

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD FITORREMEDIADORA DE *Chenopodium album* (LICCHA), EN AGUA SINTÉTICA CONTAMINADA CON ARSÉNICO.

Tesis presentada por la Bachiller:

Flores Calla, Susan Sofia

para optar el Título Profesional de
Ingeniero Biotecnólogo.

Asesor: Dr. Villanueva Salas, José Antonio

AREQUIPA – PERÚ

2017

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 20170000041768

N° Trámite en Fac. 360-2017
Fecha Recep. Fac. 12-09-2017

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

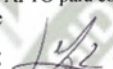
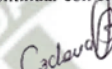
DE: **FLORES CALLA, Susan Sofía**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"DETERMINACION DE LA CAPACIDAD FITORREMEIADORA DE *Chenopodium álbum* EN AGUA CONTAMINADA CON ARSENICO (V)"

DICTAMINADORES: **Ing. Cifrido Zaravia Sánchez** 2) **Ing. Cinthia Córdova Barrios**

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: **"DETERMINACION DE LA CAPACIDAD FITORREMEIADORA DE *Chenopodium album* L. (*Liccha*) EN AGUA SINTETICA CONTAMINADA CON ARSENICO (V)"** después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente
FIRMAS:   (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA

ASESOR: **Dr. José Villanueva Salas**

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas: habiéndose concluido el trabajo de investigación intitulado **"DETERMINACION DE LA CAPACIDAD FITORREMEIADORA DE *Chenopodium album* EN AGUA CONTAMINADA CON ARSÉNICO"**, verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes, considero se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

FIRMA 

FECHA 05/12/17

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Ing. Cifrido Zaravia Sánchez**
- 2) **Ing. Cinthia Córdova Barrios**
- 3) **Mgter. Julitza Paredes Fuentes**

DICTAMEN FINAL:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, es que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente
FIRMA    (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA

JURADOS: PRESIDENTE
VOCAL
SECRETARIO

FECHA 20/12/17 HORA 11.00

LOCAL SUN - C402

FIRMA DEL DECANO 

FECHA 18/12/17

DEDICATORIA

A Dios por bendecir mi vida e iluminar mi camino en todo momento.

A mi hermana Angela Alejandra Flores Calla; a mis padres Guillermo Alejandro Flores Lovera y Asunción Encarnación Calla Calderón, por su incondicional amor y paciencia, Dios los bendiga siempre. Los amo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Católica de Santa María.

Al Dr. José Antonio Villanueva Salas.

A Dios por guiar mi camino y bendecir mi vida siempre.

A mis padres, Guillermo y Asunción, por estar incondicionalmente conmigo.

A mi hermana, Angela, por apoyarme siempre.

RESUMEN

En la actualidad, la toxicidad del arsénico en el agua está aumentando significativamente debido a la liberación industrial masiva acumulada en el medio ambiente, afectando a la salud humana causando daños teratogénicos y carcinógenos letales. Esta investigación, tiene como objetivo la determinación de la capacidad de fitorremediación de *Chenopodium album* (Liccha), en aguas sintéticas contaminadas con arsénico. Primero, se llevó a cabo la propagación vegetativa de la especie por esquejes. Luego, se determinaron las condiciones óptimas de crecimiento, probando 3 concentraciones de solución hidropónica de Hoagland (25, 50 y 100%); siendo la óptima al 25%, bajo condiciones ambientales de 8 - 21°C y pH de 6.8. Después, se realizaron ensayos de fitotoxicidad, analizando 3 concentraciones de 5, 10 y 15 mg.L⁻¹ de arsénico, evaluando los síntomas observados durante 19 días mediante una tabla de grados de toxicidad; determinando de esta manera la máxima concentración a la cual la planta presentó mayor resistencia y acumulación: 10 mg.L⁻¹; a la más alta concentración, se mostraron síntomas de clorosis y senescencia temprana. Finalmente, se realizó el ensayo de bioacumulación por triplicado en un sistema aeropónico; con un tratamiento T1 (10 mg.L⁻¹ As) y un control (0 mg.L⁻¹), evaluando la concentración acumulada de arsénico cada 5 días, durante 30 días, mediante la técnica de Espectroscopia de Plasma Acoplado Inductivamente ICP – OES, previa validación del método analítico. Presentando una máxima acumulación a los 20 días, en la parte radicular y aérea: 694.802 ± 2.450 mg.kg⁻¹ y 1050.373 ± 0.879 mg.kg⁻¹, respectivamente; deduciendo que sea una planta hiperacumuladora de arsénico.

Chenopodium album, tiene capacidad de fitoextracción y rizofiltración de arsénico, ya que acumuló el metaloide en la parte aérea y radicular; pudiendo ser empleada en procesos de fitorremediación de aguas altamente contaminadas con el mismo.

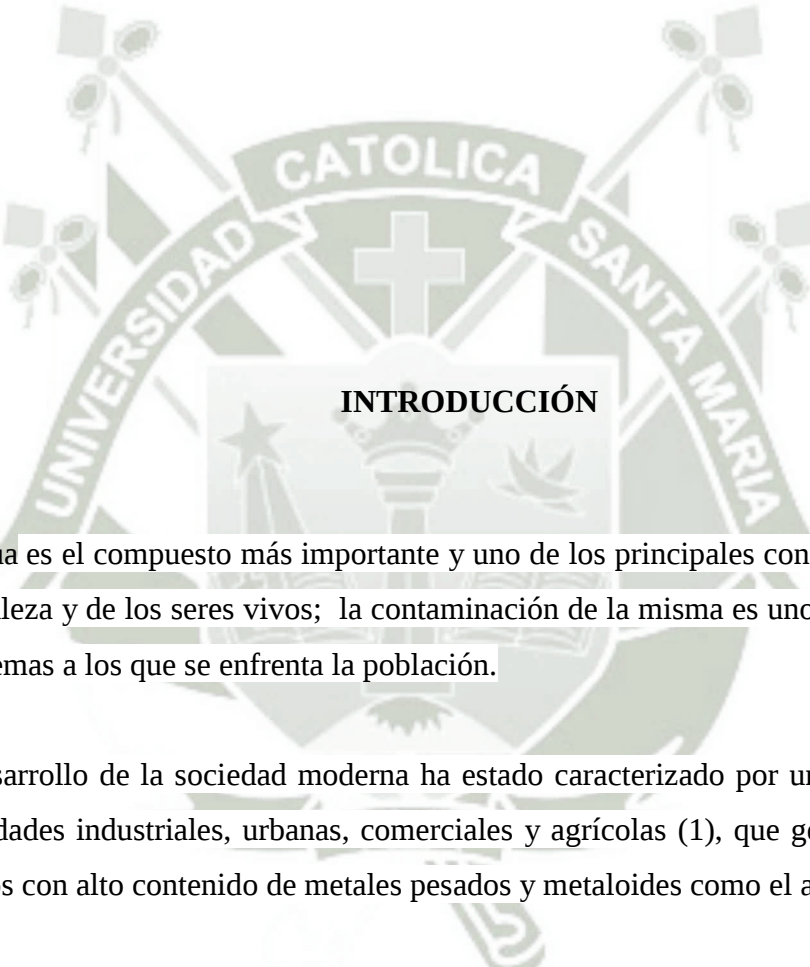
PALABRAS CLAVE: Fitorremediación, *Chenopodium album* (Liccha), arsénico, fitoextracción y rizofiltración.

ABSTRACT

Nowadays, the toxicity of arsenic in water is increasing significantly due to the massive industrial release accumulated in the environment, affecting human health causing teratogenic and lethal carcinogenic damage. This research aims to determine the phytoremediation capacity of *Chenopodium album* (Liccha), in waters contaminated with arsenic. First, the vegetative propagation of the species was carried out by cuttings. Then, the optimal growth conditions were determined, testing 3 concentrations of Hoagland's hydroponic solution (25, 50 and 100%); being the optimum at 25%, under ambient conditions of 8 - 21 ° C and pH of 6.8. After, phytotoxicity tests were made, analyzing 3 concentrations of 5, 10 and 15 mg.L⁻¹ of arsenic, evaluating the symptoms observed during 19 days through a table of toxicity degrees; determining in this way, the maximum concentration, to which the plant presented greater resistance and accumulation: 10 mg.L⁻¹; at the highest concentration, symptoms of chlorosis and early senescence were shown. Finally, the bioaccumulation test was carried out by triplicate in an aeroponic system; with one treatment T1 (10 mg.L⁻¹) and a control (0 mg.L⁻¹), evaluating the accumulated concentration of arsenic every 5 days, for 30 days, using the Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry technique ICP - OES, previous validation of the analytical method. Presenting a maximum accumulation at 20 days, in the radicular and aerial part: 694,802 ± 2,450 mg.kg⁻¹ and 1050,373 ± 0.879 mg.kg⁻¹, respectively; being a hyperaccumulating arsenic plant.

Chenopodium album, has arsenic phytoextraction and rhizofiltration capacity, since it accumulated the metalloid in the aerial and radicular part; being able to be employed in phytoremediation processes of waters highly contaminated with it.

KEY WORDS: Phytoremediation, *Chenopodium album* (Liccha), arsenic, phytoextraction and rhizofiltration.



INTRODUCCIÓN

El agua es el compuesto más importante y uno de los principales constituyentes de la naturaleza y de los seres vivos; la contaminación de la misma es uno de los mayores problemas a los que se enfrenta la población.

El desarrollo de la sociedad moderna ha estado caracterizado por un incremento de actividades industriales, urbanas, comerciales y agrícolas (1), que generan desechos tóxicos con alto contenido de metales pesados y metaloides como el arsénico.

El arsénico es un metaloide traza que se encuentra en casi todos los ambientes (2); viéndose su toxicidad, aumentada significativamente en el agua (3, 4). Actualmente, las poblaciones, especialmente de los países en desarrollo, están expuestas crónicamente a esta contaminación (5, 6); éste afecta a la salud humana, causando cáncer de vejiga, pulmón y piel (6), así como daños al hígado, riñones, sistema cardiovascular y nervioso (5).

El aumento de los costos y la limitada eficacia de los tratamientos fisicoquímicos han estimulado el desarrollo de nuevas tecnologías (7). Por lo que, la fitorremediación representa una alternativa sustentable para la descontaminación del medio ambiente, mediante el uso de plantas que tienen la capacidad de asimilar, metabolizar o degradar agentes orgánicos e inorgánicos del entorno, sea suelo, aire o agua (8).

Por esto, el presente trabajo, tiene como objetivo determinar la capacidad fitorremediadora de *Chenopodium album* (Liccha) en agua sintética contaminada con arsénico.



ABREVIATURAS

As: Arsénico.

ICP-OES: Espectrofotometría de plasma acoplado inductivamente.

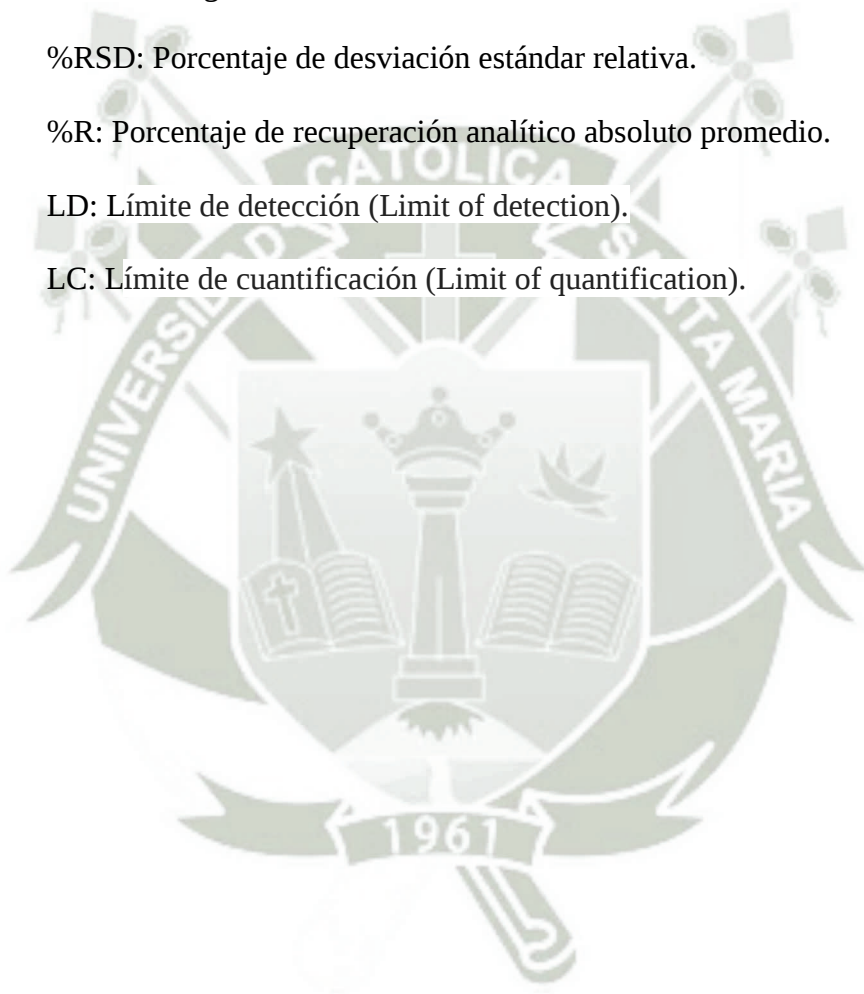
ICH: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements
for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.

