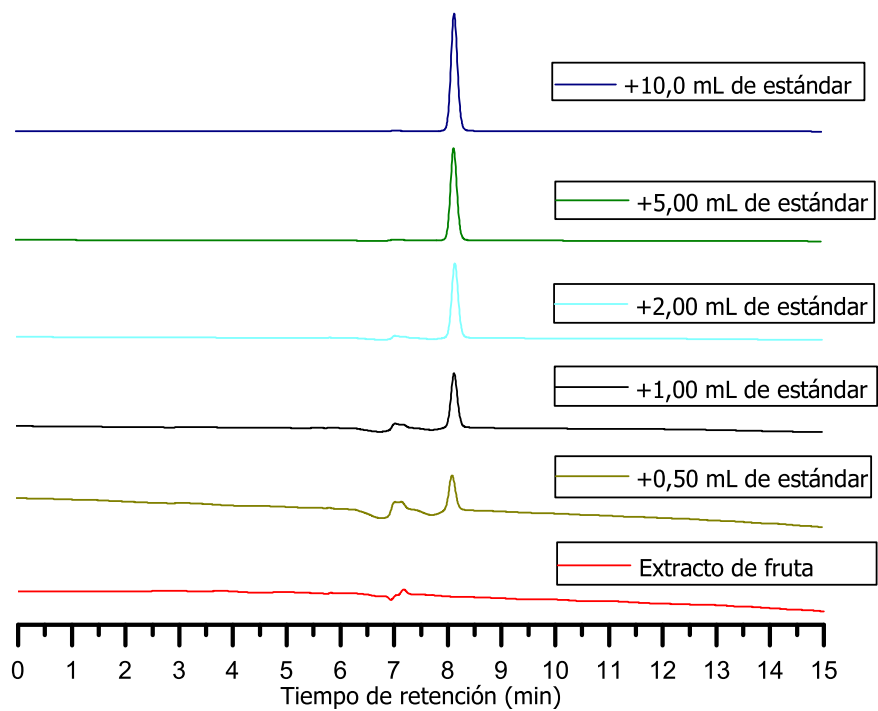
Anexo 27. Cromatogramas de la fruta lulo



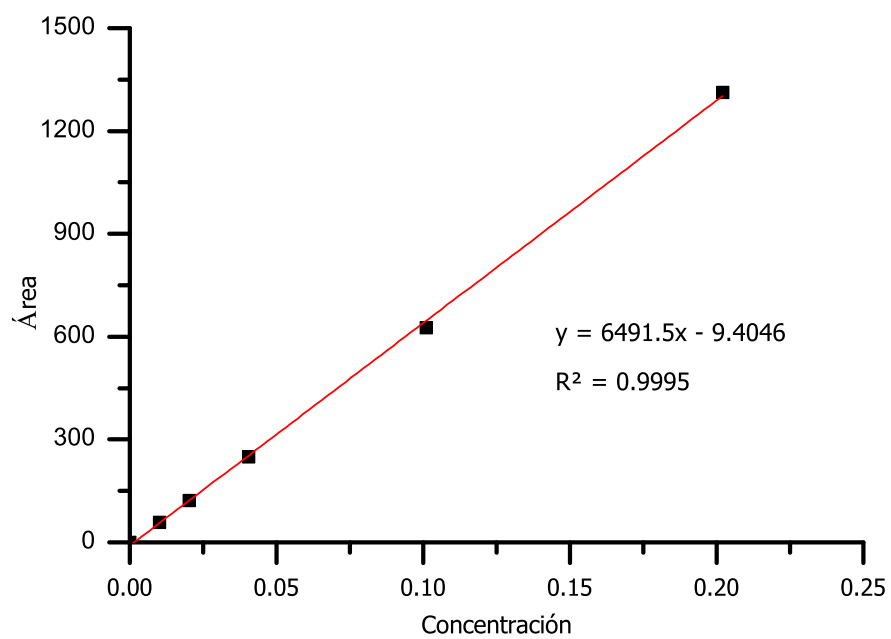
Anexo 28. Curva de calibración de la fruta lulo



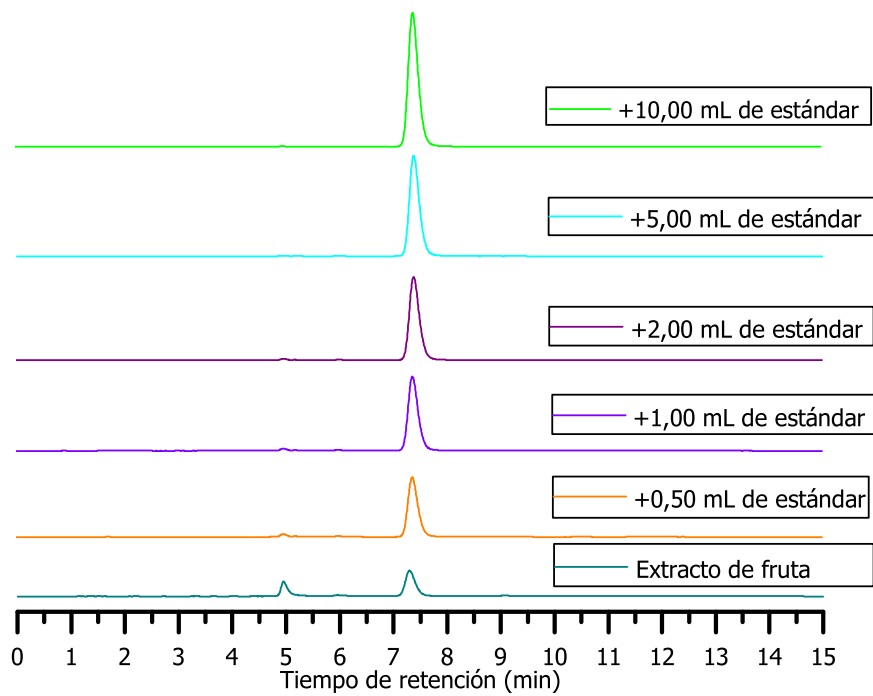
Anexo 29. Cromatogramas de la fruta mamón



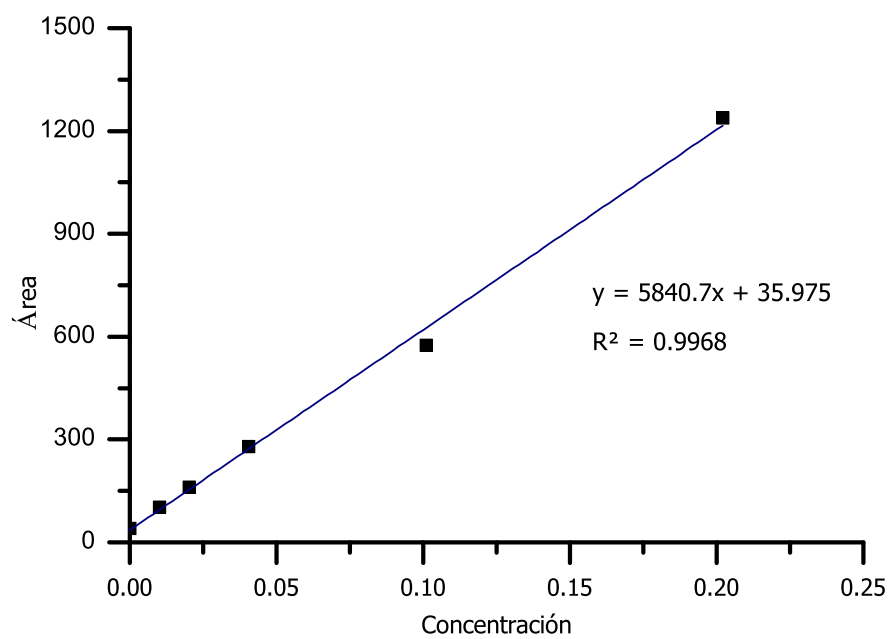
Anexo 30. Curva de calibración de la fruta mamón



