Universidad Católica de Santa María

Escuela de Postgrado

Maestría en Salud Ocupacional y del Medio Ambiente

Potencial Biorremediador de Saponinas Obtenidas a Partir de Residuos de Quinua (Chenopodium quinoa Willd) en Suelos Contaminados con Hidrocarburos

Tesis presentada por:

Luperdi Puente de la Vega, Alexandra Pattricia

ORCID: 0000-0001-5708-4979

para optar el Grado Académico de Maestro en Salud Ocupacional y del Medio Ambiente

Asesor:

Dr. Teran Hilares, Ruly

ORCID: 0000-0003-0769-4175

Arequipa – Perú

2026

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ESCUELA DE POSTGRADO

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR DE TESIS

Arequipa, 01 de Abril del 2026

Dictamen: 015537-C-EPG-2026

Visto el borrador de Tesis del expediente 015537, presentado por:

2018008222 - LUPERDI PUENTE DE LA VEGA ALEXANDRA PATTRICIA

Titulado:

POTENCIAL BIORREMEDIADOR DE SAPONINAS OBTENIDAS A PARTIR DE RESIDUOS DE QUINUA (CHENOPODIUM QUINOA WILLD) EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS

Nuestro dictamen es:

APROBADO

29285302 - GUTIERREZ ARANIBAR ROXANA JACQUELINE CANDELARIA
DICTAMINADOR

29227646 - BOCARDO DELGADO EDWIN FREDY
DICTAMINADOR

70541954 - CANDIA PUMA MAYRON ANTONIO
DICTAMINADOR

Potencial Biorremediador de Saponinas Obtenidas a Partir de Residuos de Quinua (Chenopodium quinoa Willd) en Suelos Contaminados con Hidrocarburos

INFORME DE ORIGINALIDAD

14%	13%	3%	5%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	3%
2	revistas.unsch.edu.pe Fuente de Internet	2%
3	repositorio.unicauca.edu.co:8080 Fuente de Internet	1%
4	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
5	www.coursehero.com Fuente de Internet	<1%
6	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	<1%
7	repositorio.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	<1%
8	editorialparmenia.com.mx Fuente de Internet	<1%

DEDICATORIA

Primeramente, a Dios y la Virgen María, por la fortaleza y las bendiciones otorgadas.

A mi Familia por el apoyo incondicional y amor sincero que han hecho que este camino sea más sencillo, cada paso que doy los llevo conmigo, sobre todo a mi madre por ser mi centro y refugio en todo momento sobre todo en los difíciles, por creer en mi incluso en los momentos que dude, el logo también es tuyo.

A los que me acompañan desde el cielo, en su memoria.

A mí, por el esfuerzo a pesar de las dificultades, lo logre

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y mis mentores por todo lo enseñado, por su paciencia, su apoyo a seguir en el mundo de la investigación, por mostrarme que es ser un gran profesional y persona, su compromiso ha sido fundamentales, esta tesis es un testimonio de su guía experta y amable. Gracias por inspirarme.

Al proyecto 'Nuevas perspectivas de valorización de la saponina de la quinua: Extracción, purificación, caracterización fisicoquímica y tecno-funcional', financiado por el Programa Nacional de Investigación Científica y Estudios Avanzados – PROCIENCIA (número de proceso: PE501086190-2024), por su valioso apoyo, que hizo posible la realización de esta investigación.

EPIGRAFE

“La ciencia no es sino una perversión de sí misma, a menos que tenga como objetivo final mejorar la humanidad

- Nikola tesla

RESUMEN

El actual estudio evaluó el potencial biorremediador de extractos de saponinas extraídas de residuos de quinua (Chenopodium quinoa wild), en suelos contaminados con hidrocarburo, a fin de proponer una solución sostenible frente al uso de surfactantes químicos. Se contamino suelo agrícola fértil destinado al cultivo de vid con petrolero comercial a una concentración moderada de hidrocarburos de 5 g de petróleo/Kg de suelo. Posteriormente se aplicaron 2 tipos de tratamiento con extractos de saponinas a diferentes niveles de pureza (40% y 60%) y un surfactante comercial (Tween – 80). Además, se incluyó un control positivo (tierra sin contaminar) y control negativo (tierra contaminada sin tratamiento). La concentración de hidrocarburos se monitoreo mediante espectrofotometría y se evaluó la actividad microbiana mediante recuento de placa de unidades formadoras de colonia (UFC), según la norma ISO 4833-1:2013, posterior al tratamiento de remediación. Los resultados indican que el extracto de saponina de 40% y 60% de pureza muestra un valor de concentración critica micelar (CMC) de 0.22 y 0.75 g/L, respectivamente. Con relación a la capacidad emulsificante, la saponina al 60% mostro mejor capacidad emulsificante, debido a una mayor anfifilicidad, además, al aumentar la concentración de saponina, se requiere mayor temperatura para inducir la inversión de fase (PIT). Respecto a la formación de espuma ambos extractos presentaron el mismo perfil, sin embargo, el extracto de saponina al 60% mostro mayor estabilidad de la espuma. Con relación a la remediación de suelos, los resultados muestran que los extractos de saponinas con 60% de pureza y Tween-80 facilitaron una mayor movilización de hidrocarburos, evidenciada por una reducción significativa en la concentración de petróleo en el suelo; sin embargo, menor efecto fue observado en el extracto de saponina al 40% de pureza. Por otro lado, los tratamientos con saponinas al 60% y Tween-80 mostraron una inhibición entre el 25% y 31% en el número de UFC con respecto al control positivo. Por lo tanto, este estudio demuestra que el uso de saponinas como surfactantes naturales para la biorremediación natural y debido que la saponina se extrae de residuos, esta investigación cierra el círculo de economía circular.