%RSD: Porcentaje de desviación estándar relativa.

%R: Porcentaje de recuperación analítico absoluto promedio.

LD: Límite de detección (Limit of detection).

LC: Límite de cuantificación (Limit of quantification).



ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN

ABREVIATURAS

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I

OBJETIVOS	1
OBJETIVO GENERAL.....	1
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
HIPÓTESIS	3

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. CONTAMINACIÓN POR METALOIDES.....	4
1.1.1. ARSÉNICO.....	5
1.2. TECNOLOGÍAS DE FITORREMEDIACIÓN.....	8
1.3. <i>Chenopodium album</i> L. (LICCHA).....	10
1.4. ESPECTROFOTOMETRÍA DE PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE (ICP – OES).....	11

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
2.1. CAMPO DE INVESTIGACIÓN.....	13
2.2. MATERIALES	14

2.3. METODOLOGÍA.....	15
2.3.1. Recolección de material vegetal.....	15
2.3.2. Identificación de la especie vegetal.....	15
2.3.3. Propagación de <i>Chenopodium album</i> L.	15
2.3.4. Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de <i>Chenopodium album</i> L.	16
2.3.5. Validación del método analítico para determinación de arsénico	17
2.3.6. Ensayo de fitotoxicidad.....	20
2.3.7. Ensayo de bioacumulación.....	22
2.3.8. Tratamiento y digestión de muestras.....	22
2.3.9. Determinación de arsénico por el método ICP – OES.....	23
2.3.10. Diseño experimental.....	23
 CAPÍTULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
3.1. Identificación de la especie vegetal	26
3.2. Propagación de <i>Chenopodium album</i> L.	26
3.3. Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de <i>Chenopodium album</i> L.	27
3.4. Validación del método analítico	29
3.5. Ensayo de fitotoxicidad	34
3.6. Ensayo de bioacumulación	38
 CONCLUSIONES.....	45
 RECOMENDACIONES.....	47
 BIBLIOGRAFÍA.....	48
 ANEXOS.....	57

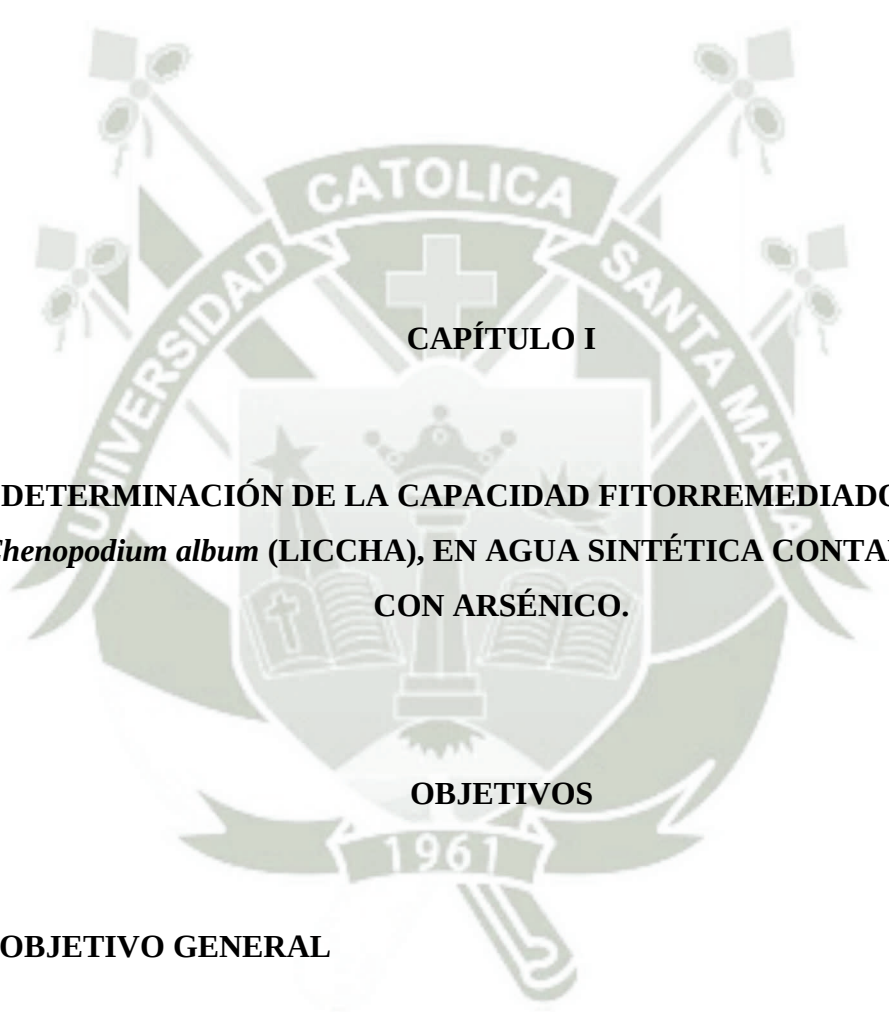
ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. <i>Chenopodium album</i> L. (Liccha).....	11
FIGURA 2. Esquema del equipo ICP.OES.....	12
FIGURA 3. Representación gráfica de la linealidad del método para la determinación de arsénico.	31
FIGURA 4. Curva de bioacumulación de arsénico de la parte radicular y aérea de <i>Chenopodium album</i>	39
FIGURA 5. Plantas de <i>Chenopodium album</i> después de los 30 días de bioacumulación.....	41



ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.	Sistema de adaptación	16
TABLA 2.	Preparación de estándares	17
TABLA 3.	Escala de grados de toxicidad.	21
TABLA 4.	Tratamiento de fitotoxicidad de arsénico.	24
TABLA 5.	Tratamiento de bioacumulación de arsénico.	25
TABLA 6.	Intensidad de estándares	30
TABLA 7.	Precisión: desviación estándar y porcentaje de coeficiente de variación.....	32
TABLA 8.	Porcentaje de recuperación analítico absoluto promedio	33
TABLA 9.	Escala de toxicidad a diferentes concentraciones de arsénico en <i>Chenopodium album</i>	35
TABLA 10.	Bioacumulación de arsénico en la parte radicular y aérea de <i>Chenopodium album</i>	37
TABLA 11.	Bioacumulación de arsénico en <i>Chenopodium album</i>	38
TABLA 12.	Análisis estadístico para el tratamiento T1 (parte radicular y aérea). ...	42



CAPÍTULO I

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD FITORREMEDIADORA DE *Chenopodium album* (LICCHA), EN AGUA SINTÉTICA CONTAMINADA CON ARSÉNICO.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

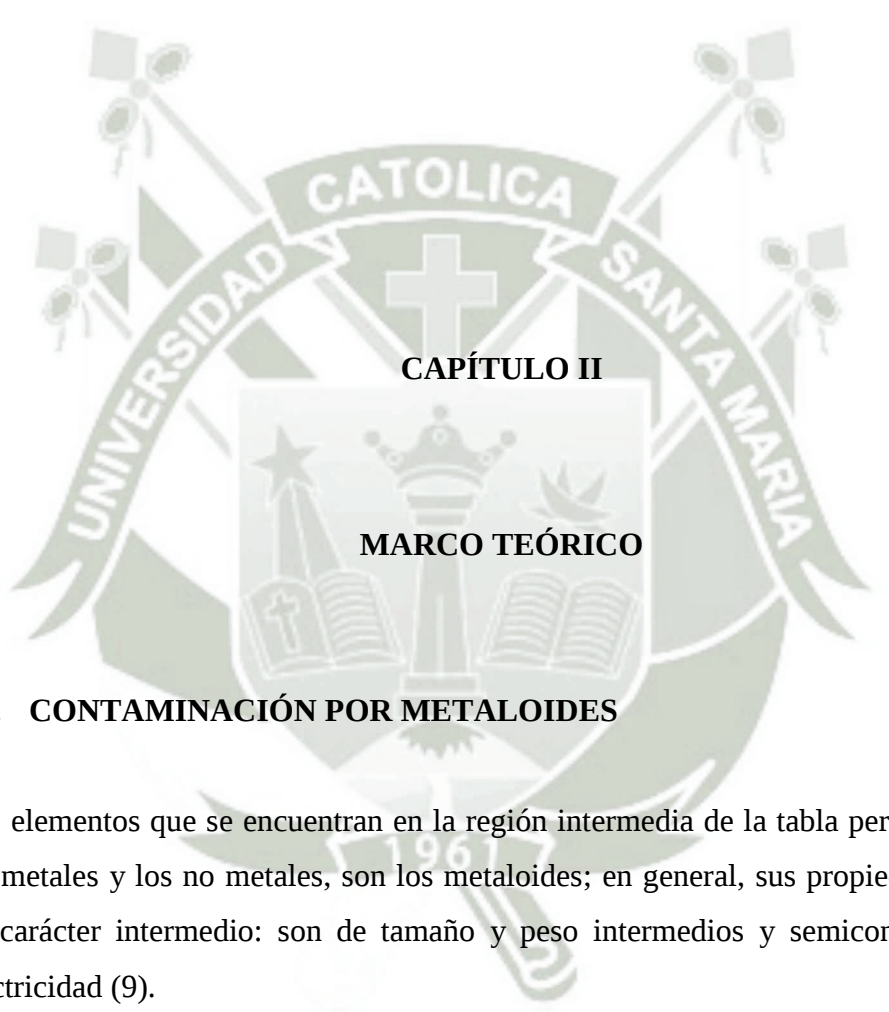
Determinar la capacidad fitorremediadora de *Chenopodium album* L.
(Liccha) en agua sintética contaminada con arsénico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las condiciones óptimas de crecimiento de *Chenopodium album* L. (Liccha), empleando un sistema de cultivo hidropónico, bajo condiciones ambientales.
- Validar el método analítico de espectrofotometría de plasma acoplado inductivamente (ICP – OES) para la determinación de arsénico.
- Determinar el nivel de tolerancia de *Chenopodium album* L. (Liccha); frente a diferentes concentraciones de arsénico, mediante ensayos de fitotoxicidad.
- Determinar el potencial de bioacumulación de arsénico, de *Chenopodium album* L. (Liccha), según su distribución.

HIPÓTESIS

Debido a que diversos estudios demuestran la capacidad de bioacumulación de metales pesados de *Chenopodium album* L. (Liccha), es posible la fitorremediación de agua sintética contaminada con arsénico.



CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

1.1. CONTAMINACIÓN POR METALOIDES

Los elementos que se encuentran en la región intermedia de la tabla periódica, entre los metales y los no metales, son los metaloides; en general, sus propiedades tienen un carácter intermedio: son de tamaño y peso intermedios y semiconductores de electricidad (9).

Los metales y metaloides muestran una elevada tendencia a bioacumularse y a biomagnificarse a través de su paso por los distintos eslabones de las cadenas tróficas. El término bioacumulación significa la acumulación neta en un organismo de metales provenientes de fuentes bióticas o abióticas (10); la

biomagnificación significa la acumulación progresiva de los tóxicos de uno a otro nivel trófico sucesivo (11).

En concentraciones elevadas, la acumulación de estos tóxicos ocasiona graves problemas en el desarrollo, crecimiento y reproducción de los seres vivos (12).

Los mecanismos de tolerancia varían entre las distintas especies de plantas y están determinados por el tipo de metal, eficiencia de absorción, traslocación y secuestro (13).

1.1.1. ARSÉNICO

El arsénico (As) es un metaloide de color gris metálico o amarillo de número atómico 33. Muy ubicuo, está presente tanto en aguas subterráneas como superficiales y también en suelos. Se encuentra en diferentes formas químicas (metilado, unido a azúcares) y estados de oxidación (-3, 0, +3, +5), siendo los más encontrados las formas aniónicas de arsenito (AsO_2^-) y arseniato (AsO_4^{3-}).