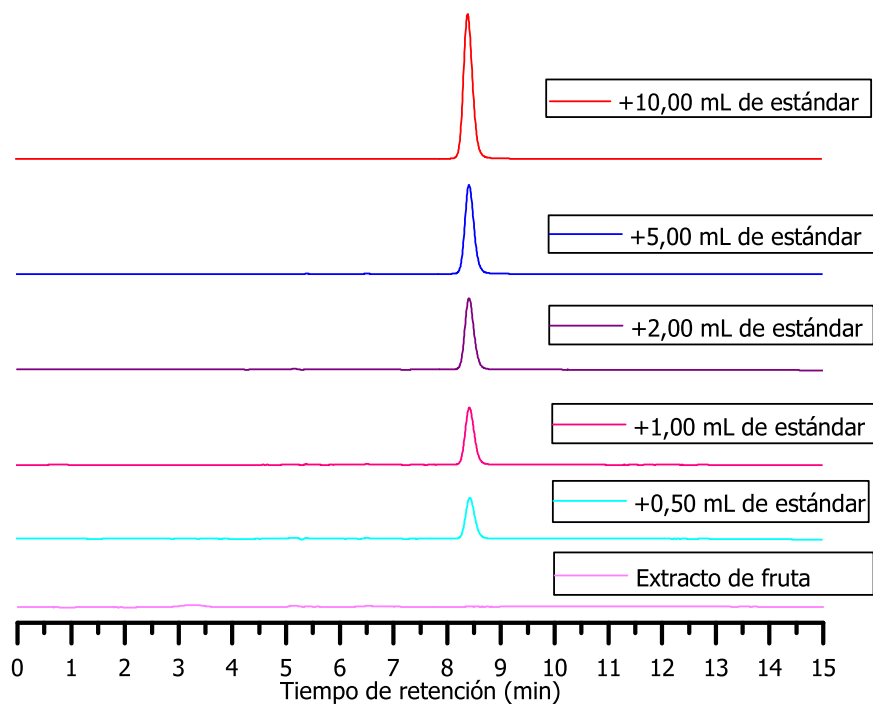
Anexo 31. Cromatogramas de la fruta mandarina



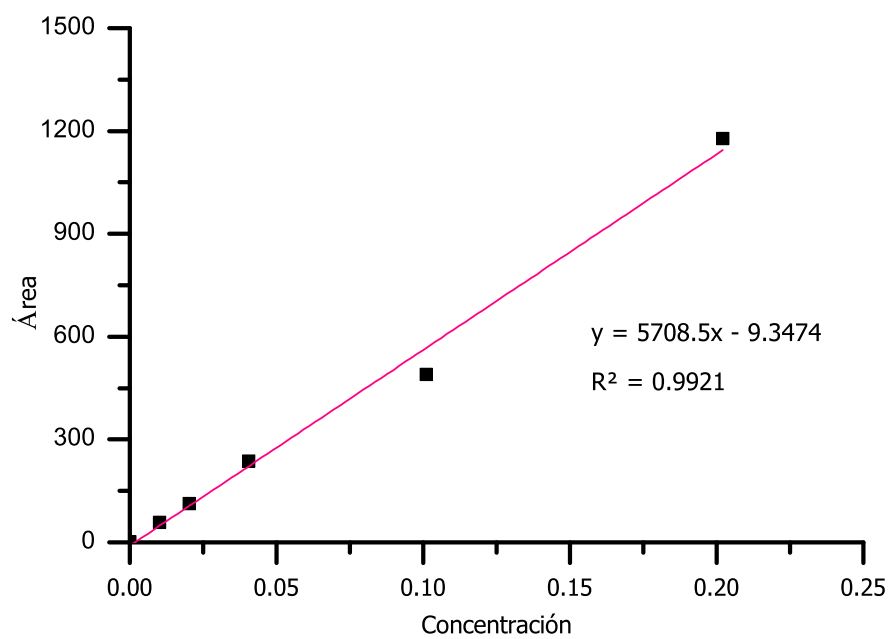
Anexo 32. Curva de calibración de la fruta mandarina



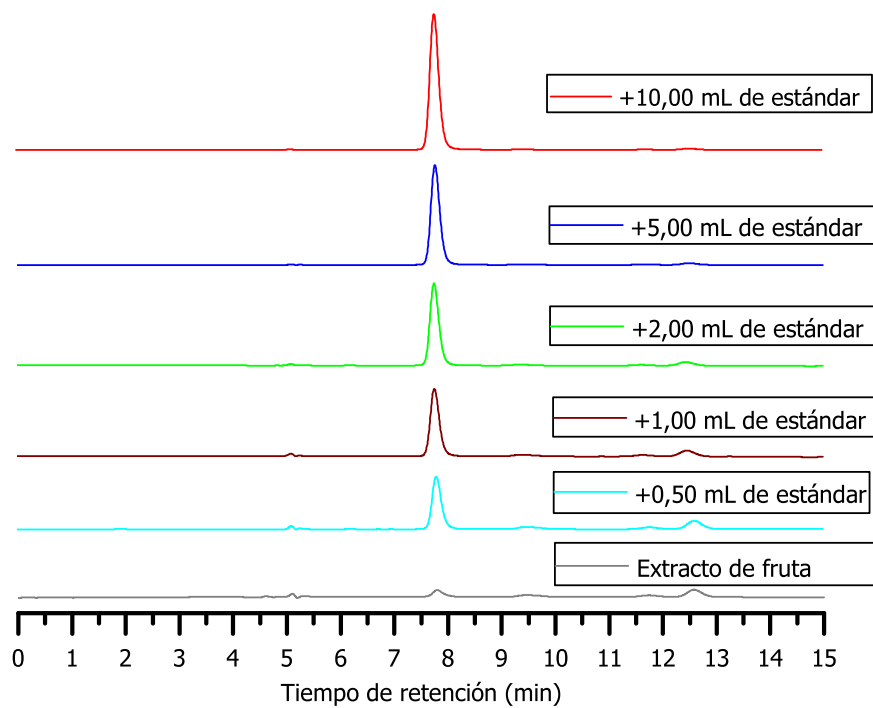
Anexo 33. Cromatogramas de la fruta mangostino