Palabras claves: Biorremediación, saponinas, residuos de quinua.

ABSTRACT

The present study evaluated the bioremediation potential of saponin extracts obtained from quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) processing residues in hydrocarbon-contaminated soils, with the aim of proposing a sustainable alternative to the use of chemical surfactants. Fertile agricultural soil intended for vineyard cultivation was contaminated with commercial petroleum at a moderate hydrocarbon concentration of 5 g oil/kg soil. Two treatments were subsequently applied using saponin extracts at different purity levels (40% and 60%) and a commercial surfactant (Tween-80). In addition, a positive control (uncontaminated soil) and negative control (contaminated soil without treatment) were included. Hydrocarbon concentration was monitored by spectrophotometry, and microbial activity was assessed through plate counts of colony-forming units (CFU) according to ISO 4833-1:2013 following the remediation treatment.

The results indicate that saponin extracts at 40% and 60% purity exhibited critical micelle concentration (CMC) values of 0.22 and 0.75 g/L, respectively. Regarding emulsifying capacity, the 60% saponin extract showed superior performance, likely due to greater amphiphilicity; moreover, increasing saponin concentration required higher temperatures to induce phase inversion (PIT). With respect to foaming properties, both extracts displayed similar profiles; however, the 60% saponin extract exhibited greater foam stability. In terms of soil remediation, the results showed that the 60% saponin extract and Tween-80 facilitated greater hydrocarbon mobilization, evidenced by a significant reduction in petroleum concentration in the soil, whereas a lower effect was observed for the 40% saponin extract. On the other hand, treatments with 60% saponin and Tween-80 showed an inhibition of between 25% and 31% in CFU counts relative to the positive control. Therefore, this study demonstrates that the use of saponins as natural surfactants for soil bioremediation represents a sustainable strategy, and since the saponins are extracted from agro-industrial residues, this research contributes to closing the loop within a circular economy framework.

Keywords: Bioremediation; saponins; quinoa residues.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

EPIGRAFE

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCION....1

HIPOTESIS....3

OBJETIVOS....4

OBJETIVO GENERAL....4

OBJETIVO ESPECIFICOS....4

CAPITULO I....5

MARCO TEORICO....5

1. Marco Teórico....5

1.1 Contaminación de hidrocarburos y biorremediación....5

1.2. Surfactantes....6

1.2.1. La quinua como fuente de surfactante natural....6

2. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos con saponinas de fuente vegetal....8

2.1 Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos....8

3. Análisis de antecedentes investigativos....10

3.1. Nacionales....10

3.2. Internacionales....11

CAPITULO II....16

METODOLOGIA....16

1. Técnicas, instrumentos....17

1.1. Técnicas....17

1.2. Instrumentos....17

1.3 Cuadro de coherencias....19

2. Campo de verificación....20

2.1. Ubicación espacial....20

2.2. Ubicación temporal....20

2.3. Unidades de estudio....20

2.4. Estrategias de recolección de datos 25
2.6. Validación de Instrumentos 30
2.7. Criterios para el manejo estadístico de resultados 31
CAPITULO III 32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 32
1. Resultados y discusión 33
1.1. Caracterización de las propiedades tensoactivas de la saponina 33
1.1.1. Tensión superficial 33
1.2. Potencial de la saponina en la movilización y biodegradación de hidrocarburos en suelo contaminado. 47
1.2.3. Análisis de remoción de petróleo para la tierra y agua sometida a los diferentes tratamientos con surfactantes. 52
CONCLUSIONES 62
RECOMENDACIONES 63
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuadro de coherencias. 19
Tabla 2. Absorbancia del petróleo en distintas diluciones y su concentración en g/L. 26
Tabla 3. Comparación de la concentración micelar crítica (CMC) y propiedades tensioactivas de diferentes saponinas reportadas en la literatura 37
Tabla 4. Tabla de comparación de surfactantes naturales y comerciales. 41
Tabla 5. Resultados del ANOVA multifactorial para la concentración de petróleo considerando medio de remoción (suelo/agua), tratamientos y tiempo. 49
Tabla 6. Resultados del ANOVA para la concentración de petróleo en suelo en función del tiempo y el tratamiento aplicado. 53
Tabla 7. Recuento microbiano de bacterias y hongos en suelo contaminado posterior al tratamiento con saponinas de quinua 57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de purificación de saponina. 21
Figura 2. Variación de la tensión superficial en función de la concentración de extractos de saponina de quinua con diferentes niveles de pureza. 33
Figura 3. Tensión superficial de la Saponina de pureza del 40 %. 35
Figura 4. Tensión superficial de la Saponina de pureza del 60 %. 36
Figura 5. Perfil de conductividad Vs temperatura en saponinas de 40 % y 60 %. 38
Figura 6. Evolución del PIT a diversas concentraciones de saponinas. 40
Figura 7. Promedio de diámetro de gotas de emulsión en diferente Concentración de saponinas 43
Figura 8. Observación microestructural de sistemas de emulsión formados con extractos de saponinas de residuos de Chenopodium quinua en concentraciones A) Saponina 40 % 0.01 wt % B) Saponina 40 % 0.05 wt % C) Saponina 40 % 1 wt % D) Saponina 60 % 0.01 wt % E) Saponina 40 % 0.05 wt % F) Saponina 60 % 1 wt % 44
Figura 9. Perfil de espumación, altura (mm) vs. tiempo (s) para extracto de saponina de Chenopodium quinoa con 40 y 60% de pureza a 2CMC. 47
Figura 10. Curva de calibración para la cuantificación espectrofotométrica de petróleo comercial (absorbancia vs dilución) a 250 nm 48
Figura 11. Concentración de petróleo en suelo y agua durante el proceso de remoción asistida por surfactantes. 51
Figura 12. Comparación global de la concentración de petróleo entre tratamientos y controles. 52
Figura 13. Interacción entre tratamientos y tiempo en la concentración de petróleo en suelo contaminado. 54
Figura 14. Interacción entre tratamientos y tiempo en la concentración de petróleo en la fase acuosa. 55
Figura 15. Comparación entre tratamientos de la concentración de petróleo en suelo durante el proceso de remoción. 56
Figura 16. Comparación entre tratamientos de la concentración de petróleo en agua durante el proceso de remoción. 56