El aumento de las concentraciones de arsénico en las aguas subterráneas es alarmante debido al riesgo para la salud de las plantas, los animales y los humanos (14). Se encontraron niveles más altos de arsénico en las fuentes de agua subterránea que en las fuentes de agua superficial. Muchos países de todo el mundo (incluidos Taiwán, Argentina, India, Bangladesh, México, Hungría y Chile) han informado de una contaminación extensa del agua subterránea con arsénico (15). El uso de agua contaminada para riego de cultivos puede conducir a la contaminación por arsénico de los suelos agrícolas.

Las concentraciones de arsénico en el suelo y el medio ambiente se deben a actividades naturales y antropogénicas: Por fuentes naturales, las altas concentraciones en acuíferos pueden deberse a la desorción de arsénico de los óxidos de Fe y Mn, a la meteorización de los minerales de silicato primarios y a la alcalinidad de las reacciones de silicato y carbonato (16).

La contaminación antropogénica de arsénico en el suelo puede ser resultado de la extracción, molienda y fundición de minerales de cobre, plomo y sulfuro de zinc, residuos de curtido de piel, colorantes, armas químicas, galvanoplastia, gases de escape, lodos municipales, combustibles fósiles y el uso agrícola de los plaguicidas arsenicales (17, 18) .

Las normas recomendadas por la Organización mundial de la salud (OMS), permite una concentración máxima para el agua potable y efluentes industriales, de 0.01 mg.L⁻¹, aunque se recomienda no superar los 0,005 mg.L⁻¹ en el agua potable. El aporte global de arsénico a los suelos por los seres humanos en la última década se estimó entre 52.000 y 112.000 ton.año⁻¹ (19).

El riesgo del arsénico está asociado con las formas que están biológicamente disponibles para la absorción o "biodisponibles" para las plantas y los seres humanos. Un químico biodisponible es la porción de una dosis química que ingresa a la circulación sistémica a partir de una dosis administrada (20).

Toxico cinética

- **Absorción**

La vía más importante es la respiratoria, por inhalación. Por esta vía su absorción está condicionada por el tamaño de las partículas, por su solubilidad y por la forma química del compuesto.

En el aire predomina el arsenito en forma de partículas y su inhalación sigue las pautas de los aerodispersoides: las partículas más grandes se depositan en el tracto respiratorio superior y desde allí pueden ser removidas por las vibrisas o por el moco hacia el exterior o al tubo digestivo y en este, dependiendo de su solubilidad, se absorben bien.

En el pulmón, las partículas menores de 7 µm se absorben entre 75 y 85% (21).

El arsenito es más soluble en lípidos; el arseniato se absorbe mejor por el intestino y la absorción de ambos a lo largo de la vía digestiva, disueltos en agua, llega a 95% (22).

Por la vía cutánea, el arsénico húmedo se absorbe bien; pero seco, su absorción disminuye al 2% (23).

- **Distribución**

Luego de ser absorbido, el arsénico pasa a la sangre y se une a las globulinas, para ser distribuido en 24 horas hacia órganos como hígado, pulmón, riñón y bazo, donde se acopla a grupos sulfhidrilo (-SH) de las proteínas, se acompleja y se acumula. En el tejido óseo, se produce una competencia con el fósforo, desplazándolo y acumulándose allí por mucho tiempo. Una pequeña cantidad atraviesa las barreras hematoencefálica y placentaria (24). En, aproximadamente 30 horas, se deposita en el cabello y uñas. La vida media del arsénico circulante, no acumulado, es de 6 horas; excretándose entre el 50-70% (25).

- **Cuadro clínico**

- En mucosas y piel: produce irritación, edema facial acompañado de melanosos y descamación, líneas de Mees en uñas (26), leucomelanodermias degenerando a hiperqueratosis palmo plantar o a enfermedad de Bowen y pueden terminar en carcinoma de piel (27).
- En el sistema nervioso: puede causar neuritis periférica simétrica, neuropatía dolorosa con parestesia en extremidades; así como encefalopatía, temblor y degeneración axonal (28).
- La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) lo considera como un elemento de comprobado efecto cancerígeno para el hombre (Grupo I);

produciendo cáncer al riñón, pulmón, en los sistemas linfático y hematopoyético (29) (30) (31).

1.2. TECNOLOGÍAS DE FITORREMEDIACIÓN

La fitorremediación consiste en el uso de plantas para remover, reducir, transformar, mineralizar, degradar, volatilizar o estabilizar contaminantes (32); así como para remediar in situ suelos, sedimentos, agua y aire contaminados por desechos orgánicos, metales pesados o metaloides, eliminando los contaminantes del ambiente o haciéndolos inocuos (33).

Las fases del proceso por el cual las plantas incorporan y acumulan los contaminantes son:

- Fase I:

Se da el transporte de los metales al interior de la planta, por difusión en el medio, mediante flujo masivo o por intercambio catiónico (34).

Este último se da porque la raíz posee cargas negativas en sus células, debido a la presencia de grupos carboxilo, que interaccionan con las positivas de los metales, produciéndose enlaces covalentes, creando un equilibrio dinámico facilitando el ingreso de los mismos (35).

- Fase II:

Ya dentro de la planta, las especies metálicas son secuestradas o acomplejadas mediante la unión a ligandos específicos. Entre los quelantes producidos por las plantas se encuentran dos clases de péptidos: fitoquelatinas y metalotioneínas (13). Las fitoquelatinas son ligandos, que tienen como sustrato al glutatión; éste, es un tripéptido constituido por 3 aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y

glicina (36). Las metalotioneinas son polipéptidos de unos 70-75 aminoácidos con un alto contenido en cisteína.

El alto contenido de cisteína que presentan estos ligandos, permite la formación de complejos mediante enlaces covalentes coordinados, la cisteína contiene grupos tiol (-SH), capaces de formar complejos con cationes. Tienen una marcada afinidad por las formas iónicas de Zn, Cd, Hg y Cu (37).

- Fase III:

Implica la detoxificación de la planta; mediante la retención de los complejos formados con los metales, en las vacuolas (38).

Las fitotecnologías se basan en los mecanismos fisiológicos básicos que tienen lugar en las plantas y en los microorganismos asociados a ellas, tales como: transpiración, fotosíntesis, metabolismo y nutrición.

Dependiendo del tipo de contaminante, las condiciones del sitio y el nivel de limpieza requerido; las tecnologías de fitorremediación se pueden utilizar como medio de contención (fitoestabilización, rizofiltración y fitoinmovilización) o eliminación (fitoextracción, fitovolatilización y fitodegradación) (39).

Mecanismos de fitorremediación (40).

- La fitoestabilización permite inmovilizar contaminantes en el suelo a través de su adsorción en las raíces o bien, por precipitación en la zona de la rizosfera (41). Se producen compuestos químicos en la interfaz suelo-raíz, que inactivan las sustancias tóxicas, reduciendo su biodisponibilidad (42).
- La rizofiltración utiliza las plantas para eliminar del medio hídrico contaminantes, mediante la adsorción, absorción y acumulación de los mismo, en sus raíces (43).

- La fitoextracción consiste en la absorción de metales contaminantes mediante las raíces de las plantas y su acumulación en tallos y hojas (44).
- La fitovolatilización se produce por plantas que absorben los contaminantes a través del agua, llegan hasta las hojas y se evaporan o volatilizan en la atmósfera (45). Mediante este proceso se han eliminado contaminantes como compuestos orgánicos volátiles (benceno, nitrobenceno, tolueno, etilbenceno y m-xileno), As, Se y Hg (46).
- En la fitodegradación las plantas y los microorganismos asociados a ellas degradan los contaminantes en productos inofensivos, empleando procesos enzimáticos, o en, mineralizarlos hasta CO₂ y H₂O (47).

1.3. *Chenopodium album* L. (LICCHA)

Clasificación taxonómica

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Caryophyllales*

Familia: *Chenopodiaceae*

Género: *Chenopodium*

Especie: *Chenopodium album*

Chenopodium album, conocida con diversos nombres comunes como cenizo, quihuilla o liccha, es un especie de hierba de la familia Chenopodiaceae (48).

La Liccha (*Chenopodium album* L.) es una planta anual con tallos de 10 – 150 cm, generalmente erectos, verdes o rojizos, muy ramificados y cubiertos de una pilosidad harinosa grisácea. Presentan hojas de un tamaño de 1-8 x 0.3-5.5 cm, de forma

rómbica y bordes irregulares, como se observa en la **FIGURA 1**. Tiene inflorescencias dimórficas y el fruto es un aquenio, con una semilla en su interior de 1.2 - 1.6 mm, de color negro; crece en zonas ruderales de campos de cultivo, desde el nivel del mar a los 1000 m de altitud (49).



FIGURA 1. *Chenopodium album* L. (Liccha)

Fuente: SEINet, Symbiota and several of the specimen databases.

1.4. ESPECTROFOTOMETRÍA DE PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE (ICP – OES).

El plasma de acoplamiento inductivo (ICP) es una fuente de ionización que junto a un espectrofotómetro de emisión óptico (OES) constituye el equipo del ICP-OES.

Fundamento

El esquema del fundamento del ICP – OES, se muestra en la **FIGURA 2**.

Primero, se realiza la introducción continua de muestra en estado líquido; ésta pasa a través de un sistema de nebulización, formándose un aerosol que es transportado por el argón hacia la antorcha del plasma ionizado, acoplado inductivamente por radio

frecuencia. En el plasma, debido a las altas temperaturas generadas (10000 K), los analitos son atomizados e ionizados (50). Cuando los átomos excitados vuelven a la posición de baja energía, se libera radiación que es detectada por el espectrofotómetro. Aquí, se determina la presencia y concentración de cada metal en la muestra, según su longitud de onda (51). Luego, la información es procesada por el sistema informático.

Con ésta técnica, se cuantifica la radiación emitida por los átomos excitados por el plasma y que se relaciona con su concentración (52)

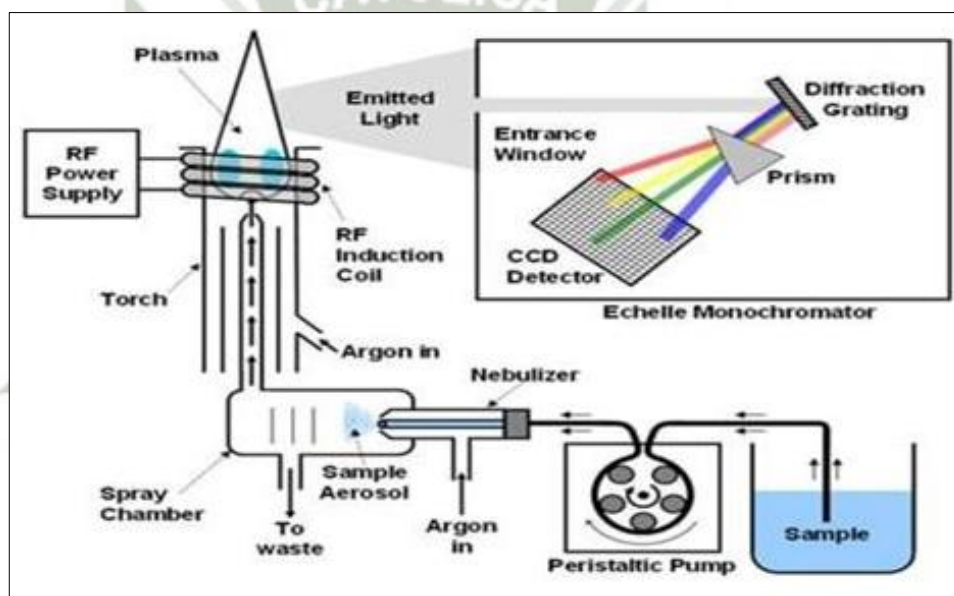


FIGURA 2. Esquema del equipo ICP.OES

Fuente: Inductively coupled plasma -optical emission spectrometer (ICP-OES) (51)



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. CAMPO DE INVESTIGACIÓN

2.1.1. Lugar de Experimentación

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo durante los meses de julio a octubre del 2017, en el laboratorio de Investigación H-202, el laboratorio H-203 y el laboratorio de Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María.

2.1.2. Unidad de Estudio

En este trabajo se utilizaron plántulas de *Chenopodium album* (Liccha) de 30 días de propagación. A partir de esquejes de una planta recolectada en el distrito de Cayma, en la ciudad de Arequipa.

2.1.3. Estrategia de Recolección de Datos

Los datos obtenidos, fueron analizados estadísticamente, mediante prueba de Fisher.

2.2. MATERIALES

2.2.1. Equipos

Balanza analítica OHAUS Pioneer® PA-214 (220 g, 0.0001 g), Digestor microondas MARS6 230/60 CEM One Touch™, Equipo Simplicity UV Merck™ (agua 18.2 MΩ), Espectrofotómetro de plasma acoplado inductivamente (ICP – OES) Perkin Elmer 5300, Micropipetas automáticas de 2-20 µL, 20-200 µL y 100-1000 µL Eppendorf® Research, pHmetro digital Metrohm® 827 pH Lab, Refrigeradora, Sistema de digestión UV 705 UV Digester Metrohm™.