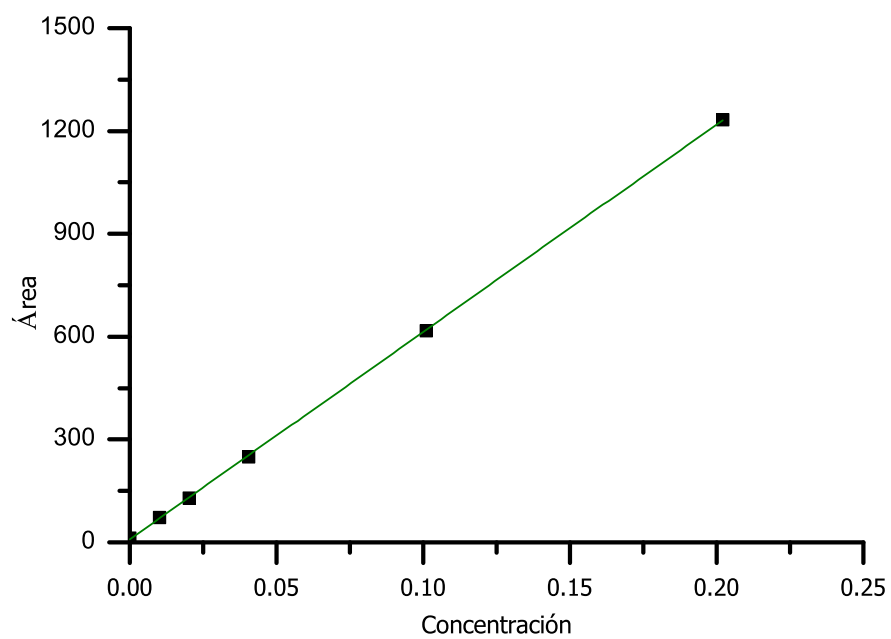
Anexo 34. Curva de calibración de la fruta mangostino



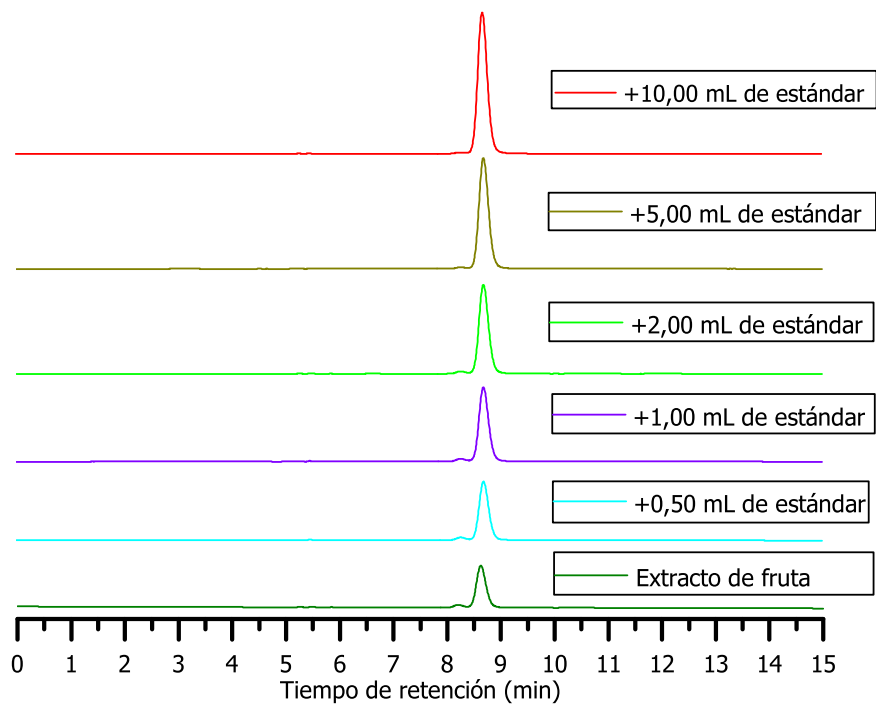
Anexo 35. Cromatogramas de la fruta maracuyá



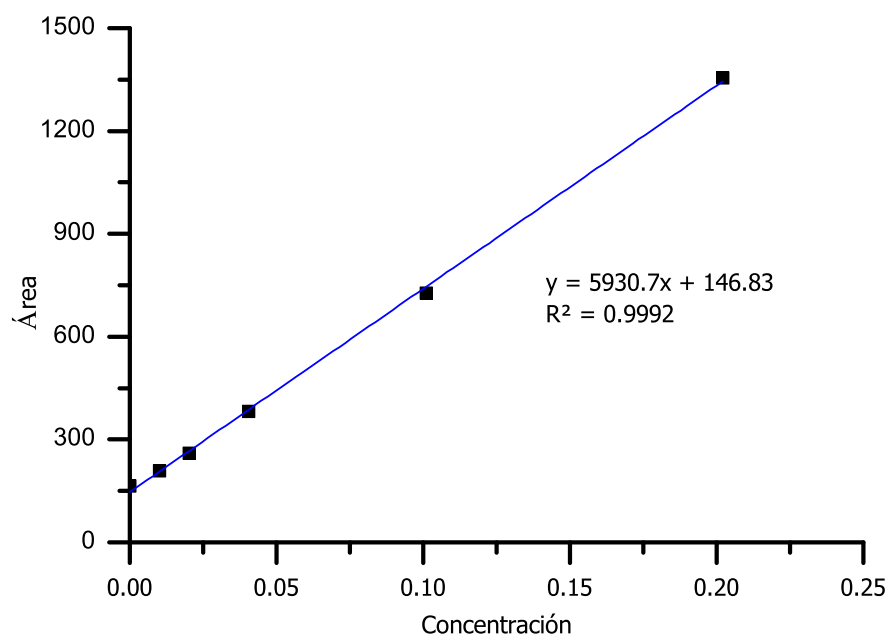
Anexo 36. Curva de calibración de la fruta maracuyá



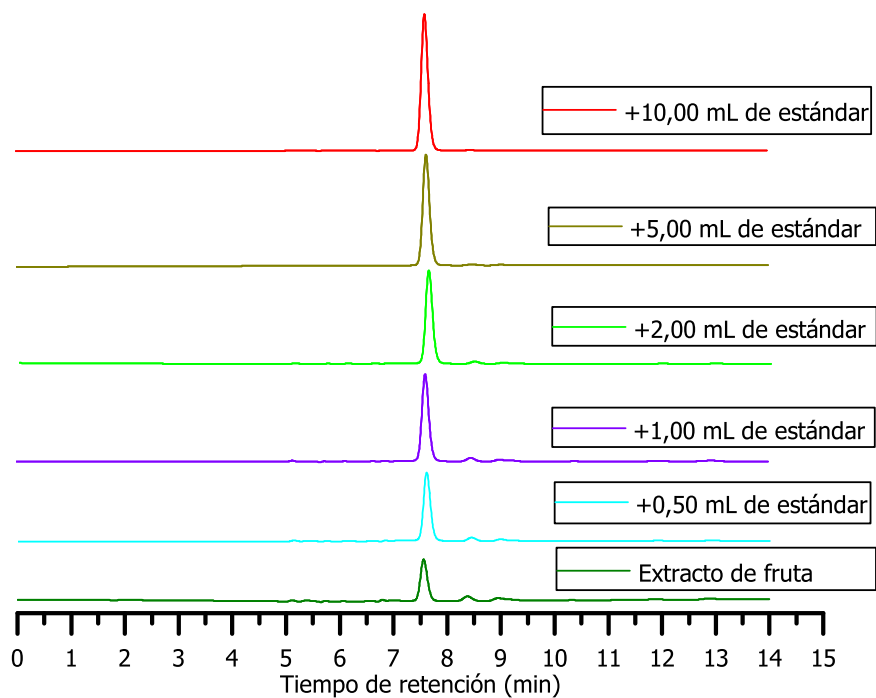
Anexo 37. Cromatogramas de la fruta marañón