Figura 17. Evolución del recuento bacteriano (UFC) en suelo contaminado con petróleo tratado con saponinas de quinua y Tween-80. 60
Figura 18. Evolución del recuento fúngico (UFC) en suelo contaminado con petróleo tratado con saponinas de quinua y Tween-80. 61
Figura 19. Tensiómetro de fuerza Kruss K-100 93
Figura 20. Sistema PIT-Slope 93
Figura 21. Microscopio electrónico. 94
Figura 22. Tamizado de tierra agrícola. 94
Figura 23. Contaminación de tierra con hidrocarburo. 95
Figura 24. Pesado de tierra y saponinas. 95
Figura 25. Diseño experimental con los 60 sistemas de ensayo. 96
Figura 26. Medición de la Humedad de tierras 96
Figura 27. Centrifugación de fase acuosa. 97
Figura 28. Fase de tierra Sometida a Votex. 97
Figura 29. Filtración con 4 capas de gaza. 98
Figura 30. Pesado de tierra filtrada para Conteo microbiano. 98
Figura 31. Análisis de tierra para conteo microbiano**.** 99

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Matriz de datos estadísticos. 70
Anexo 2. Informe de calibración de Espectrofotómetro. 73
Anexo 3. ISO 4833. 74
Anexo 4. Ecuaciones. 82
Anexo 5. Conteo de Unidades formadoras de Colonias. 84
Anexo 6. Espectrofotometría de cantidad de petróleo. 85
Anexo 7. Panel Fotográfico. 93

INTRODUCCION

Como ingeniera biotecnóloga con ámbito de acción en al campo de la agricultura, he observado con preocupación la persistente contaminación por hidrocarburos en diversos puntos de nuestro país. La expansión de industrias como la automotriz ha generado, en numerosas ocasiones, la eliminación inapropiada de residuos con contenido hidrocarburos en terrenos aledaños, vertederos clandestinos e incluso en el sistema de drenaje público. Esta situación afecta directamente tanto al suelo como a las fuentes de agua.

Asimismo, la deficiente gestión de desechos provenientes de industrias petroleras, refinadoras y relacionadas, agravada por la falta de regulación y control adecuados, contribuye significativamente a la contaminación ambiental. Es común observar manchas de hidrocarburos en calles cercanas a talleres mecánicos, extendiéndose su impacto a áreas verdes adyacentes. Esta realidad evidencia una carencia de conciencia ambiental sobre las consecuencias negativas del manejo inadecuado de estos contaminantes en Arequipa.

Frente al alto impacto ambiental producido por los hidrocarburos y sus efectos perjudiciales sobre la calidad del suelo y del agua, es imperativa la búsqueda de alternativas sostenibles para su remediación. En este contexto, el uso de surfactantes se presenta como una estrategia prometedora dentro de los procesos de biorremediación, debido a que estos compuestos incrementan la biodisponibilidad de los contaminantes, facilitando su degradación por parte de microorganismos.

El presente proyecto propone emplear saponinas obtenidas a partir de residuos de quinua (Chenopodium quinoa Willd.), aprovechando sus propiedades tensoactivas, tales como la reducción de la tensión superficial, la capacidad de emulsificación, formación de micelas y formación de espuma. Estas características favorecen la desorción y solubilización de los hidrocarburos presentes en el suelo, aumentando su biodisponibilidad para los microorganismos y, por ende, mejorando la biodegradación. De esta forma, el uso de saponinas como biosurfactantes constituye una alternativa natural, eficiente y ambientalmente amigable frente a los surfactantes sintéticos.

Además, este enfoque promueve un modelo de economía circular, al valorizar residuos del proceso de escarificado de la quinua, transformándolos en un recurso útil para la remediación ambiental. Así, se potencia un uso estratégico de la biotecnología para convertir un residuo agroindustrial en una herramienta para mitigar la contaminación por hidrocarburos en suelos.

El estudio no solo busca contribuir a la reducción de la contaminación por hidrocarburos, sino también evaluar la eficacia de las saponinas en distintas concentraciones, con el fin de optimizar su desempeño en procesos de biorremediación y avanzar hacia tecnologías limpias y sostenibles.

HIPOTESIS

Dado que las saponinas son biomoléculas presentes en diversas plantas y residuos agroindustriales, que pueden ser recuperados y utilizados como surfactantes naturales con propiedades tecno-funcionales relevantes como surfactante, tensoactivo, formación de espuma y emulsionantes que facilitan la desorción y solubilización de los hidrocarburos.