2.2.2. Material vegetal

Chenopodium album L. (Liccha), recolectada de los campos de cultivo agrícola del distrito de Cayma, departamento de Arequipa.

2.2.3. Material de vidrio

Bagueta, Fiolas (10 mL, 25 mL y 500 mL), Pipetas graduadas (1 mL, 2 mL y 10 mL), Pipetas volumétricas (1 mL y 10 mL), Probeta graduada (50 mL), Recipientes rectangulares de vidrio (12 x 25 x 30 cm), Vasos de precipitados (50 mL, 100 mL y 250 mL).

2.2.4. Reactivos

Ácido nítrico 65%. Merck®, Agua destilada, Agua ultrapura (18.2 MΩ), Arseniato disódico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Solución estándar de arsénico (V).

Grado HPLC Merck®, Solución hidropónica de Hoagland La Molina® (Solución A y B). Universidad Agraria La Molina.

2.2.5. Otros

Bandejas de poliestireno expandido (tecnopor), Bombas difusoras de peceras, Espátula de plástico, Filtros de membrana de acetato de celulosa 0.22 μ m, Gradilla para tubo de ensayo, Guantes de látex, Jeringas de 10 mL, Micropipetas (0.2 mL, 1 mL), Papel aluminio, Papel kraft, Porta filtro JH 1355, Recipientes de plástico pequeños, Tips de 5-20 μ L y de 100-1000 μ L, Vasos de digestión de teflón de 20 mL.

2.3. METODOLOGÍA

2.3.1. Recolección de material vegetal

Las plantas de *Chenopodium album*, fueron recolectadas de los campos de cultivo del distrito de Cayma, departamento de Arequipa. Así mismo, se cortaron tallos de plantas sanas, y se reservaron para la propagación.

2.3.2. Identificación de la especie vegetal

La especie recolectada se llevó al HERBARIUM AREQUIPENSE (HUSA), para su identificación y respectiva caracterización taxonómica.

2.3.3. Propagación de *Chenopodium album* L.

Se realizó la propagación vegetativa por esquejes. Para esto, se seleccionaron plantas sanas y jóvenes, y se lavaron con Hipoclorito de sodio al 5% para la eliminación de bacterias y hongos impregnados. Luego, se procedió al corte de fragmentos de tallo (esquejes), sembrándolos en bandejas con tierra húmeda estéril, para su propagación durante 20 días, hasta el desarrollo completo de las plántulas.

2.3.4. Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de *Chenopodium album* L.

Para el crecimiento de las plántulas, éstas se adaptaron en un medio líquido. Se estableció un sistema de cultivo hidropónico bajo condiciones ambientales. Se empleó la solución nutritiva La Molina®, una solución hidropónica de Hoagland elaborada por la Universidad Nacional Agraria La Molina. Compuesta por 2 soluciones concentradas, denominadas A y B; con una proporción de: 5 mL de solución concentrada A y 2 mL de la solución concentrada B en un litro de agua. Ésta solución hidropónica contiene: 210 mg.L⁻¹ de potasio, 190 mg.L⁻¹ de nitrógeno, 150 mg.L⁻¹ de calcio, 70 mg.L⁻¹ de sodio, 45 mg.L⁻¹ de magnesio, 35 mg.L⁻¹ de fósforo, 1 mg.L⁻¹ de hierro, 0.50 mg.L⁻¹ de manganeso y boro, 0.15 mg.L⁻¹ de zinc, 0.10 mg.L⁻¹ de cobre y 0.05 mg.L⁻¹ de molibdeno (53).

Se realizó un ensayo de adaptación, probando 3 tratamientos, con concentraciones diferentes de solución nutritiva de Hoagland (25, 50 y 100%), variando los volúmenes de las soluciones A y B, como se muestra en la **TABLA 1**.

TABLA 1. Sistema de adaptación

TRATAMIENTOS	SOL. HOAGLAND	SOL. A	SOL. B
T1	25%	1.25 mL	0.5 mL
T2	50%	2.5 mL	1 mL
T3	100%	5 mL	2 mL

Luego, se colocaron 5 plántulas en bandejillas sumergidas en la solución nutritiva, durante un periodo de 15 días y se eligió el mejor sistema.

Posteriormente, se estableció el sistema a la concentración escogida de solución nutritiva, sumergiendo las plántulas por un tiempo de adaptación de 10 días.

2.3.5. Validación del método analítico para determinación de arsénico

El análisis se realizó en el Laboratorio de Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María, empleando el equipo Espectrofotómetro de plasma acoplado inductivamente (ICP – OES) Perkin Elmer 5300.

Se creó un método para la determinación de arsénico. Los parámetros evaluados para la validación del método fueron: linealidad, precisión, exactitud, y límite de detección y cuantificación; según los lineamientos ICH (54).

Se prepararon 6 estándares enrasados a 25 mL, a partir de una solución stock de 100 mg.L⁻¹ de arsénico, según la **TABLA 2**.

TABLA 2. Preparación de estándares

ESTÁNDARES	CONCENTRACIÓN*	VOLUMEN DE SOL. STOCK†
1	0.40	0.10
2	1.00	0.25
3	2.00	0.50
4	3.00	0.75
5	4.00	1.00
6	6.00	1.50

(*): Concentración expresada en unidades de mg.L⁻¹, (†): volumen expresado en unidades de mL.

- **Linealidad**

Se construyó una curva de calibración de absorbancia vs concentración, utilizando 6 puntos, los 6 estándares preparados de concentraciones de arsénico. Cada punto se evaluó por triplicado, los datos se procesaron estadísticamente con la prueba de regresión lineal; así mismo, se determinó el coeficiente de correlación lineal (r), el coeficiente de determinación (r^2), el intercepto (a) y la pendiente (b) para el 95% de confianza.

- **Precisión**

Se tomó en cuenta la repetitividad, se registraron 6 mediciones de una concentración de 2 mg.L^{-1} de arsénico, bajo las mismas condiciones (operador, aparato, laboratorio y en corto intervalo de tiempo). Se calculó la desviación estándar y el porcentaje de coeficiente de variación (% RSD).

- **Exactitud**

La exactitud se expresó en términos de porcentaje de recuperación analítico absoluto promedio; para esto, se realizaron 3 mediciones de una concentración de 3 mg.L^{-1} de arsénico. Para determinar el porcentaje de recuperación se utilizó la siguiente fórmula:

$$R = \frac{\bar{X}}{X} \times 100, \text{ donde:}$$

R: Recuperación (%)

$\bar{X}$: Valor práctico (mg.L^{-1})

X: Valor teórico verdadero (mg.L^{-1})

- **Límite de detección y cuantificación**

- **Límite de detección:**

Se refiere a la mínima concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra. Para ello se utilizó la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b \times \sqrt{n}}, \text{ donde:}$$

Y_{bl} : Respuesta del blanco.

S_{bl} : Desviación estándar del blanco.

b : pendiente de la recta.

n : número de muestras.

- **Límite de cuantificación:**

Se refiere a la mínima concentración de analito que puede ser detectada con fiabilidad, y cuantificada en una muestra. Para ello, se empleó la siguiente ecuación:

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b \times \sqrt{n}}, \text{ donde:}$$

Y_{bl} : Respuesta del blanco.

S_{bl} : Desviación estándar del blanco.

b : pendiente de la recta.

n : número de muestras.

2.3.6. Ensayo de fitotoxicidad

Se realizaron 3 tratamientos por triplicado: T1, T2, T3; con diferentes concentraciones de arsénico empleando una solución de Arseniato disódico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) de 1000 mg.L^{-1} ; cada tratamiento contó con tres plántulas de *Chenopodium album*.

Y un control, sin concentración alguna del contaminante; el tratamiento T1 con una concentración de 5 mg.L^{-1} de arsénico, el tratamiento T2 con 10 mg.L^{-1} de arsénico, y por último, el tratamiento T3 con 15 mg.L^{-1} de arsénico.

Las diluciones se prepararon con la solución de Hoagland seleccionada en el ensayo de adaptación, en envases de plástico por separado. Luego, se colocó una plancha de poliestireno con 3 plantas de *Chenopodium album* L., previa adaptación de las mismas; en cada envase.

Se realizó un diagnóstico visual para determinar el nivel de tolerancia de *Chenopodium album*, mediante grados de toxicidad mostrados en la **TABLA 3**; se realizaron observaciones periódicas evaluando las características cualitativas (síntomas) cada 3 días, durante un periodo de 19 días.

Al finalizar el tratamiento, se analizó la concentración final de arsénico acumulado en las plantas, mediante el método ICP-OES; para así obtener la concentración máxima de tolerancia y resistencia para ser empleada en el ensayo final de bioacumulación.

TABLA 3. Escala de grados de toxicidad.

GRADOS DE TOXICIDAD	DESCRIPCIÓN
Grado 1 (G1)	P. radicular: No se observaron síntomas. P. aérea: No se observaron síntomas.
Grado 2 (G2)	P. radicular: No se observaron síntomas. P. aérea: Tercio inferior con áreas cloróticas, tercio medio y superior no se observaron síntomas.
Grado 3 (G3)	P. radicular: No se observaron síntomas. P. aérea: Tercio inferior con clorosis y/o arrugamiento de hojas, tercio medio con áreas cloróticas.
Grado 4 (G4)	P. radicular: No se observaron síntomas. P. aérea: Tercio inferior con inicios de senescencia, tercio medio con clorosis y arrugamiento, tercio superior sin síntomas.
Grado 5 (G5)	P. radicular: No se observaron síntomas. P. aérea: Tercio inferior con senescencia en su totalidad y abscisión de hojas. El tercio medio con senescencia y formación de nuevos brotes axilares, tercio superior con brotes.
Grado 6 (G6)	P. radicular: No se observaron síntomas. P. aérea: Tercio inferior con senescencia en su totalidad y abscisión de hojas, tercio medio y superior con senescencia en su totalidad y abscisión de hojas.

2.3.7. Ensayo de bioacumulación

El experimento se realizó por triplicado en recipientes de vidrio (12 x 25 x 30 cm). Se consideró la concentración tolerante de arsénico, determinada en el ensayo previo de fitotoxicidad.

Se estableció un sistema de aeroponía, colocando tubos difusores conectados a bombas peristálticas para burbujear aire y mantener en movimiento constante el sistema. Finalmente, se sumergieron bandejillas con 10 plántulas de *Chenopodium album*, de 7 cm de altura, por cada recipiente.

2.3.8. Tratamiento y digestión de muestras.

- Pre-secado de muestras:

Las plantas fueron tomadas del sistema aeropónico, lavadas con abundante agua destilada y colocadas en papel kraft por 24h.

- Secado de muestras:

Luego del pre-secado, las plantas se seccionaron en parte aérea y radicular para proceder al secado; se llevaron a estufa a 60° C durante 24 horas, para así, poder digerir las muestras tratadas.

- Digestión por microondas:

Las muestras fueron trituradas, se pesaron 100 mg de la parte aérea y de la parte radicular, y se colocaron en los tubos de digestión; luego, se agregaron 2 mL de ácido nítrico supra puro (HNO₃) y finalmente, se llevaron al Digestor microondas MARS 6 230/60 CEM One Touch™.

2.3.9. Determinación de arsénico por el método ICP – OES.

Se estimó el contenido del metaloide mediante la técnica ICP-OES.

Se realizaron 6 determinaciones por triplicado cada 5 días, durante 30 días. Las plantas a analizar, se seleccionaron al azar.

Las muestras se analizaron en el laboratorio de Control de calidad de la Universidad Católica de Santa María.

2.3.10. Diseño experimental

- **Fitotoxicidad**

En la **TABLA 4**, se observa el diseño experimental utilizado para el ensayo de fitotoxicidad, siendo 3 tratamientos por triplicado.

Tratamientos T1, T2 y T3 con 5, 10 y 15 mg.L⁻¹ de arsénico; y un control con 0 una concentración nula del metaloide. Teniendo así un total de 12 unidades experimentales

- **Bioacumulación**

Como se muestra en la **TABLA 5**, el experimento de bioacumulación, constó del tratamiento T1, por triplicado, con la concentración máxima de tolerancia X mg.L⁻¹ de arsénico, obtenida en el ensayo previo de fitotoxicidad; y un control, con una concentración de 0 mg.L⁻¹ de arsénico.

Teniendo así un total de 6 unidades experimentales, cada una constituida por 10 plántulas de *Chenopodium album L.* (Liccha).

TABLA 4. Tratamiento de fitotoxicidad de arsénico.