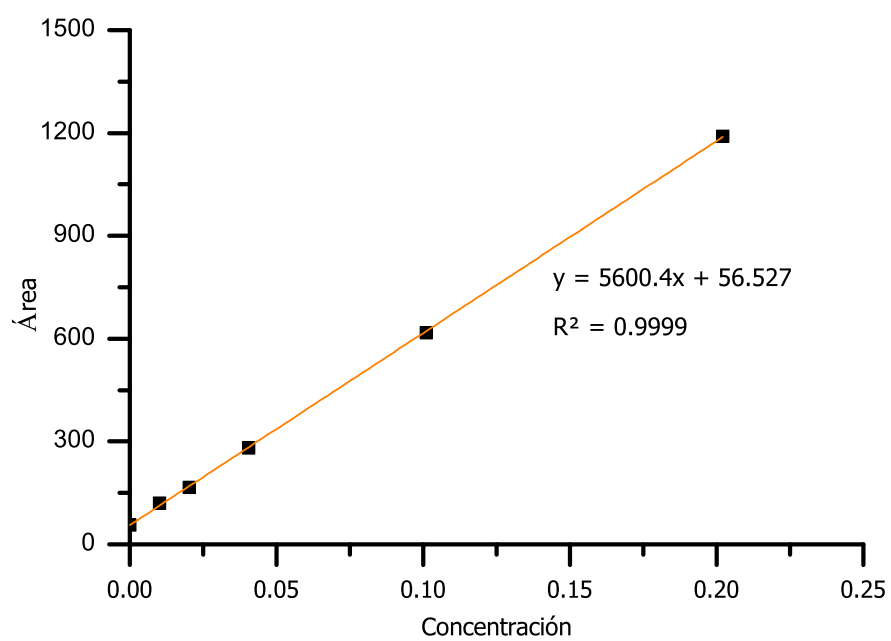
Anexo 38. Curva de calibración de la fruta marañón



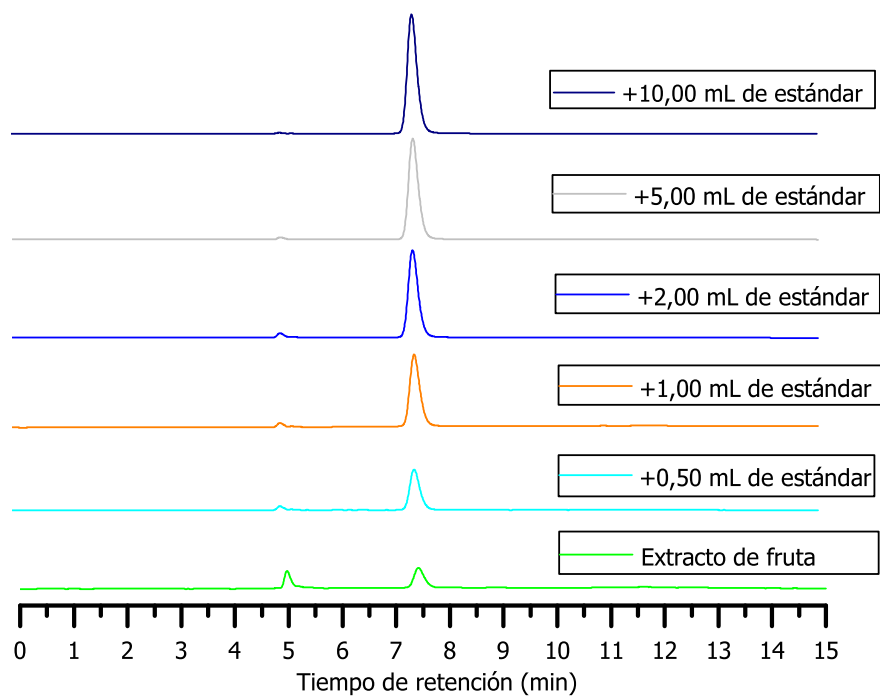
Anexo 39. Cromatogramas de la fruta melón



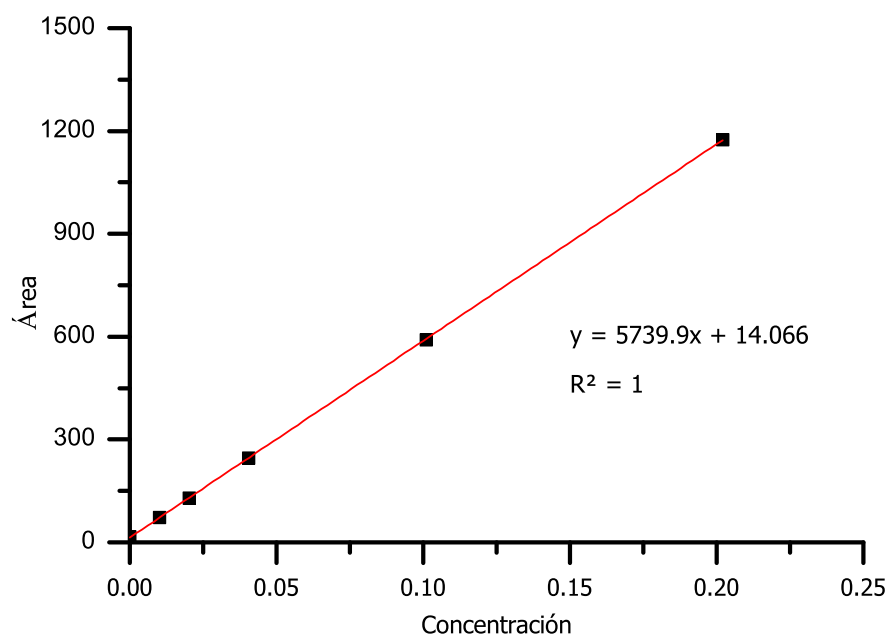
Anexo 40. Curva de calibración de la fruta melón



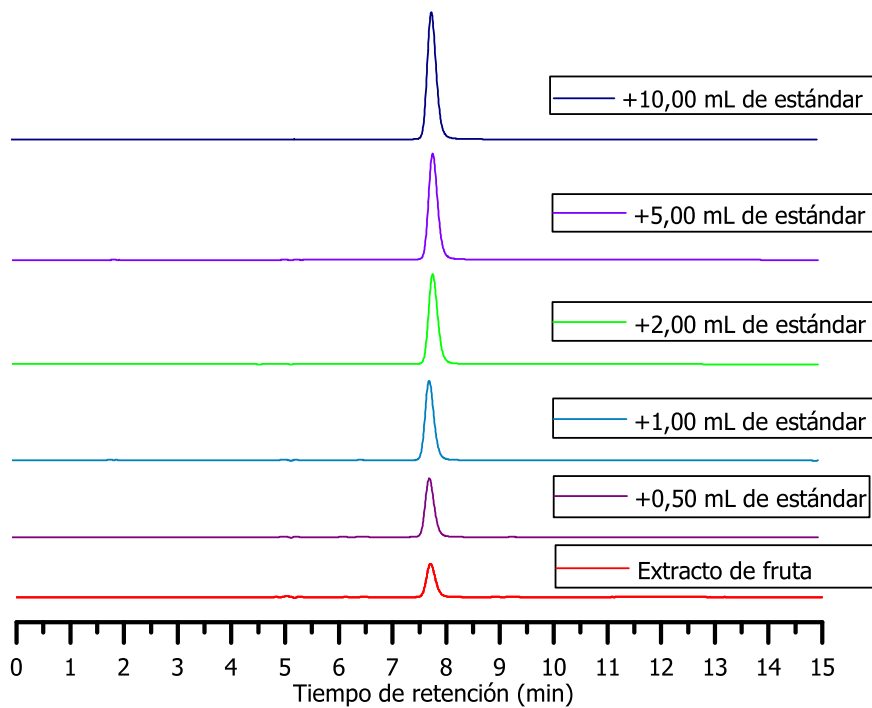
Anexo 41. Cromatogramas de la fruta mora