Es probable que la aplicación de saponinas obtenidas a partir de residuos de quinua (Chenopodium quinoa Willd) pueden ser utilizados para remediar suelos agrícolas contaminadas con hidrocarburos, demostrando un efecto significativo en la reducción de la concentración de hidrocarburos, promoviendo la biorremediación efectiva de estos suelos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficacia de extractos de saponinas extraídas de residuos de quinua (Chenopodium quinoa Willd) en la biorremediación de suelo agrícola contaminado con hidrocarburos, mediante el análisis de su capacidad para facilitar la desorción, solubilización y biodegradación de los contaminantes.

OBJETIVO ESPECIFICOS

- Determinar las propiedades tecno-funcionales (tensoactivo o surfactante, emulsificante, estabilidad de espuma) de los extractos de saponinas a diferentes niveles de pureza (40 y 60%) obtenidos de residuos de quinua (Chenopodium quinoa Willd).
- Determinar el potencial de los extractos de saponinas de quinua a diferentes niveles de pureza en la movilización y biodegradación de hidrocarburos presentes en suelos contaminados.
- Evaluar el impacto ambiental derivado de la aplicación de saponinas asociado al uso de saponinas en suelos contaminados, considerando su efecto sobre la calidad del suelo y actividad microbiana

CAPITULO I

MARCO TEORICO

1. Marco Teórico

1.1 Contaminación de hidrocarburos y biorremediación

La contaminación por petróleo crudo en el medio ambiente proviene de derrames accidentales durante las actividades de exploración, perforación, transporte y almacenamiento. Se prevé que la magnitud de los derrames y la contaminación se agrave aún más debido a la creciente demanda de energía para sustentar el crecimiento de la población mundial y las actividades económicas. El petróleo crudo es una mezcla compleja de hidrocarburos de petróleo que presenta un alto coeficiente de partición aceite-agua, baja solubilidad en agua y altas tensiones interfaciales (IFT). La acumulación de hidrocarburos afecta los a la salud los seres vivos causando mutaciones o la muerte, estos contaminantes representan riesgos significativos para la salud pública, ya que pueden ingresar a la cadena alimentaria, contaminar fuentes de agua potable y provocar diversos problemas de salud, incluidos problemas respiratorios, enfermedades de la piel e incluso cáncer (1). Los métodos tradicionales de remediación a menudo pueden exacerbar el daño ambiental y plantear riesgos adicionales para la salud.

Los productos del suelo contaminados con petróleo crudo son un problema generalizado. Como el diésel, la gasolina y los aceites pesados se liberan en el transporte y almacenamiento ambiental como resultado de accidentes (2). Su atroz impacto en el medio ambiente es una fuente importante de preocupación. Alteran variables del equilibrio del suelo como el contenido de oxígeno y reducen la variación natural en la vida vegetal y microbiana (3).

Sin embargo, la biodegradación de la contaminación es lenta y su rendimiento general es deficiente, por lo que la atención a la contaminación debería ser excesiva. Uno de los problemas que limita la descomposición de sustancias químicas hidrofóbicas en la naturaleza es su baja solubilidad y rápida adherencia a sustratos resistentes, como el suelo o la arena. Por lo tanto, la interacción entre microorganismos y contaminantes puede ser mínima (4). Se pueden emplear

sustancias químicas tensioactivas (dispersantes, emulsionantes, espumantes, antiespumantes y lubricantes, etc.) y surfactantes naturales (Sapindus mukorossi) para mejorar la biodisponibilidad de los hidrocarburos. La influencia de los surfactantes en los procesos de degradación no se limita a la solubilidad en agua de los contaminantes, aumentando y mejorando la desorción hidrofóbica de los sedimentos y el suelo, también pueden influir en las propiedades de las células fúngicas y bacterianas, como la hidrofobicidad y la resistencia al agua (5) .

1.2. Surfactantes

El tamaño del mercado global de surfactantes actualmente es de aproximadamente USD 42.1 mil millones, y se proyecta que alcance los USD 52.4 mil millones para 2025 (6). Un aumento en su producción implica un aumento en su impacto ambiental y, como resultado, existe una gran demanda para el desarrollo de nuevos surfactantes basados en productos naturales como extractos de plantas (7).

Que pueden obtenerse a partir de diversas materias primas, como azúcares, aceites y residuos, y que presentan propiedades tensioactivas y emulsionantes (8). Descubrieron que el uso de recursos renovables para la síntesis de surfactantes, en lugar de petroquímicos, podría reducir las emisiones de CO2 en un 37 % en la Unión Europea. Además, los biosurfactantes presentan otras ventajas, como su alta biodegradabilidad, baja toxicidad, estabilidad térmica, resistencia a valores extremos de pH y fuerza iónica, y solubilidad en un medio alcalino (8).

Una de las fuentes de surfactantes más investigadas son las plantas que contienen saponinas. Las saponinas, moléculas tensioactivas naturales, se encuentran en diversos extractos vegetales, algunos de los cuales presentan una alta actividad interfacial (7).

1.2.1. La quinua como fuente de surfactante natural

Los granos de quinua suelen someterse a escarificación, un proceso de abrasión mecánica que elimina la capa exterior y da como resultado un polvo amarillento, que constituye aproximadamente el 5–8% (p / p) del grano. Este polvo es rico en fibra, compuestos fenólicos y saponinas. Actualmente, este residuo amargo a menudo se descarta sin tratamiento, lo

que genera contaminación ambiental debido a su alto contenido de saponinas (que supera el 15% p / p, según la variedad) y su falta de valor económico (9). Por lo tanto, existe una oportunidad significativa para valorizar este residuo a través de la extracción de saponinas, creando un producto sostenible con posibles aplicaciones como biosurfactante, emulsionante y detergente, y en la agricultura para el control de plagas y enfermedades.