TRATAMIENTOS	ENSAYOS	PLÁNTULAS
CONTROL (*)	1	3
	2	3
	3	3
	4	3
T1 (†)	5	3
	6	3
	7	3
T2 (‡)	8	3
	9	3
	10	3
T3 (§)	11	3
	12	3

(*): 0 mg.L^{-1} , (†): 5 mg.L^{-1} , (‡): 10 mg.L^{-1} , (§): 15 mg.L^{-1} .

TABLA 5. Tratamiento de bioacumulación de arsénico.

TRATAMIENTOS	ENSAYOS	PLÁNTULAS
CONTROL (*)	1	10
	2	10
	3	10
	4	10
	5	10
	6	10

(*): 0 mg.L^{-1} , (†): $X \text{ mg.L}^{-1}$.



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Identificación de la especie vegetal

Se identificó la especie vegetal en el HERBARIUM AREQUIPENSE (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa; mediante la constancia N° 17-2017-HUSA (**ANEXO 1**), se determinó que la especie vegetal presentada correspondía a *Chenopodium album* L. (Liccha).

3.2. Propagación de *Chenopodium album* L.

Las plantas de *Chenopodium album* tienen una reproducción sexual y asexual; en este trabajo, se empleó la vía asexual o vegetativa, mediante la técnica de propagación por esquejes.

Se sembraron 100 esquejes, fragmentos de tallo; observando el crecimiento de todas las plántulas, con estructuras completas de raíz, tallo y hojas.

La propagación por esquejes, es uno de los métodos de producción asexual más utilizados; se puede cultivar distintas especies vegetales en un espacio limitado a partir de una planta madre. Éste es un método poco costoso, rápido y sencillo, ya que no se necesita técnicas especiales (55). Los esquejes por lo general responden bien al trasplante, tienen un porcentaje elevado de supervivencia, y se consideran como una de las mejores bases para alcanzar plantas de calidad (56); y para una producción homogénea de clones (57), a través de divisiones mitóticas de la célula, perpetuando de ésta forma sus características específicas (58).

En la actualidad; no existen trabajos que hayan realizado la propagación de *Chenopodium album* L., por esquejes o de alguna otra maleza.

Sin embargo se presentan datos de plantas ornamentales propagadas por este método, tal es el caso de la especie *Monttea chilensis*; el enraizamiento de sus esquejes de tallo es una forma efectiva de propagación, lo que aporta especial utilidad cuando se desea asegurar las características favorables de ciertos individuos, alcanzando hasta un 40% de enraizamiento (59). En contra posición, *Chenopodium album* presentó un 100% de enraizamiento, ya que al ser una maleza su estructura completa se desarrolla en áreas ruderales con poca humedad.

3.3. Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de *Chenopodium album* L.

En Arequipa, las temperaturas llegan por la noche a 5°C y durante el día a 23 °C en invierno; al ser una maleza, su amplia distribución por encima de los 1000 m de altitud, nos indica una alta tolerancia a climas con temperaturas medias que van de 5-30 ° C, resistiendo también las heladas nocturnas (60); creciendo a condiciones ambientales de 8 – 21 °C. Es por eso, que no fue necesario implementar un sistema invernadero para la adaptación y los ensayos de fitotoxicidad y bioacumulación, corroborando las ventajas de la técnica de fitorremediación y facilitando el escalamiento a nivel industrial, debido al costo.

Para la adaptación de las plántulas, se evaluaron tres tratamientos, con concentraciones diferentes de solución nutritiva de Hoagland con un pH de 6.8, durante un periodo de 15 días, bajo condiciones ambientales; siendo T1 la solución al 25%, T2 la solución al 50% y T3 la solución al 100%.

TABLA 6. Adaptación de *Chenopodium album*.

TRATAMIENTOS	DÍAS		
	5	10	15
T1*	Sin síntomas	Sin síntomas	Sin síntomas
T2†	Clorosis	Clorosis	Marchitamiento
T3‡	Marchitamiento y necrosis	-	-

(*): 25 %, (†): 50 %¹, (‡):100 %.

Como se observa en la **TABLA 6**, el tratamiento T1 presentó mejores resultados, a los 15 días se observó el crecimiento de la planta con la estructura completa sin observar cambios relevantes. En el tratamiento T2, se observaron inicios de clorosis a los 5 días de tratamiento, y marchitamiento a los 15 días. Y por último, en el tratamiento T3, las plántulas mostraron marchitamiento en la parte inferior del tallo y senescencia a los 6 días, con necrosis en las raíces. Esto probablemente a causa de un exceso de nutrientes

La hidroponía es una técnica de producción de cultivos en medio líquido, se emplea agua con elementos indispensables disueltos en ella (61), en donde los nutrientes minerales esenciales están disueltos de forma recirculante (NFT) o aeroponía (62).

La adaptación de *Chenopodium album*, se realizó en solución nutritiva hidropónica de Hoagland, debido a que los siguientes ensayos de fitotoxicidad y bioacumulación

de arsénico se efectuaron en medio líquido, para lograr homogeneidad y la correcta concentración del metaloide. Así también, ésta es una técnica sencilla, limpia y de bajo costo para producir vegetales de rápido crecimiento (63) como *Chenopodium album*, que es considerada una hierba mala.

Para producir el cultivo hidropónico de forraje verde se emplea la cuarta parte de la dosis normal de la solución de Hoagland de la Universidad Nacional Agraria La Molina (53); ya que *Chenopodium album* es una planta herbácea de pocos requerimientos nutritivos, asemejándose al forraje, se probaron diferentes diluciones de la solución, observando los síntomas producidos. La anormalidad visible causada por la deficiencia o el exceso de un determinado elemento, (síntomas) es el diagnóstico visual del estado nutricional de las plantas. Como regla, los síntomas de toxicidad de todos los elementos aparecen primero en las hojas más viejas. El diagnóstico foliar es considerado como un método destinado a evaluar el estado nutricional de las plantas y la necesidad de fertilizante de los cultivos, se sostiene que el diagnóstico foliar puede ser usado tanto como un medio para recomendar dosis de fertilizantes a aplicar, como para ajustar programas de fertilización, particularmente en cultivos perennes (64), como es el caso de *Chenopodium album*. El efecto nocivo de estos elementos se puede concentrar fácilmente en la zona de las raíces, cuando no existe un drenaje adecuado o cuando el agua de riego contiene también elementos tóxicos a la planta (65).

Actualmente, no existen trabajos que hayan realizado el cultivo hidropónico de *Chenopodium album*, ni de alguna otra maleza.

Como se obtuvieron mejores resultados con el tratamiento T1, se procedió a la adaptación de las plántulas en un medio al 25% de la solución de Hoagland.

3.4. Validación del método analítico

La validación de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados obtenidos por dicho método sean confiables. Se validó el método analítico

de ICP-OES, según la normativa ICH (54). Para ésta técnica se creó un método para determinar arsénico.

- **Linealidad**

La linealidad es la capacidad de un método analítico de dar un resultado proporcional a la concentración del analito ha determinar en la muestra.

Se realizaron mediciones de los 6 estándares preparados, registrando sus respectivas intensidades en la **TABLA 7**.

TABLA 7. Intensidad de estándares

ESTÁNDARES	CONCENTRACIÓN*	INTENSIDAD†
1	0.40	107.50
2	1.00	1120.90
3	2.00	2219.70
4	3.00	3390.80
5	4.00	4497.70
6	6.00	5822.10

(*): Unidad de concentración expresada en mg.L^{-1} , (†): Unidad de intensidad expresada en nA.

Con los datos de las intensidades obtenidas por el ICP-OES, se procedió a construir una curva de calibración (**FIGURA 3**) en función a la concentración de arsénico (mg.L^{-1}). En donde se muestra la representación gráfica de la linealidad del método para el arsénico.

En el análisis estadístico de regresión lineal, se obtuvo una ecuación lineal de estructura $y = bx + a$, siendo “a” el intercepto y “b” la pendiente; así como el coeficiente de correlación (r) y finalmente, el coeficiente de determinación (r^2).

El coeficiente de correlación (r) indica el grado de relación entre la variable (X) y (Y) de la curva de calibración; así, el coeficiente de determinación cercano a la unidad, indica mayor significancia estadística.

Siendo la ecuación: $y = 1131x - 0.8$, donde el intercepto (a) y la pendiente (b) tienen valores de 0.8 y 1131 respectivamente. Así, el coeficiente de correlación (r) tiene un valor de 0,9999, y el coeficiente de determinación (r^2) con un valor de 0,9999.

Según la normativa ICH se debe cumplir $r \geq 0.9990$ y $r^2 \geq 0.9800$ para dar validación del método, así mismo se verificó dicho cumplimiento, validando la linealidad del método.



FIGURA 3. Representación gráfica de la linealidad del método para la determinación de arsénico.

- **Precisión**

La precisión podría establecerse en términos de repetibilidad. El grado de precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión y se calcula como desviación estándar de los resultados. Se determinó la repetibilidad, registrando seis mediciones bajo las mismas condiciones (mismo operador, mismo equipo, mismo laboratorio y en cortos intervalos de tiempo). Así se calculó la desviación estándar y el porcentaje de coeficiente de variación.

De acuerdo con la normativa de validación ICH, el criterio de aceptación para repetibilidad es que el %RSD sea menor al 2%.

Los resultados muestran (**TABLA 8**) que se obtuvo un %RSD de 0.450; siendo menor al 2%, se dio por cumplido dicho requerimiento.

TABLA 8. Precisión: desviación estándar y porcentaje de coeficiente de variación.

MEDICIÓN	As*
1	2.005
2	1.995
3	1.989
4	1.995
5	1.981
6	1.993
Promedio	1.993
SD	0.008
%RSD	0.450

(*): Unidad de concentración expresada en mg.L^{-1}

- **Exactitud**

La exactitud se define como el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia. Una manera para determinar la exactitud es el porcentaje de recuperación analítico absoluto promedio, éste se determinó realizando 3 mediciones de una concentración de 3 mg.L^{-1} de arsénico.

De acuerdo con la normativa ICH, el criterio de aceptación para la exactitud es un valor de $95 \% < \% R < 103 \%$.

Los datos obtenidos se muestran en la **TABLA 9**, con un % Recuperación de 101.867 %. Por lo tanto, se validó que el método analítico es exacto para la determinación de arsénico.

TABLA 9. Porcentaje de recuperación analítico absoluto promedio

VALOR TEÓRICO*	3.000
	3.056
VALOR PRÁCTICO*	3.086
	3.062
Promedio*	3.065
%R	102.167

(*): Concentración del metaloide expresada en mg.L^{-1}

- **Límite de detección y cuantificación**

El límite de detección (LD) es la mínima concentración o masa del analito que puede ser detectada en un método dado. Mientras que el límite de cuantificación (LC) es la mínima concentración o masa del analito de un método determinado que se puede cuantificar.

Se determinó un límite de detección de $0.026 \mu\text{g.L}^{-1}$ de arsénico y un límite de cuantificación de $0.079 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Con esto, se concluyó que el método es capaz de detectar mínimas cantidades de arsénico; y sobre todo, es capaz de cuantificarlas, pudiendo ser efectivo en determinadas muestras.

3.5. Ensayo de fitotoxicidad

En este ensayo, se evaluó la toxicidad, mediante un diagnóstico visual, plasmando los resultados en base a una escala de 6 grados de toxicidad (G1 – G6) descritos anteriormente.

Para esto, se evaluaron concentraciones de 5, 10 y 15 mg.L^{-1} y un control (0 mg.L^{-1}), bajo las mismas condiciones; obteniendo así los resultados mostrados en la **TABLA 10**.

TABLA 10. Escala de toxicidad a diferentes concentraciones de arsénico en *Chenopodium album*.

ARSÉNICO								
TIEMPO	CONTROL ^(*)		T1 ^(†)		T2 ^(‡)		T3 ^(§)	
Días	P. Radicular	P. Aérea	P. Radicular	P. Aérea	P. Radicular	P. Aérea	P. Radicular	P. Aérea
0	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1
1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1
4	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G2
7	G1	G1	G1	G2	G1	G2	G1	G2
10	G1	G1	G1	G2	G1	G3	G1	G4
13	G1	G1	G1	G4	G1	G5	G1	G5
16	G1	G1	G1	G4	G1	G5	G1	G5
19	G1	G1	G1	G4	G1	G5	G1	G6

(^{*}): 0 mg.L⁻¹, ([†]): 5 mg.L⁻¹, ([‡]): 10 mg.L⁻¹, ([§]): 15 mg.L⁻¹.

Para emplear este método, primero, se aseguró que los cultivos de *Chenopodium album* se adecuaron a la solución nutritiva mediante los ensayos previos de adaptación; y que los nutrientes minerales disueltos en ella sean suficientes para proporcionarle el óptimo crecimiento. Así, los síntomas foliares y daños en la estructura solamente serían a causa de la concentración determinada de arsénico.