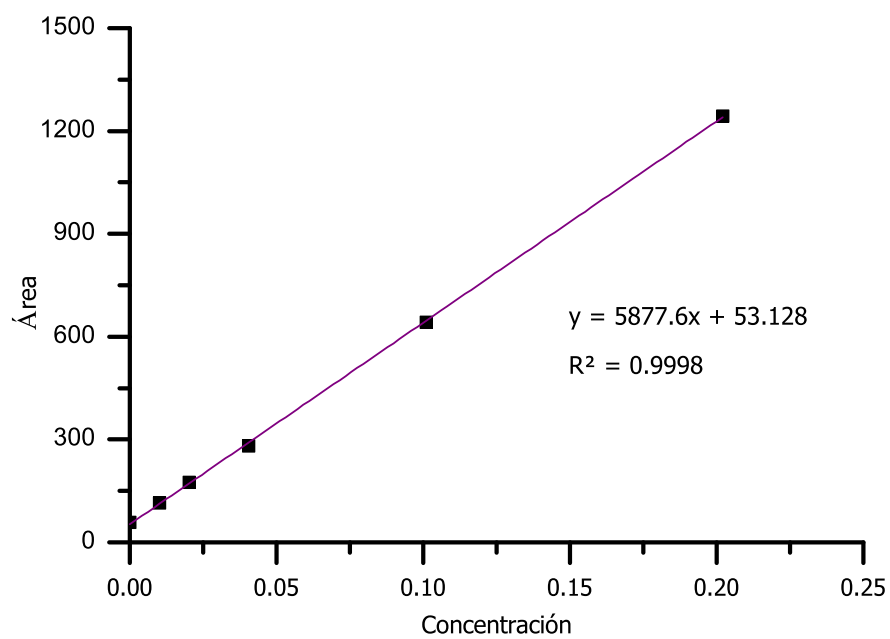
Anexo 42. Curva de calibración de la fruta mora



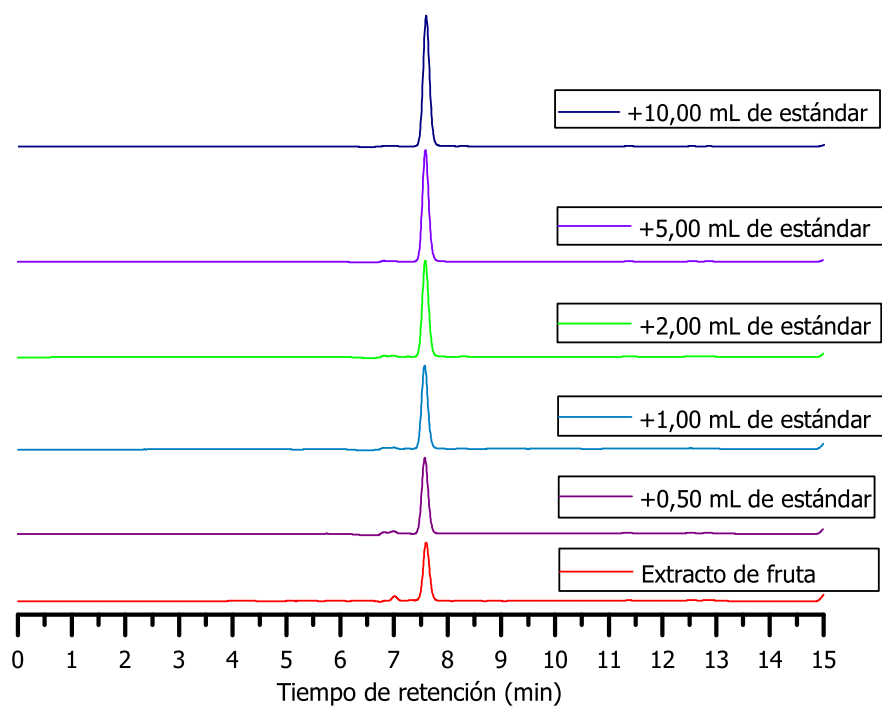
Anexo 43. Cromatogramas de la fruta naranja



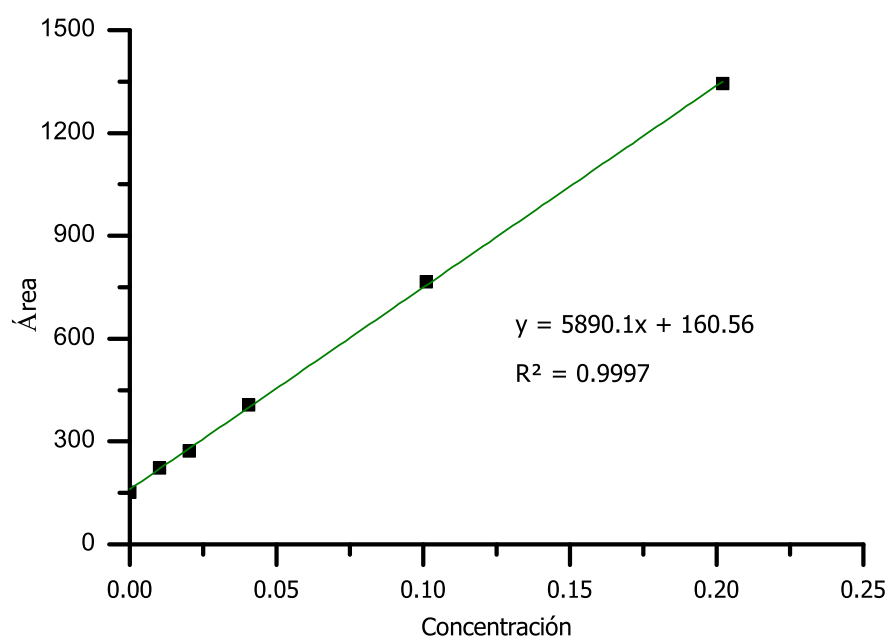
Anexo 44. Curva de calibración de la fruta naranja