La influencia de los surfactantes en los procesos de degradación no se limita a la solubilidad en agua de los contaminantes, aumentando y mejorando la desorción hidrofóbica de los sedimentos y el suelo (10). También pueden influir en las propiedades de las células fúngicas y bacterianas, como la hidrofobicidad y la resistencia al agua (5) . Se investigaron numerosas empresas de surfactantes para una limpieza más eficaz de suelos contaminados. Esto abarca desde surfactantes químicos (Triton X100) hasta otros sintéticos derivados de fuentes renovables, como los alquilpoliglucósidos, y surfactantes naturales de biomasa, como los ramnolípidos (11). El surfactante natural mejora la solubilización de hidrocarburos y acelera su electromigración al compartimento anódico, como lo confirma la presencia de un mayor contenido orgánico total que el electrocinético (12). Las pruebas de emulsión mostraron que el surfactante de quinua produjo emulsiones más estables y densas en comparación con los surfactantes comerciales. Por lo tanto, este estudio presenta un surfactante novedoso que no solo es rentable y respetuoso con el medio ambiente, sino que también tiene un rendimiento prometedor (13) El Sapindus mukorossi, glucósidos con un componente triterpenoide o esteroide, se encuentra en diversas biomasas vegetales (14). Los biosurfactantes han demostrado un rendimiento similar al de los surfactantes químicos en la remediación de suelos, con el valor añadido de una toxicidad relativamente menor y una alta biodegradabilidad (15) Las pruebas de emulsión mostraron que el surfactante de quinua produjo emulsiones más estables y densas en comparación con los surfactantes comerciales.

Se investigaron numerosos tipos de surfactantes para una limpieza más eficaz de suelos contaminados. Esto abarca desde surfactantes químicos

(Triton X100) hasta otros sintéticos derivados de fuentes renovables, como los alquilpoliglucósidos, y surfactantes naturales de biomasa, como los ramnolípidos, mejorando la solubilidad y biodisponibilidad de los hidrocarburos. Estos surfactantes pueden aumentar la eficacia de los procesos de biorremediación al facilitar la desorción de contaminantes de las partículas del suelo. (16)

2. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos con saponinas de fuente vegetal.

2.1 Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos

La contaminación del suelo por petróleo se debe principalmente a fugas en sistemas de almacenamiento de combustible/tuberías a gran escala y a una gestión deficiente de la eliminación de residuos petrolíferos (17). Como tecnología in situ para la remediación del suelo, el lavado con surfactante ha recibido considerable atención en los últimos años debido a su corto ciclo de remediación, su proceso simple y su costo de remediación relativamente bajo. Sin embargo, el lavado con surfactante de la contaminación por petróleo en formaciones no homogéneas y de baja permeabilidad (NHLPF; permeabilidad $< 1000 \times 10^{-3}$ μm 2) se complica por la anisotropía del suelo y la densidad del contaminante, dado que la espuma surfactante (SF) es un fluido pseudoplástico, su viscosidad disminuye al aumentar la velocidad de cizallamiento al atravesar NHLPF. Esta propiedad permite que la SF bloquee los canales de percolación dominantes y entre en la NHLPF a través de la zona de alta permeabilidad. Además, la dosis requerida de surfactantes en la SF suele ser baja, por otro lado, se analizan los desafíos asociados con el uso de surfactantes, como la toxicidad y la persistencia en el medio ambiente, y se proponen soluciones para mejorar la eficiencia y sostenibilidad de estas técnicas de remediación, la cantidad requerida de Tween 80 en la SF era solo el 20 % de la que se encontraba en solución. Por lo tanto, el lavado con SF se considera prometedor para la remediación de suelos contaminados con petróleo, especialmente en NHLPF.

Desde 1997, el SF se ha utilizado para la remediación in situ de suelos contaminados con petróleo (18). Los pasos incluyen la producción de

espuma, la inyección de espuma, la reacción de la espuma con los contaminantes, la desespumanción, la separación de la espuma de los contaminantes y la reutilización del surfactante. Aumentar la duración efectiva del tránsito del SF estable en suelos contaminados puede mejorar su efecto de remediación también se indica que la elección del surfactante y las condiciones de formación de la espuma son factores críticos que influyen en la eficiencia del desplazamiento del petróleo. (19) Sin embargo, factores como la contaminación por petróleo y la sal en el suelo influyen en la adsorción del surfactante en la interfaz gas-líquido, reduciendo el espesor de la capa líquida de SF y modificando gradualmente su forma, de esférica a poligonal y octagonal. Finalmente, el SF poligonal u octogonal se rompe, colapsa y se desplaza en estado líquido/gas por la superficie del suelo lo que ralentiza la eliminación de contaminantes (20) y dificulta el proceso de remediación. Por lo tanto, la producción de SF altamente estable es la principal barrera tecnológica para una remediación eficaz.

Los investigadores han adoptado principalmente dos enfoques para preparar SF altamente estable: (1) mejorar la tecnología de agitación y homogeneización de alta velocidad y (2) optimizar los compuestos utilizados en SF. La estabilidad de SF se puede mejorar aumentando la velocidad de agitación, la duración, la temperatura, la presión y el pH dentro de un rango razonable durante el proceso de preparación, Se destaca que los surfactantes aniónicos, como AES, SDS y SDBS, presentan mayores eficiencias de remoción en comparación con los no iónicos. (21)- (22)· Además, analizamos brevemente los factores operativos y ambientales que afectan la eficiencia del lavado de suelos y las propiedades del suelo y de los surfactantes que afectan la adsorción de surfactantes. También describimos las ventajas de combinar el lavado de suelos con el tratamiento de efluentes y los desafíos y oportunidades de la reutilización de surfactantes. Además, proponemos desafíos y posibles nuevas líneas de investigación para el lavado de suelos mejorado con surfactantes (23).