Como se muestra en la **TABLA 10**, el control presentó el grado (G1), al no mostrar síntomas de toxicidad en la parte radicular y aérea de la planta, debido a que tenía

una concentración nula de arsénico. Esto permitió tomar este tratamiento como control blanco.

En los tres tratamientos, las raíces no mostraron síntoma alguno en los 19 días. El tratamiento T1 mostró cambios leves a los 7 días, con una ligera clorosis; presentando inicios de senescencia en el tercio inferior a los 13 días. Con el tratamiento T2 empezaron los síntomas de clorosis en el tercio inferior igualmente a los 7 días, continuando con el tercio medio a los 10 días y terminando en senescencia, formación de nuevos brotes axilares y brotes en el tercio superior.

Walker, D.J., 2004, reportó que la especie *Chenopodium album* fue una de las primeras en habitar áreas vertidas con residuos de minas piríticas, contaminadas con arsénico (66), concluyendo así que esta especie es resistente a determinadas concentraciones demostrando su tolerancia y crecimiento.

Por el contrario, con el tratamiento T3 se iniciaron los síntomas de clorosis a los 4 días, siguiendo la parte inferior, media e inicios de senescencia a los 10 días; a los 16 días mostró senescencia completa y necrosis en la parte inferior, y a los 19 días senescencia en el tercio medio y superior con muerte de la planta.

Concluyéndose, que a la mayor concentración de arsénico, las plantas presentaron síntomas tempranos de toxicidad foliar y de tallo; causando senescencia, producida por la concentración elevada del metaloide.

El diagnóstico foliar puede ser usado para determinar la toxicidad de un elemento, particularmente en cultivos perennes (64). El análisis foliar, es el criterio más seguro para detectar el estado nutricional de especies perennes (67), dado que su propia naturaleza le confiere características diferenciales al de las plantas anuales (68).

Al finalizar los 19 días de tratamiento, se analizó la concentración de arsénico acumulado en las plantas tratadas (**TABLA 11**).

TABLA 11. Bioacumulación de arsénico en la parte radicular y aérea de *Chenopodium album*.

ARSÉNICO	P. RADICULAR ^(¶)	P. AÉREA ^(\\)
CONTROL*	1.774 ± 0.002	1.936 ± 0.002
T1 [†]	103.819 ± 0.001	104.839 ± 0.001
T2 [‡]	106.164 ± 0.002	253.333 ± 0.004
T3§	286.111 ± 0.001	277.957 ± 0.012

n = 3 (3 muestras), (*): 0 mg.L⁻¹, (†): 5 mg.L⁻¹, (‡): 10 mg.L⁻¹, (§): 15 mg.L⁻¹, (¶) y (\\): concentración del metal en la planta expresada en mg.kg⁻¹.

Se halló una acumulación máxima de 286.111 ± 0.001 mg.Kg⁻¹ de arsénico en la parte radicular y 277.957 ± 0.012 mg.Kg⁻¹ en la parte aérea, en el tratamiento T3. Pero al considerar el tratamiento T3 y evaluar su toxicidad; al presentar la mayor concentración, generó la muerte de la planta en un periodo corto, y no podría ser evaluada en el siguiente ensayo de bioacumulación. Por esto, se determinó que la concentración apropiada para llevar a cabo el siguiente ensayo final sería la del tratamiento T2.

El ensayo de toxicidad se realizó con la finalidad de determinar la concentración adecuada del metaloide, para llevar a cabo el ensayo de bioacumulación final; ésta, se refiere a la máxima concentración que la planta puede resistir y a la cual, tiene la capacidad de acumular la mayor cantidad del mismo en su interior; siendo ésta 10 mg.L⁻¹ de arsénico.

3.6. Ensayo de bioacumulación

En el ensayo de bioacumulación, se emplearon plántulas de 7 cm de altura, mostrando los resultados en la **TABLA 12**.

TABLA 12. Bioacumulación de arsénico en *Chenopodium album*.

TIEMPO ^(*)	P. RADICULAR ^(†)	P. AÉREA ^(‡)
0	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
5	100.303 ± 1.443	107.500 ± 0.682
10	293.610 ± 0.748	182.857 ± 0.036
15	622.989 ± 0.995	784.856 ± 1.201
20	694.802 ± 2.450	1050.373 ± 0.879
25	622.895 ± 2.605	703.980 ± 1.759
30	508.421 ± 4.466	175.000 ± 2.357

n= 3 (3 muestras), (): tiempo expresado en días, (†) y (‡): concentración del metal en la planta expresada en mg.kg⁻¹.*

Con los datos obtenidos, se procedió a realizar una gráfica (**FIGURA 4**), comparando la bioacumulación de arsénico en la parte radicular y aérea de la planta.

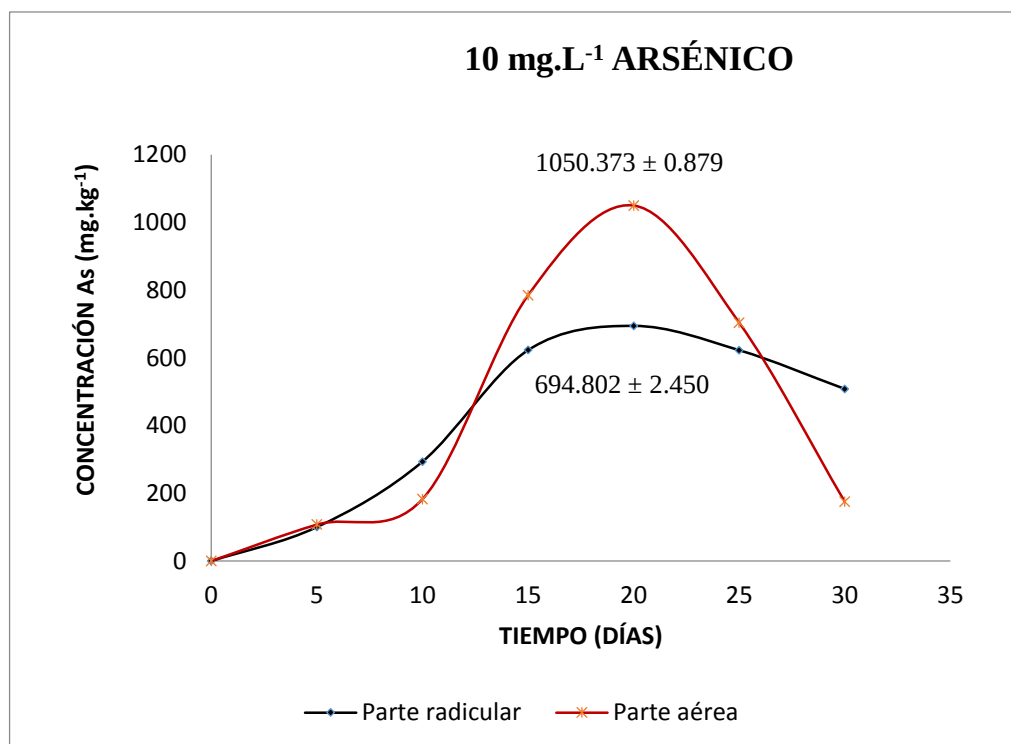


FIGURA 4. Curva de bioacumulación de arsénico en la parte radicular y aérea de *Chenopodium album*.

En el tratamiento T1 (TABLA 12 y FIGURA 4), en la parte radicular se presentó una absorción ascendiente considerable desde los 5 días de iniciado el ensayo, con una máxima acumulación de $694.802 \pm 2.450 \text{ mg.kg}^{-1}$ a los 20 días; iniciándose una decaimiento a los 25 días.

Por otro lado, en la parte aérea, se observó un comportamiento semejante; con una absorción creciente también desde el día 5; acumulando la mayor cantidad de arsénico $1050.373 \pm 0.879 \text{ mg.kg}^{-1}$ a los 20 días, mostrando un decaimiento a los 25 días. El decaimiento de concentración en las raíces y hojas, podría deberse a un proceso de desorción de la planta debido al saturamiento de la misma.

Siendo el tiempo de mayor capacidad de acumulación a los 20 días. Si se aplicara esta técnica con *Chenopodium album*, para el tratamiento de aguas contaminadas; las

plantas tendrían que retirarse antes de que inicien su proceso de desorción, esperando el tiempo indicado para su mayor acumulación.

Existe una gran cantidad de trabajos relacionadas con diversas plantas acuáticas, que tienen la capacidad de acumular arsénico descontaminando aguas, como: *Scirpus lacustris*, *Lemna gibba*, *Elatine Manda*, *Polygonum punctatum* (13) y *Azolla fuliculoides* (69). Así también, la especie *Chenopodium album*, tiene la capacidad de acumular arsénico de aguas contaminadas como se demuestra en este trabajo; pero ésta al ser una planta terrestre, podría ser empleada también en remediación de suelos contaminados.

Almagro, 2015, analizó la tolerancia de cinco especies de *Cistus* a metales pesados, mostrando que la concentración media de arsénico más alta registrada fue para *C. psilosepalus* y *C. monspeliensis* con un valor de 39 mg.Kg^{-1} (70). Así también, Pratas, 2005, investigó sobre plantas que crecen en minas portuguesas abandonadas, altamente contaminadas con arsénico, antimonio y tungsteno; estudiando su potencial de prospección biogeoquímica y estabilización de minas, mostrando que el arsénico podría ser acumulado en hojas de plantas de *Cistus ladanifer* con una absorción máxima de $2,770 \text{ mg.Kg}^{-1}$ (71). Al contrastar con los datos obtenidos en este trabajo; *Chenopodium album*, demostró una mayor capacidad de acumulación de arsénico con una absorción de más de 1000 mg del metaloide por Kg de planta.

Tomando el ejemplo de otras plantas y diversos metales; Víctor R. P., 2014, realizó investigaciones sobre la fitorremediación de cadmio y mercurio con la especie *Eichhornia Crassipes* (Jacinto de agua), enfatizando en los parámetros fisicoquímicos que influyeron en su capacidad remediadora; obteniendo un porcentaje de sorción de 16,56 % para Cd (II) y 15,6 % para el Hg (II) en un tiempo de 7 días (72). Por otro lado; Moogoue R., 2011, estudió el uso de otras plantas como *Calendula alata*, *Amaranthus chlorostachys* y *Chenopodium album*, para la remediación de Cs en solución, absorbiendo un 68% (73). En la presente investigación, se demostró una capacidad de sorción del 100 % del arsénico en

solución a una concentración alta de 10 mg.L^{-1} , empleando plantas en medio hidropónico.

Algunas especies, debido a su gran capacidad para acumular metales, reciben el nombre de hiperacumuladoras; por definición, estas plantas deben acumular al menos 100 mg.Kg^{-1} de arsénico o 1000 mg.Kg^{-1} (0.1% peso seco) de otros metales pesados (74). *Chenopodium album* presentó una acumulación aérea y radicular mucho mayor que 100 mg. Kg^{-1} , llegando hasta más de 1000 mg.Kg^{-1} de arsénico en hojas y tallo; siendo considerada como una planta hiperacumuladora de arsénico, pudiendo ser empleada en procesos de fitorremediación de aguas y suelos contaminados.

Al finalizar el tratamiento, las plantas crecieron hasta los 21 cm (**FIGURA 5**), demostrando la capacidad de acumulación y la alta resistencia de la misma, al absorber, translocar y acumular el arsénico.

Mientras mayor sea el tamaño de la planta, tendrá mayor espacio en donde acumular mayor cantidad de arsénico, siendo tolerante y captando más cantidad del metaloide estudiado.



FIGURA 5. Plantas de *Chenopodium album* después de los 30 días de bioacumulación.

Así también, se realizó la prueba estadística de Fisher (F), comparando los valores de acumulación de la parte radicular y aérea de la planta.

TABLA 13. Análisis estadístico para el tratamiento T1 (parte radicular y aérea).

TIEMPO(*)	F CALCULADO	F CRÍTICO A=0.05	VALOR P
5	3.151 E+01	18.513	3.030 E-02
10	2.906 E+04	18.513	3.441 E-05
15	1.193 E+04	18.513	8.379 E-05
20	3.731 E+04	18.513	2.680 E-05
25	1.331 E+03	18.513	7.506 E-04
30	8.719 E+03	18.513	1.147 E-04

(*): Tiempo expresado en días.

Como se observa en la **TABLA 13**, del día 5 al 30, se muestra que el $F_{\text{calculado}}$ es mayor que el $F_{\text{crítico}}$, y el valor P de la prueba F es menor que 0.05; por lo tanto se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la hipótesis alternativa, afirmando que las varianzas son heterogéneas.