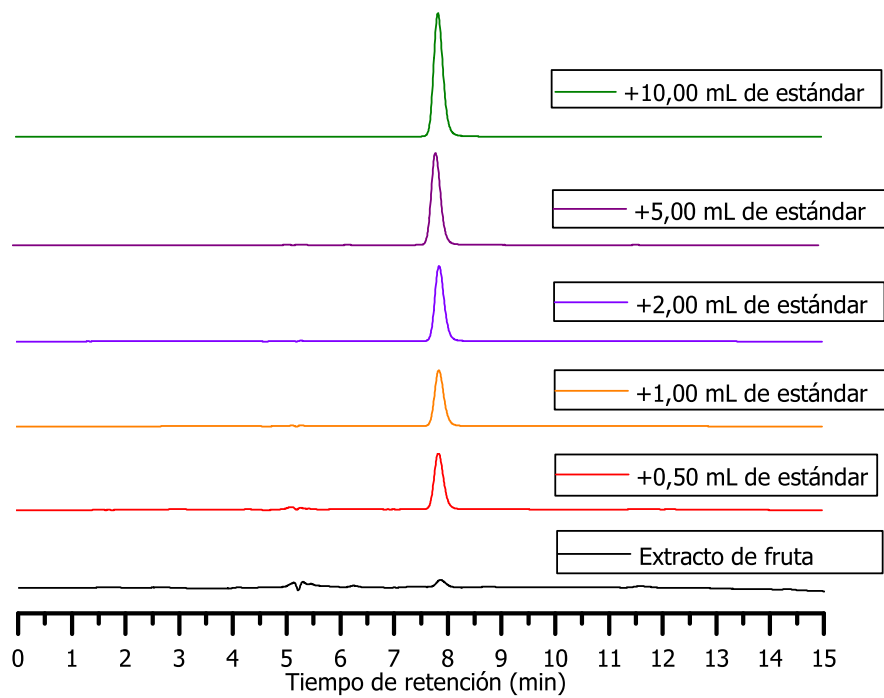
Anexo 45. Cromatogramas de la fruta noni



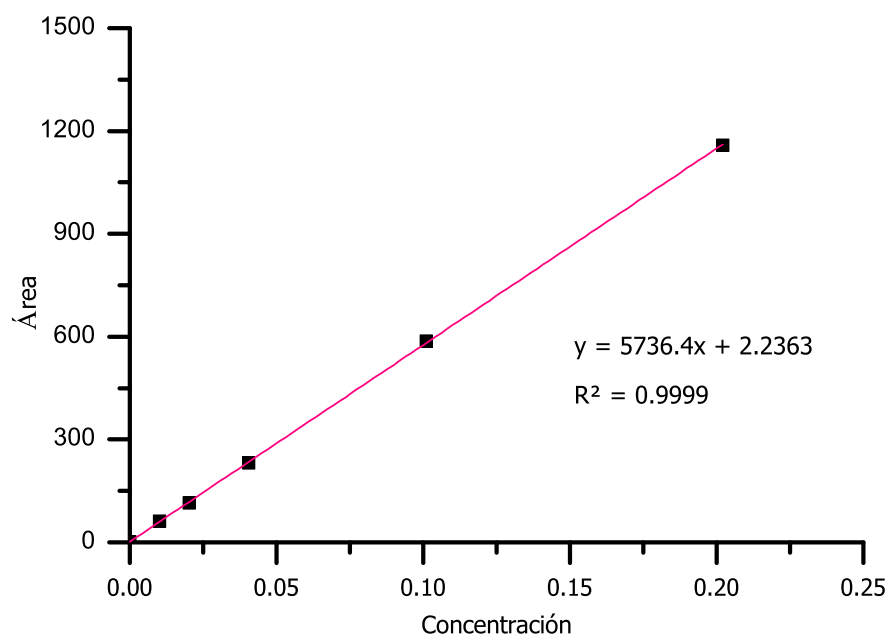
Anexo 46. Curva de calibración de la fruta noni



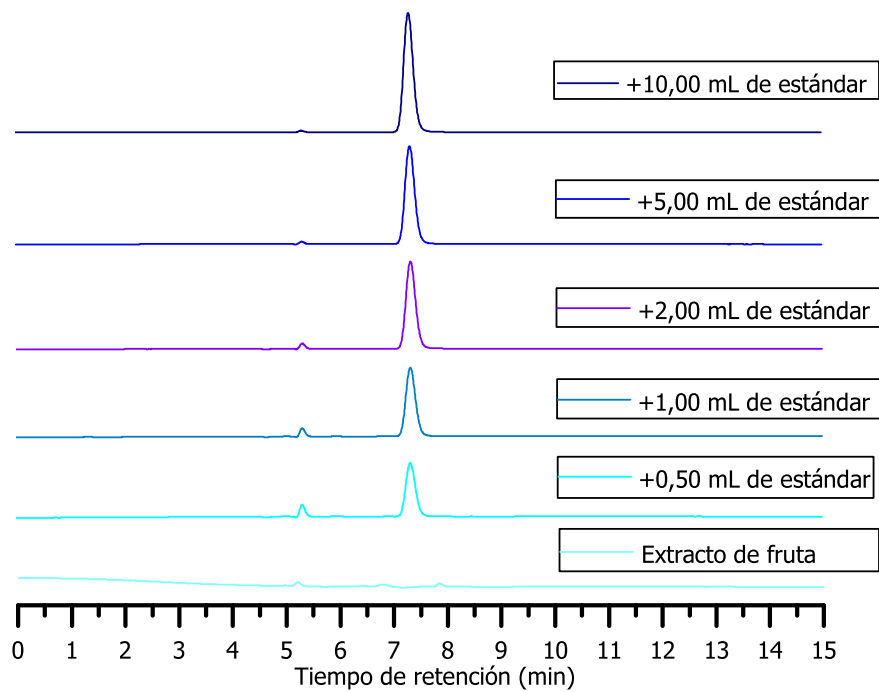
Anexo 47. Cromatogramas de la fruta pitaya



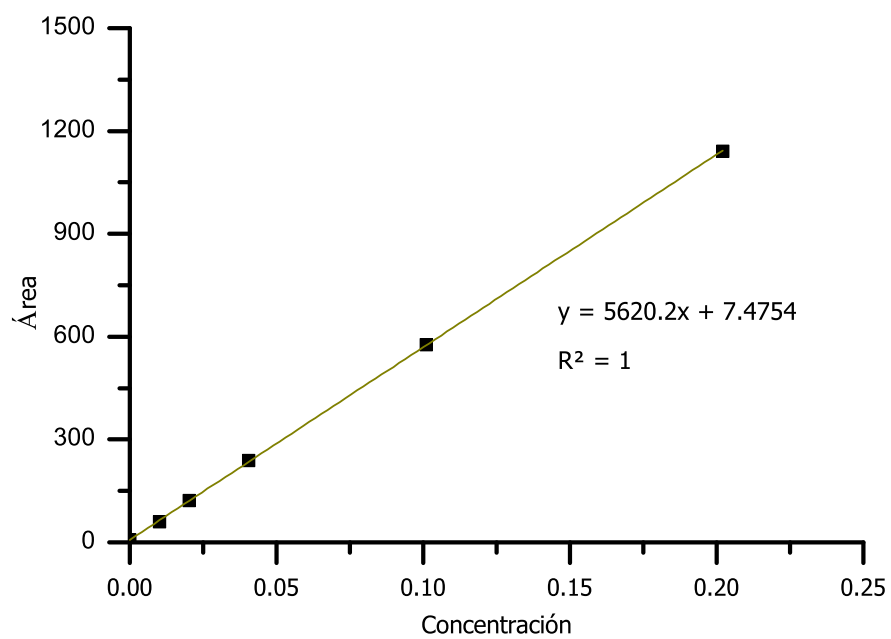
Anexo 48. Curva de calibración de la fruta pitaya