Numerosos estudios han utilizado una combinación de surfactantes para mejorar la estabilidad del SF. Se han empleado diversos tipos de agentes espumantes, como sales (24)· alcoholes polímeros y nanopartículas (NP) Las NP pueden reforzar la repulsión electrostática y la viscoelasticidad del SF y

aumentar el espesor y la resistencia mecánica de las películas de SF mediante la formación de una estructura tridimensional en consecuencia, el SF estabilizado con nanopartículas (NP-SF) es muy prometedor para la remediación de suelos contaminados con petróleo.

Esta revisión se centra en los mecanismos teóricos de estabilización del SF mediante nanopartículas. Se evalúan exhaustivamente los efectos del tamaño, la cargabilidad y la mojabilidad de las nanopartículas en la estabilidad del SF. Se enfatiza la eficacia de la remediación de suelos mediante diversos sistemas funcionales de nanopartículas-SF y el mecanismo de eliminación de contaminantes. Creemos que esta revisión facilitará el desarrollo de nanopartículas-SF funcionales para el tratamiento de suelos contaminados con petróleo (22).

3. Análisis de antecedentes investigativos

3.1. Nacionales

Una investigación realizada en Ayacucho**,** determinaron que el contenido de saponina en muestras de variedades de quinua (amarilla maranganí y negra collana). En aquel estudio, la extracción se realizó según el Método descrito por Harinder et al. El secado se realizó utilizando el atomizador Mini Spray Dryer Buchi B-290, con un 100% de aspiración, temperatura de entrada 120°C, temperatura de salida 79°C y 2% de flujo de muestra. Se realizó la reacción de Liebermann Burchad para identificar la presencia de triterpenos y esteroides; así como el perfil cromatográfico y espectrofotométrico según lo descrito por Lock.

Usaron como método la valoración física mediante el Test afrosimétrico, el Índice afro simétrico y la valoración biológica se evaluó por el índice hemolítico y el índice de Test afro simétrico. Las variedades amarillas maranganí y negra collana de Chenopodium quinoa Willd presentan triterpenos y esteroides. Del análisis espectral de los extractos de Chenopodium quinoa Willd, se identificaron espectros de absorción UV para la variedad amarilla maranganí a 215 nm y de la variedad negra collana a 310 nm. Las variedades amarillas maranganí y negra collana de Chenopodium quinoa Willd dan positivo al Test Afrosimétrico; presentan un Índice afrosimétrico de 1100 y 1000 para la droga seca y de 3100 y 2986 para el extracto atomizado respectivamente. Finalmente,

las saponinas de la quinua producen un 100% de mortalidad en el Índice de Pez y presentan un Índice Hemolítico de 3333,3 y 1666,7 respectivamente. (25)

3.2.Internacionales

Un trabajo de investigación menciona que identificaron 3 cepas bacterianas con alta capacidad de producción de biosurfactantes. Las cepas de Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis y Bacillus velezensis lograron eficiencias de biodegradación del petróleo crudo de 88 %, 92 % y 97 %, respectivamente, bajo condiciones óptimas de 37 °C y pH 7. Además, los biosurfactantes producidos por las bacterias indicadas fueron identificados como lipopéptidos, compuestos con fuertes propiedades tensoactivas. **Teniendo como resultados** que la incorporación de estos biosurfactantes en un sistema de remediación electrocinética incrementó significativamente la eficiencia del proceso. En comparación con la remediación electrocinética convencional (que alcanzó un 60 % de degradación en dos días), la combinación con biosurfactantes logró una degradación cercana al 92 % en el mismo período. Este aumento se atribuye a la mejora en la solubilización de los hidrocarburos y a la aceleración de su electromigración hacia el compartimento anódico, lo que se evidenció por un mayor contenido de materia orgánica en dicho compartimento respecto al tratamiento sin biosurfactante. (12)

Otro trabajo investigativo indica que se evaluó un surfactante natural extraída de la quinua para el uso en remediación de suelos con petróleo (EOR), como primera parte de aquel estudio comprobaron sus propiedades fisicoquímicas mediante análisis como RMN de ^{1}H, FESEM y FT-IR. **Los resultados** mostraron que la saponina extraída tenía buena estabilidad térmica a temperaturas altas, según el análisis TGA. Para posteriormente comparar sus rendimientos con dos surfactantes químicos (TR-880 y NX-610), principalmente enfocándose en las pruebas de tensión superficial (IFT), ángulo de contacto y la concentración micelar critica (CMC). **Obteniendo como resultado**, que el surfactante de quinua logró mejorar la recuperación del petróleo original en sitio (OOIP) en un 24,1%, reduciendo significativamente el ángulo de contacto de 146° a 26,3°, y bajando el IFT de 33,2 a 8,7 mN/m.