Demostrándose, que existe una diferencia estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95%.

Así, la parte aérea presentó mayor capacidad de acumulación de arsénico que la parte radicular; concluyendo que la planta *Chenopodium album*, emplea el proceso de fitoextracción principalmente, y adicionalmente el de rizofiltración, para remover arsénico de aguas contaminadas (43, 44).

Según Burló (1999), la traslocación del arsénico desde las raíces a los tallos es ineficiente; como mostró en sus estudios de tomate expuesto a arsénico inorgánico (75). Así también, Zhao (2010), afirma que la translocación a la parte aérea de los complejos As (III)-PC o As (III)-GS, es un hecho muy poco probable ya que éstos son inestables a pHs mayores a 7.5 y el interior del floema tiene pH alcalino (76). Por el contrario, en esta investigación se demuestra la alta capacidad de traslocación de la especie *Chenopodium album*; ya que presenta mayor acumulación en la parte aérea de la planta, absorbiendo $1050.373 \pm 0.879 \text{ mg.kg}^{-1}$ en su tallo y hojas.

Esta capacidad de acumulación de metales tóxicos de diversas plantas, se explica a continuación:

Dado que los metaloides pueden llegar a ser tóxicos en niveles más altos; las plantas han desarrollado una regulación estricta para absorber, trasladar y almacenar dichos contaminantes dentro de rangos fisiológicos. A pesar de la selectividad de los sistemas de transporte, los metales no esenciales y metaloides como el arsénico (As) también hacen uso de estos mecanismos de absorción.

La entrada del arsénico en la célula depende del estado de oxidación que éste tenga. En diversos estudios fisiológicos, se ha determinado que el arsénico presenta gran similitud al grupo fosfato (PO_4)⁻³, por lo que comparten la mayoría de transportadores en plantas (77); existen alrededor de 100 transportadores de fosfato expresados en las raíces (78). Después de entrar en las raíces a través de los transportadores de fosfato de alta afinidad, el arseniato (AsO_4)⁻³ se reduce fácilmente a arsenito (AsO_2)⁻. Alternativamente, bajo condiciones reductoras, el arsenito es absorbido por proteínas de membrana pertenecientes a la familia de acuaporinas (79,

80). Éste se exporta posteriormente al xilema por el transportador de eflujo de silicio

(81). El paso final de la desintoxicación de arsénico en la célula es el secuestro en vacuolas, que depende principalmente del glutatión (GSH), de las fitoquelatinas (PC) y metalotioneínas (MT).

El glutatión (GSH) es un tripéptido de bajo peso molecular compuesto por cisteína, glutamato y glicina, reacciona con compuestos tóxicos debido a la alta afinidad de los metales con su grupo tiol (-SH), formando derivados que son secuestrados en vacuolas (82). Es precursor de las fitoquelatinas.

Las fitoquelatinas son péptidos de unión al metal, ricos en cisteína con repeticiones del monómero (γ -GluCys) $_n$ -Gly (83); cuya síntesis es inducida por metales tóxicos como mercurio, cobre, plomo, cadmio, incluido el arsénico (84).

Las metalotioneínas son proteínas de bajo peso molecular ricas en cisteína, que acomplejan metales por sus grupos tiol y sus residuos de cisteína (85).

Además de la detoxificación de metales, también cumplen funciones de homeostasis (86), así como de defensa antioxidante para manejar el desafío oxidativo impuesto por el metal (87).

CONCLUSIONES

- Las condiciones óptimas de crecimiento de *Chenopodium album* L. (Liccha), establecidas bajo condiciones ambientales fueron: temperatura entre 8 - 21°C, pH 6.8 y un medio hidropónico al 25% de la solución de Hoagland.
- El método analítico de espectrofotometría de plasma acoplado inductivamente (ICP – OES) fue validado para la determinación de arsénico; siendo lineal ($r^2=0.999$), preciso y exacto según las normas ICH; con un LD: 0.026 $\mu\text{g.L}^{-1}$ y un LC: 0.079 $\mu\text{g.L}^{-1}$.
- En el ensayo de fitotoxicidad, la concentración a la que la planta presentó mayor tolerancia y acumulación, fue de 10 mg.L^{-1} de arsénico. Mostrando senescencia y muerte temprana a la mayor concentración.

- Se determinó la máxima bioacumulación a los 20 días, en la parte radicular y aérea: $694.802 \pm 2.450 \text{ mg.kg}^{-1}$ y $1050.373 \pm 0.879 \text{ mg.kg}^{-1}$, respectivamente; mostrando mayor cantidad bioacumulada en la parte aérea de la planta.



RECOMENDACIONES

1. Efectuar las mediciones en una estación voltamperométrica, para poder determinar la concentración acumulada de la especie en sus formas aniónicas de arsenito (AsO_2^-) y arseniato (AsO_4^{3-}).
2. En el ensayo de bioacumulación de 30 días, realizar mediciones de la concentración acumulada en la planta, en intervalos menores de 5 días, antes de que se produzca el proceso de desorción del metaloide; para poder emplear los datos y graficar una curva y determinar una cinética de fitorremediación.
3. Evaluar los mecanismos empleados por la planta para acumular arsénico, para determinar si cumple métodos de fitoextracción o rizofiltración.
4. Realizar pruebas de fitorremediación de aguas contaminadas de vertientes de minerías.
5. Aplicar la técnica de fitorremediación en suelos contaminados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ronco A, Gagnon P, Diaz-Baez M, Arkhipchuk V, Castillo G, Castillo L, et al. Overview of results from the WaterTox intercalibration and environmental testing phase II program: Part 1, statistical analysis of blind sample testing. *Environmental toxicology*. 2002;17(3):232-40.
2. Feng Z, Xia Y, Tian D, Wu K, Schmitt M, Kwok RK, et al. DNA damage in buccal epithelial cells from individuals chronically exposed to arsenic via drinking water in Inner Mongolia, China. *Anticancer research*. 2000;21(1A):51-7.
3. Tripathi RD, Srivastava S, Mishra S, Singh N, Tuli R, Gupta DK, et al. Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *TRENDS in Biotechnology*. 2007;25(4):158-65.
4. Zhao R, Zhao M, Wang H, Taneike Y, Zhang X. Arsenic speciation in moso bamboo shoot—a terrestrial plant that contains organoarsenic species. *Science of the Total Environment*. 2006;371(1):293-303.
5. SOS Arsenic Poisoning in Bangladesh/India. 2011.
6. Chen CJ, Chen C, Wu M, Kuo T. Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water. *British journal of cancer*. 1992;66(5):888.
7. Vidal AM. Evaluación de los mecanismos de adsorción y acumulación intracelular de plomo (Pb^{+2}), en sistemas continuos de fitorremediación con *Salvinia minima*. Veracruz: Instituto de Ecología; 2009.
8. Aisien FA, Faleye O, Aisien ET. Phytoremediation of heavy metals in aqueous solutions. *Leonardo J Sci*. 2010;17:37-46.
9. Ralph B. Fundamentos de Química. Edit Prentice Hall RESTREPO, F(1989) *Hola Química* Edit Susaeta FERNANDEZ, M y Otros(1999)“Spin” *Química*. 1996;10.
10. Lozada-Zarate EJ, Monks S, Pulido-Flores G, Gordillo-Martínez AJ, Prieto-García F. Determinación de metales pesados en *Cyprinus carpio* en la

Laguna de Metztitlán, Hidalgo, México. Pulido-Flores, G y López-Escamilla, A L (editoras). 2007:91-4.

11. Loredó J, Soto J, Álvarez R, Ordóñez A. Atmospheric monitoring at abandoned mercury mine sites in Asturias (NW Spain). *Environmental monitoring and assessment*. 2007;130(1):201-14.
12. García FP, Sandoval OAA. Phytoremediation: an alternative to eliminate pollution. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 2011;14(2):597-612.
13. Delgadillo-López AE, González-Ramírez CA, Prieto-García F, Villagómez-Ibarra JR, Acevedo-Sandoval O. Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and subtropical agroecosystems*. 2011;14:597-612.
14. Mueller S, Goldfarb R, Farmer G, Sanzalone R, Adams M, Theodorakus P, editors. A seasonal study of arsenic and groundwater geochemistry in Fairbanks, Alaska. *Proceedings of the USGS Workshop on Arsenic in the Environment*; 2001.
15. Nikolaidis NP, Dobbs GM, Chen J, Lackovic JA. Arsenic mobility in contaminated lake sediments. *Environmental pollution*. 2004;129(3):479-87.
16. Smedley P, Nicolli H, Macdonald D, Barros A, Tullio J. Hydrogeochemistry of arsenic and other inorganic constituents in groundwaters from La Pampa, Argentina. *Applied geochemistry*. 2002;17(3):259-84.
17. Rathinasabapathi B, Ma LQ, Srivastava M. Arsenic hyperaccumulating ferns and their application to phytoremediation of arsenic contaminated sites. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology*. 2006;3:304-11.
18. Mwegoha WJ. The use of phytoremediation technology for abatement soil and groundwater pollution in Tanzania: opportunities and challenges. *Journal of sustainable development in Africa*. 2008;10(1):140-56.
19. Nagy R, Grob H, Weder B, Green P, Klein M, Frelet-Barrand A, et al. The Arabidopsis ATP-binding cassette protein AtMRP5/AtABCC5 is a high affinity inositol hexakisphosphate transporter involved in guard cell signaling and phytate storage. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(48):33614-22.

20. Rodriguez R, Basta N, Casteel S, Armstrong F, Ward D. Chemical extraction methods to assess bioavailable arsenic in soil and solid media. *Journal of Environmental Quality*. 2003;32(3):876-84.
21. Klaassen C, Watkins III JB. Casarett & Doull's essentials of toxicology: McGraw Hill Professional; 2015.
22. Rom WN, Markowitz SB. Environmental and occupational medicine: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
23. Wagner G, Hearl F, Rosenstock L, Cullen M, Brodtkin C, Redlich C. Textbook of clinical occupational and environmental medicine. Elsevier Inc New York; 2005. p. 1073-86.
24. Rudge CV, Röllin HB, Nogueira CM, Thomassen Y, Rudge MC, Odland JØ. The placenta as a barrier for toxic and essential elements in paired maternal and cord blood samples of South African delivering women. *Journal of Environmental Monitoring*. 2009;11(7):1322-30.
25. Offergelt J, Roels H, Buchet J-P, Boeckx M, Lauwerys R. Relation between airborne arsenic trioxide and urinary excretion of inorganic arsenic and its methylated metabolites. *Occupational and Environmental Medicine*. 1992;49(6):387-93.
26. Lagerkvist BJ, Zetterlund B. Assessment of exposure to arsenic among smelter workers: a five-year follow-up. *American journal of industrial medicine*. 1994;25(4):477-88.
27. Yeh S, How S, Lin C. Arsenical cancer of skin: Histologic study with special reference to Bowen's disease. *Cancer*. 1968;21(2):312-39.
28. Zenz C. Occupational medicine: principles and practical applications: Year Book Medical Publishers; 1988.
29. Gerald Ott M, Holder BB, Gordon HL. Respiratory cancer and occupational exposure to arsenicals. *Arch Environ Health*. 29:250-6.
30. Pinto SS, Bennett B. Effect of arsenic trioxide exposure on mortality. *Archives of Environmental Health: An International Journal*. 1963;7(5):583-91.

31. Rencher AC, Carter MW, McKee DW. A retrospective epidemiological study of mortality at a large western copper smelter. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 1977;19(11):754-8.
32. Cho C, Corapcioglu MY, Park S, Sung K. Effects of grasses on the fate of VOCs in contaminated soil and air. *Water, air, and soil pollution*. 2008;187(1-4):243-50.
33. Jara-Peña E, Gómez J, Montoya H, Chanco M, Mariano M, Cano N. Capacidad fitorremediadora de cinco especies altoandinas de suelos contaminados con metales pesados. *Revista peruana de biología*. 2014;21(2):145-54.
34. Navarro-Aviñó JP, Alonso IA, López-Moya J. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Revista Ecosistemas*. 2007;16(2).
35. Torres Rodríguez D, Cumana A, Torrealba O, Posada D. Uso del vetiver para la fitorremediación de cromo en lodos residuales de una tenería. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 2010;1(2):175-88.
36. González-Mendoza D. Los elementos potencialmente tóxicos en las plantas de manglar: una revisión de los mecanismos de tolerancia involucrados. *Interciencia*. 2008;33(11):817-20.
37. García Rico L, Robles Burgueño MdR, Valenzuela Soto EM. Las metalotioneinas y su relación con la toxicidad del cadmio en los mamíferos. *Revista internacional de contaminación ambiental*. 1999;15(2).
38. Cherian S, Oliveira MM. Transgenic plants in phytoremediation: recent advances and new possibilities. *Environmental science & technology*. 2005;39(24):9377-90.
39. Ali H, Khan E, Sajad MA. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere*. 2013;91(7):869-81.
40. Mahmood T, Malik S, Hussain Z, Qamar I, Mateen H. A Review of Phytoremediation Technology for Contaminated Soil and Water. Mahmood, SA Malik, Z Hussain, I Qamar, HA Mateen—Abbottabad, Pakistan. 2007.