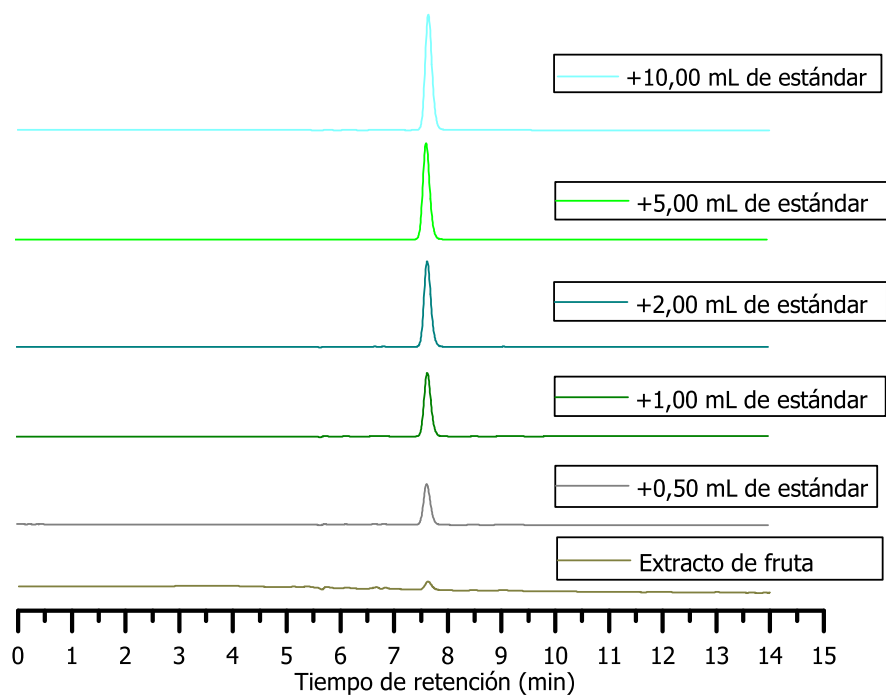
Anexo 49. Cromatogramas de la fruta pomarrosa



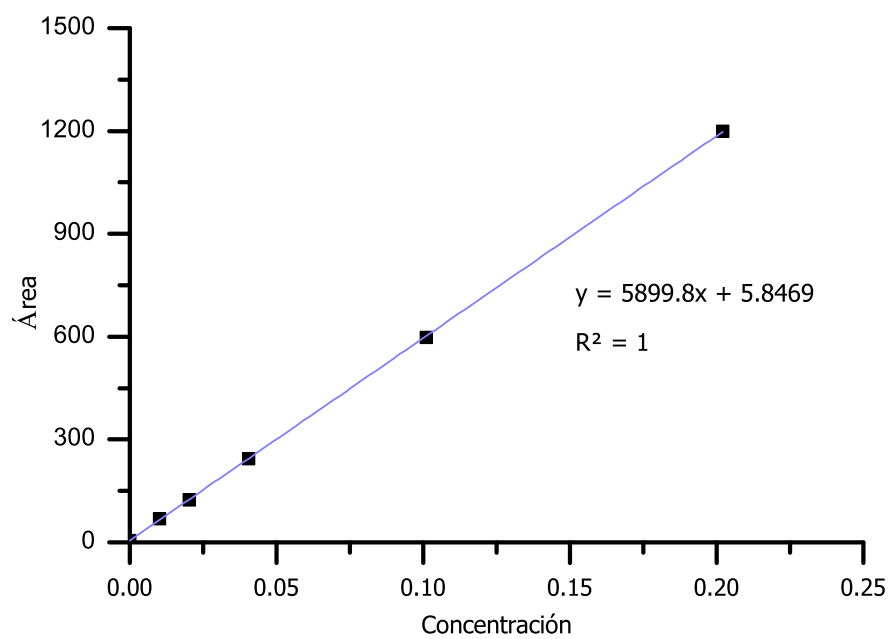
Anexo 50. Curva de calibración de la fruta pomarrosa



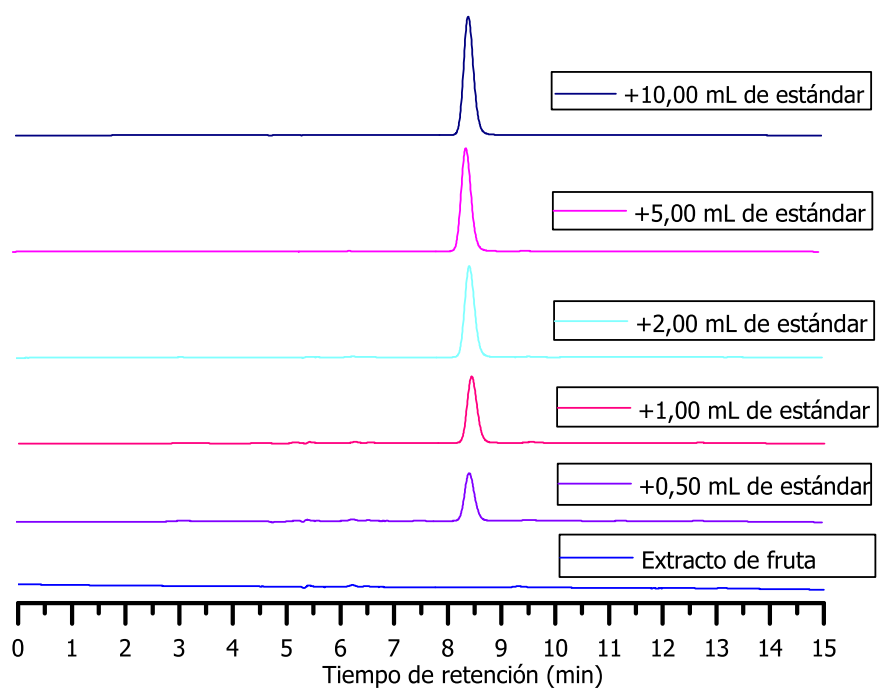
Anexo 51. Cromatogramas de la fruta sandia



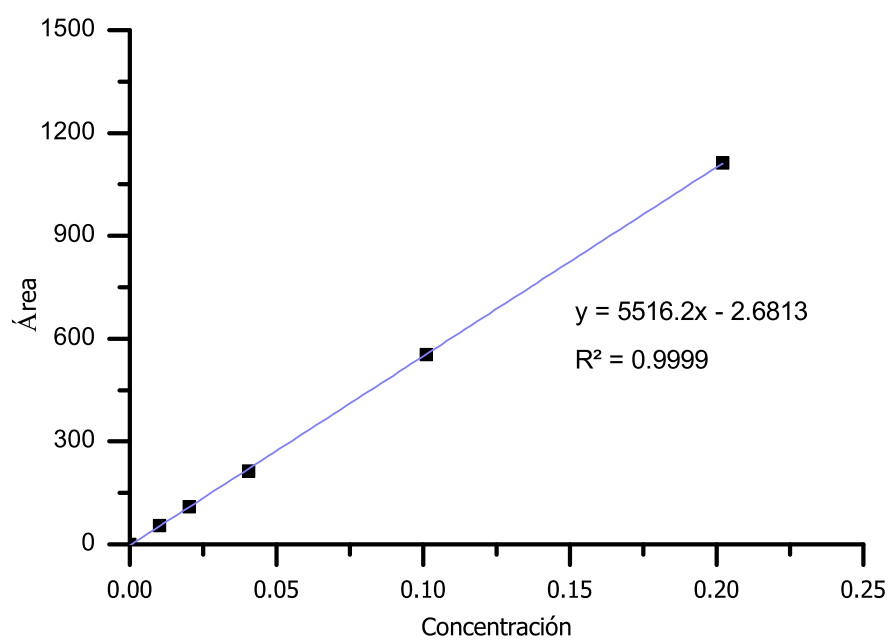
Anexo 52. Curva de calibración de la fruta sandia