Sin embargo, los surfactantes comerciales alcanzaron IFT más bajos (4,9 y 3,4 mN/m), sus ángulos de contacto (72° y 58,8°) fueron mayores, lo que indica menor capacidad para alterar la mojabilidad. Además, los tres surfactantes demostraron capacidad para cambiar la mojabilidad de la roca de oleofílica a hidrofílica, pero el surfactante natural fue el que mostró mejores resultados tanto en el ángulo de contacto como en la potencial zeta. Las pruebas de emulsión también confirmaron que el surfactante de quinua formó emulsiones más estables y densas. **Teniendo como conclusión que** el surfactante natural no solo es más ecológico y económico, sino que también presenta un desempeño muy competitivo frente a los productos comerciales para aplicaciones de EOR (13).

Una publicación investigativa muestra la evaluación del uso de espumas surfactantes (SF) como una herramienta prometedora en la remediación de suelos contaminados con petróleo, destacando su capacidad para desplazarse con eficacia a través de formaciones geológicas complejas, no homogéneas y de baja permeabilidad, donde otras técnicas de limpieza resultan ineficaces o poco eficientes. La principal ventaja de las espumas surfactantes es su habilidad para transportar agentes activos y facilitar la movilización de contaminantes, y esta capacidad puede potenciarse aún más mediante la incorporación de nanopartículas (NP), dando lugar a espumas estabilizadas con nanopartículas (NP-SF). La revisión se centra en comprender los mecanismos por los cuales las nanopartículas logran estabilizar la espuma en condiciones ambientales adversas. Se explica que las NP no solo incrementan la estabilidad estructural de la espuma, sino que también otorgan nuevas funcionalidades, como propiedades catalíticas, adsorbentes o reactivas que ayudan en la degradación o inmovilización de contaminantes derivados del petróleo. Además, se analizan diversos factores que influyen en el comportamiento de las NP-SF, tales como el tamaño de las nanopartículas, su carga superficial, las características de humectabilidad y, de manera importante, la proporción entre surfactante y nanopartículas. Estos factores afectan directamente la capacidad de la espuma para mantener su estructura, así como su eficiencia para encapsular, desplazar o transformar contaminantes presentes en el suelo. Entre las distintas combinaciones evaluadas, las espumas estabilizadas con nanopartículas de

sílice (SiO_2) aparecen como las más estudiadas y utilizadas, especialmente en la remediación de suelos contaminados con petróleo crudo y diésel. Estas nanopartículas ofrecen buena compatibilidad con surfactantes y permiten una adecuada formación y estabilización de la espuma en ambientes con condiciones fisicoquímicas variables. Por otro lado, también se destaca la utilidad de nanopartículas de hierro de valencia cero (nZVI) en combinación con surfactantes, ya que permiten el tratamiento eficaz de suelos contaminados con compuestos orgánicos clorados e incluso metales pesados, y todo esto con dosis bajas, lo que mejora su viabilidad económica. Un aspecto innovador mencionado en el estudio es la posibilidad de utilizar campos magnéticos externos para mejorar el rendimiento de las NP-SF, particularmente aquellas que incorporan nanopartículas magnéticas como Al_2O_3 o Fe_3O_4. Estas partículas no solo son eficaces para remover petróleo y diésel del suelo, sino que su capacidad de ser dirigidas o recolectadas mediante magnetismo facilita su recuperación y reutilización, aumentando así la sostenibilidad del proceso. En términos generales, esta revisión proporciona una base teórica sólida sobre el diseño y aplicación de espumas surfactantes funcionalizadas con nanopartículas. Además, ofrece pautas prácticas para el desarrollo de tecnologías más eficaces en la remediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Finalmente, el autor sugiere que futuras líneas de investigación deberían centrarse en el diseño de nanopartículas con propiedades fotocatalíticas, que puedan combinar la acción química y la activación lumínica para acelerar la degradación de contaminantes, lo cual representaría un avance importante en el tratamiento de suelos altamente contaminados (22)**.**

En otro trabajo de investigación compara diferentes tipos y concentraciones de surfactantes utilizados en la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo, incluyendo surfactantes aniónicos, catiónicos, no iónicos, mixtos y biosurfactantes. También se aborda el potencial de surfactantes emergentes, como los surfactantes gemini (que presentan una estructura molecular doble con mayor eficiencia) y los surfactantes conmutables, cuya funcionalidad puede modificarse en respuesta a estímulos externos, lo que amplía sus aplicaciones en condiciones ambientales variables.

El artículo examina tanto aplicaciones in situ como ex situ del lavado de suelos, y se detallan los mecanismos fundamentales que permiten a los surfactantes movilizar los contaminantes: solubilización, emulsificación y reducción de la tensión interfacial entre las fases contaminante y acuosa. Además, se discuten criterios clave para la selección del surfactante más adecuado, incluyendo su toxicidad, biodegradabilidad, compatibilidad con el tipo de suelo y el tipo de hidrocarburo presente. Uno de los aspectos destacados en la revisión es el análisis de los factores operativos y ambientales que afectan la eficiencia del proceso, como el pH, la temperatura, la salinidad, la concentración crítica micelar (CMC) y la capacidad de adsorción del surfactante en el suelo. Ayele también hace énfasis en cómo las propiedades físicas y químicas tanto del suelo como del contaminante influyen directamente en el éxito del tratamiento. Además, se subraya la importancia de combinar el lavado de suelos con tecnologías complementarias, como el tratamiento de efluentes generados durante el proceso, con el fin de minimizar el impacto ambiental y mejorar la sostenibilidad del sistema. En ese sentido, la reutilización de surfactantes es otro aspecto abordado, ya que representa una oportunidad para reducir costos y residuos, aunque todavía enfrenta limitaciones técnicas que deben ser superadas. En este estudio se realizó análisis de determinación del contenido inicial y final de hidrocarburos totales del petróleo en el suelo usando el análisis químico de extracion y cuantificación instrumental, así como la evaluación de la eficiencia de remoción en función al tipo de surfactante, concentración, la relación con la CMC y las condiciones del lavado solido-líquido y tiempo de contacto. El análisis de los parámetros fisicoquímicos del suelo y del efluente de lavado se usaron para interpretar los mecanismos de desorción y solubilización.