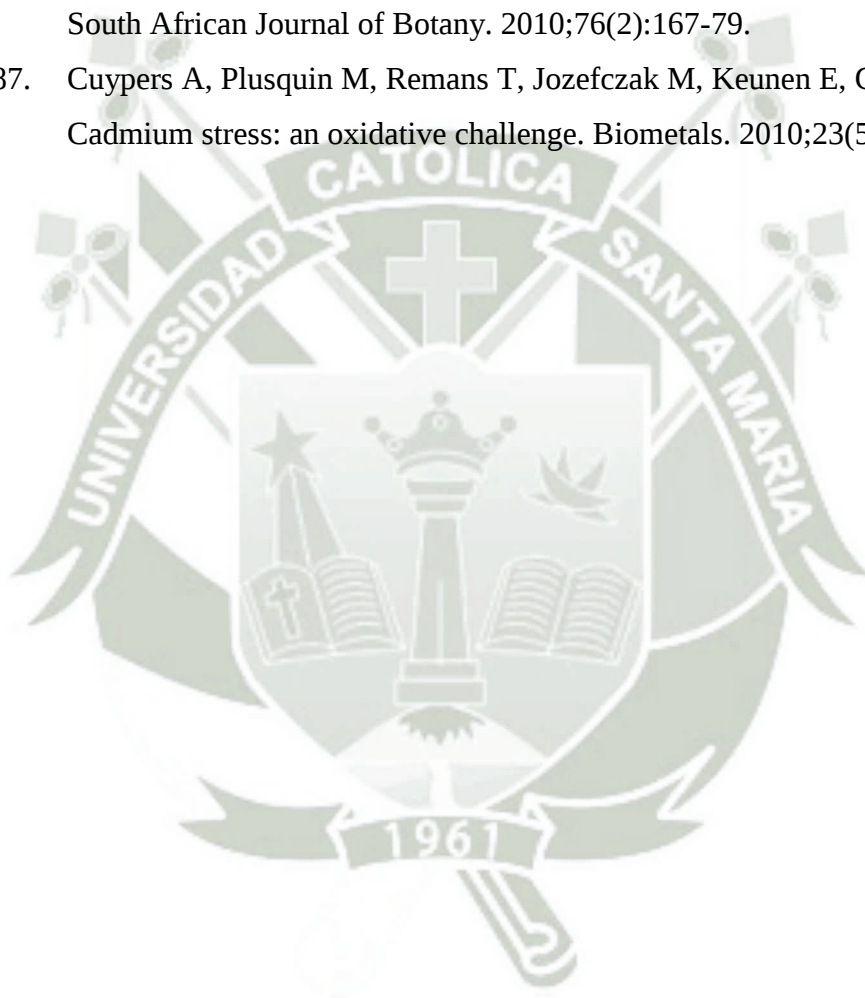
41. Bolan NS, Park JH, Robinson B, Naidu R, Huh KY. 4 Phytostabilization: A Green Approach to Contaminant Containment. *Advances in agronomy*. 2011;112:145.
42. Carpena R, Bernal MP. Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos. *Revista Ecosistemas*. 2007;16(2).
43. Yadav BK, Siebel MA, van Bruggen JJ. Rhizofiltration of a heavy metal (lead) containing wastewater using the wetland plant *Carex pendula*. *CLEAN–Soil, Air, Water*. 2011;39(5):467-74.
44. Wuana R, Okieimen F. Phytoremediation potential of maize (*Zea mays* L.). A review. *African Journal of General Agriculture*. 2010;6(4):275-87.
45. Sakakibara M, Watanabe A, Inoue M, Sano S, Kaise T, editors. Phytoextraction and phytovolatilization of arsenic from as-contaminated soils by *Pteris vittata*. *Proceedings of the annual international conference on soils, sediments, water and energy*; 2010.
46. Macek T, Uhlik O, Jecna K, Novakova M, Lovecka P, Rezek J, et al. *Advances in phytoremediation and rhizoremediation. Advances in Applied Bioremediation*: Springer; 2009. p. 257-77.
47. Zazouli MA, Mahdavi Y, Bazrafshan E, Balarak D. Phytodegradation potential of bisphenolA from aqueous solution by *Azolla Filiculoides*. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 2014;12(1):66.
48. Al-Snafi A. The chemical constituents and pharmacological effects of *Chenopodium album*-An overview. *International J of Pharmacological Screening Methods*. 2015;5(1):10-7.
49. Linneo P. *Chenopodium album* L., Sp. 1 ed1753.
50. UVA LdTI. Espectroscopía de Plasma ICP-OES Valladolid2016 [Available from: <http://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/espectroscopa-de-plasma-icp-oes>.
51. RoHS TL. INDUCTIVELY COUPLED PLASMA -OPTICAL EMISSION SPECTROMETER(ICP-OES) India2014 [
52. Montoro L, Pujol T, Velayos J, González J, editors. *Comparativa entre la ferrografía analítica y las técnicas espectrométricas de análisis de aceites*

- lubricantes usados. XVIII congreso nacional de ingeniería mecánica, Catalán; 2010.
53. Solución hidropónica La Molina. Universidad Nacional Agraria La Molina; 2015.
 54. Harmonised Tripartite Guideline Validation Analytical Metodology. , (1994).
 55. Chamba J. Propagación en vivero de seis especies forestales promisorias de la zona seca de la provincia de Loja: Tesis de Grado de Ingeniero Forestal. UNL; 2002.
 56. López D, Carazo N. La producción de esquejes. Revista extra, CEU Área de Horticultura EUITAB (ESAB) Pp. 2005;23.
 57. Rojas González S, García Lozano J, Alarcón Rojas M. Propagación asexual de las plantas: conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas. 2004.
 58. Hartmann H, Kester D. Propagación de plantas: principios y prácticas. México DF. MX Continental. 1998:757.
 59. Saldías G. Propagación vegetativa por esquejes de *Monttea chilensis* Gay. Gayana Botánica. 2016;73(1):25-31.
 60. Schmelzer G, Gurib-Fakim A. Plant resources of tropical Africa 11 (2): medicinal plants 2. Plant resources of tropical Africa 11 (2): medicinal plants 2. 2013.
 61. Malca G. Seminario de agronegocios, lechugas hidropónicas Lima, Perú: Universidad del Pacífico; 2001 [Available from: www.upbusiness.net].
 62. Resh HMHM. Cultivos hidropónicos: nuevas técnicas de producción: una guía completa de los métodos actuales de cultivo sin suelo para técnicos y agricultores profesionales, así como para los aficionados especializados: Mundi-Prensa; 1997.
 63. Castañeda F, Valverde Cd, García L. Manual de Cultivos Hidropónicos Populares: Producción de Verduras sin usar la tierra. Manual de cultivos hidropónicos populares: producción de verduras sin usar la tierra: INCAP; 1997.

64. Malavolta E, Vitti G, Oliveira S. Evaluación del estado nutricional de las plantas. Principios y aplicaciones. Boletín de PROMECAFE Guatemala. 1992.
65. Goñi C. Evaluación del estado nutricional de durazneros. Montevideo, Uruguay: INIA; 1995.
66. Walker DJ, Clemente R, Bernal MP. Contrasting effects of manure and compost on soil pH, heavy metal availability and growth of *Chenopodium album* L. in a soil contaminated by pyritic mine waste. *Chemosphere*. 2004;57(3):215-24.
67. Avellán-Zumbado MJ, Murillo-Cruz R, Alvarado-Hernández A, Ávila-Arias C. Variación del contenido foliar de nutrimentos de *Gmelina arborea* en los cantones de Osa, Golfito y Corredores, Costa Rica. *Revista de Ciencias Ambientales*. 2015;49(1):1-15.
68. Faust M. *Physiology of temperate zone fruit trees*: John Wiley & Sons, Inc.; 1989.
69. Choque Yucra M. Cuantificación de la remoción de PB y cd mediante la lenteja de agua *lemna gibba*. Y azolla *fuliculoides* de las aguas de la bahía interior de Puno. 2010.
70. Almagro L, Segura-Reinaldos AM, Pedreño MA, Bernal MP, editors. Tolerancia y acumulación de metales pesados y As en diferentes especies de *Cistus* L./Tolerance and accumulation of heavy metals and As in different species of *Cistus* L. *Anales de Biología*; 2015: Servicio de Publicaciones, Universidad de Murcia.
71. Pratas J, Prasad M, Freitas H, Conde L. Plants growing in abandoned mines of Portugal are useful for biogeochemical exploration of arsenic, antimony, tungsten and mine reclamation. *Journal of Geochemical Exploration*. 2005;85(3):99-107.
72. Llantoy P, Raúl V, Valderrama Negrón AC. Estudio de los parámetros fisicoquímicos para la fitorremediación de Cadmio (II) y Mercurio (II) con la especie *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua). *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 2014;80(3):164-73.

73. Moogouei R, Borghei M, Arjmandi R. Phytoremediation of stable Cs from solutions by *Calendula alata*, *Amaranthus chlorostachys* and *Chenopodium album*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2011;74(7):2036-9.
74. McGrath S, Zhao F, Lombi E. Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils. *Plant and soil*. 2001;232(1):207-14.
75. Burlo F, Guijarro I, Carbonell-Barrachina A, Valero D, Martinez-Sanchez F. Arsenic species: effects on and accumulation by tomato plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999;47(3):1247-53.
76. Zhao F-J, McGrath SP, Meharg AA. Arsenic as a food chain contaminant: mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. *Annual review of plant biology*. 2010;61:535-59.
77. Meharg A, Naylor J, Macnair M. Phosphorus nutrition of arsenate-tolerant and nontolerant phenotypes of velvetgrass. *Journal of Environmental Quality*. 1994;23(2):234-8.
78. Zhao F, Ma J, Meharg A, McGrath S. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist*. 2009;181(4):777-94.
79. Kamiya T, Tanaka M, Mitani N, Ma JF, Maeshima M, Fujiwara T. NIP1; 1, an aquaporin homolog, determines the arsenite sensitivity of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(4):2114-20.
80. Ali W, Isayenkov SV, Zhao F-J, Maathuis FJ. Arsenite transport in plants. *Cellular and molecular life sciences*. 2009;66(14):2329-39.
81. Ma JF, Yamaji N, Mitani N, Xu X-Y, Su Y-H, McGrath SP, et al. Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(29):9931-5.
82. Dixon DP, Edwards R. Glutathione transferases. *The Arabidopsis Book*. 2010:e0131.
83. Cobbett C, Goldsbrough P. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual review of plant biology*. 2002;53(1):159-82.

84. Hossain MA, Piyatida P, da Silva JAT, Fujita M. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *Journal of Botany*. 2012;2012.
85. Pérez Palacios P. Biotecnología ambiental: desarrollo de estrategias biotecnológicas para la biorremediación de metales pesados. 2015.
86. Yadav S. Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*. 2010;76(2):167-79.
87. Cuypers A, Plusquin M, Remans T, Jozefczak M, Keunen E, Gielen H, et al. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*. 2010;23(5):927-40.



ANEXOS

1. IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA

HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)



CONSTANCIA 17- 2017-HUSA

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Se hace constar que las muestras frescas de hojas y tallos de la planta traída al laboratorio por la Srta: SUSAN SOFIA FLORES CALLA para el análisis botánico corresponde a la especie *Chenopodium álbum* L. "liccha" de la familia Amaranthaceae. Dicha muestra fue obtenida de los campos de cultivo de Cayma, provincia de Arequipa, Departamento de Arequipa para el estudio de la Tesis de pregrado titulada: **Determinación de la capacidad fitoremediadora de *Chenopodium álbum* L. "liccha" en aguas contaminadas con Arsénico** de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas del Programa profesional de Ingeniería Biotecnológica de la Universidad Católica Santa María.

Los resultados de dicha identificación y tipificación corresponde a:

DIVISION : MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: CARYOPHYLLIDAE

ORDEN: CARYOPHYLLALES

FAMILIA: AMARANTHACEAE

GENERO: *Chenopodium*

ESPECIE: *Chenopodium álbum* L.

Se expide la presente constancia a solicitud de la interesada para los fines que se estime conveniente.

Arequipa 4 de Julio del 2017



Blgo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)

Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado
Teléfono: (054) 237755 / 984248674
Apartado Postal: 0028
AREQUIPA – PERÚ