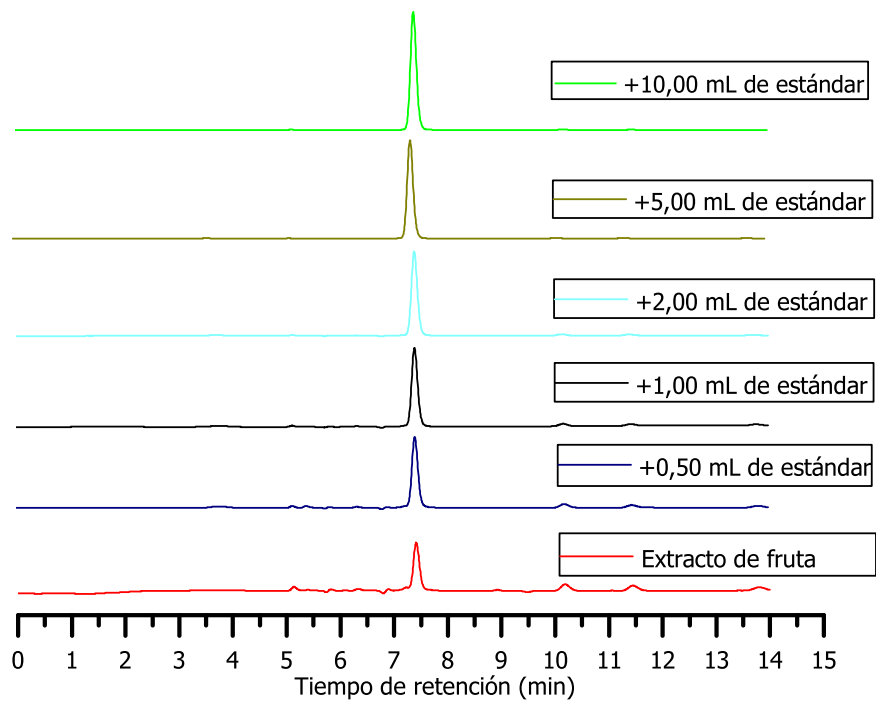
Anexo 53. Cromatogramas de la fruta tamarindo



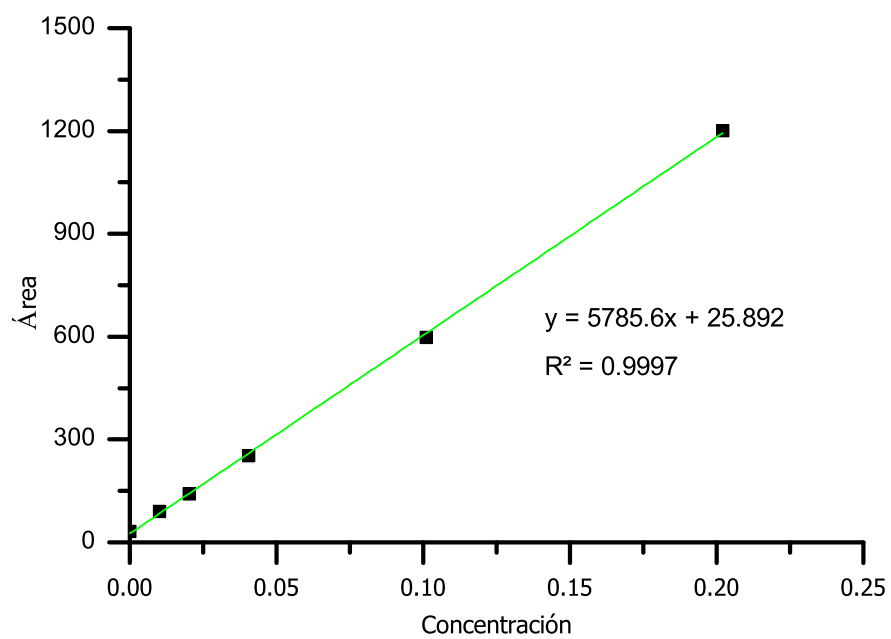
Anexo 54. Curva de calibración de la fruta tamarindo



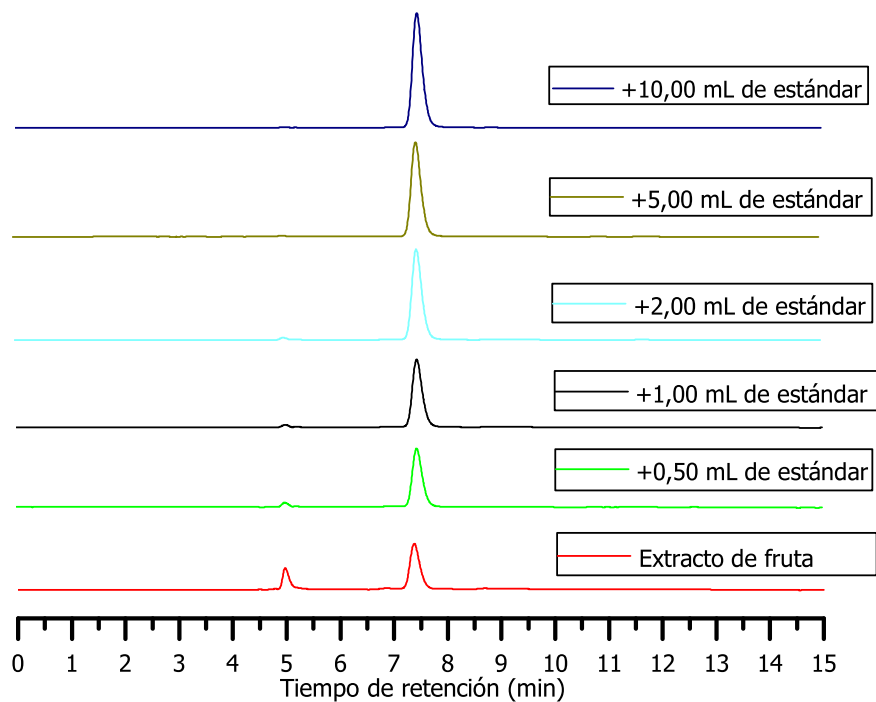
Anexo 55. Cromatogramas de la fruta tomate de árbol



Anexo 56. Curva de calibración de la fruta tomate de árbol



Anexo 57. Cromatogramas de la fruta uchuva



Anexo 58. Curva de calibración de la fruta uchuva