Finalmente, el autor propone una serie de desafíos pendientes en esta área, como el desarrollo de surfactantes más eficientes, menos tóxicos y más específicos, así como el diseño de métodos que permitan adaptar el tratamiento a diferentes tipos de suelos y condiciones climáticas. Se sugiere que futuras investigaciones deben enfocarse en la optimización de formulaciones de surfactantes y en la integración de tecnologías avanzadas para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos (23).

En un estudio internacional se evaluó las propiedades fisicoquímicas y tensioactivas de saponinas naturales extraídas de residuos de Furcracea foetida teniendo en objetivo de determinar su potencial como surfactante sostenible en sistemas coloidales como lo son las espumas y emulsiones, para así poder compararlas con saponinas comerciales como los la de Quillaja Saponaria. Se planteo que estos compuestos podrían emplearse biosurfactantes en aplicaciones industriales y ambientales incluyendo procesos de remediación.

Para desarrollar este estudio se realizó el análisis de estructura química mediante UPLC-ESI-HRMS identificando saponinas, flavonoides y otros metabolitos; para la determinación de tensión superficial y Concetracion micelar critica (CMC) se usa el tensiómetro de fuerza Kruss K-100, para la evaluación del balance hidrofílico-lipofílico mediante el método del PIT-Slope; para la preparación y caracterización de emulsiones en un sistema agua aceite (O/W) se usó la granulometría. **Teniendo como resultados** que la saponinas de Furcracea foetida presento una CMC de 0.025 % en peso, dentro del rango reportado para saponinas comerciales las cuales mostraron un carácter hidrofílico predominante con un comportamiento comparable al surfactante químico Tween 40, con el cual comparten tamaño de gota similar y que el aumento de la concentración de saponinas reduce el tamaño de gota hasta alcanzar la saturación interfacial, así mismo se obtuvieron nano emulsiones mediante sonicación y alta estabilidad sin coalescencia. Las propiedades espumantes fueron similares o superiores a surfactantes sintéticos, mostrando alta estabilidad de espuma. **En conclusión,** las saponinas obtenidas de Furcracea foetida constituyen una fuente prometedora de biosurfactantes natural con propiedades emulsificantes y espumantes comparables a surfactantes comerciales lo que respalda su aplicación en formulaciones y procesos de remediación ambiental de suelos contaminados con hidrocarburos (26)

CAPITULO II

METODOLOGIA

1. Técnicas, instrumentos

1.1. Técnicas

Para la variable “caracterización de las saponinas” se aplicaron las siguientes técnicas:

- Observación laboratorial.
- Tensión superficial
- PIT-SLOPE
- Granulometría
- Emulsificación.
- Estabilidad de espuma
- Observación laboratorial.
- Contaminación ex situ.
- Análisis de espectrofotometría UV-vis.

Para la variable: “Movilización de hidrocarburos” se aplicarán los siguientes instrumentos

- Observación de espectrofotometría UV-vis.
- Observación de análisis del sobrenadante.
- Observación de desorción en agua.

Para la variable “Biodegradación de hidrocarburos”

- Observación cualitativa de unidades formadoras de colonias (UFV) en recuento en Placa.
- Disolución serial.

1.2. Instrumentos

Para la variable “Caracterización de las saponinas”, aplicaron las siguientes técnicas:

- Tensiómetro de fuerza Kruss K -100 fabricado en Alemania
- Termo estabilizador de agua o chiller
- Conductímetro
- Granulometro Mastersize Hydrob

- Homogeneizador de alta velocidad Ultraturrax T-10.
- Analizador dinámico de espuma DFA100FSM k-100 Kruss fabricado en Hamburgo, Alemania.
- Espectrofotómetro GENESYS ™ 180 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific) (Hiai et al., 1975).
- Homogeneizador de alta velocidad Ultraturrax T-10;

Para la variable: “Movilización de hidrocarburos” se aplicaron los siguientes instrumentos

- Espectrofotómetro GENESYS ™ 180 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific)
- Medidor de humedad (Fdit Tester 240V Intelligent NPK)

Para la variable “Biodegradación de hidrocarburos

- Ensayo estandarizado por la ISO 4833-1:2013 – Microbiology of the food chain — Enumeration of microorganisms (adaptable al suelo)

1.3 Cuadro de coherencias

Tabla 1. Cuadro de coherencias.

	Variable	Indicadores	Subindicadores	Técnica e Instrumento	Estructura del instrumento
Independientes	Caracterizar las propiedades tecno-funcionales de la saponina según la pureza	Tensión superficial	Cantidad Critica Micelar (CMC)	**Técnica:** •Tensiómetro de fuerza. •Observación laboratorial. •Absorbancia **Instrumento:** •Espectrofotómetro GENESYS ™ 180 UV-Vis •Granulometro Mastersize Hydrob •Homogeneizador de alta velocidad Ultraturrax T-10; •Agitador ultrasonidos Sonotrode S26d2. • Analizador dinámico de espuma DFA100FSM fabricado en Alemania.	Se midió la tensión superficial de las saponinas para hallar la Cantidad Critica Micelar (CMC) con el ten Se midió el tamaño de gota con el granulometro en sistema agua aceite Y se halló las propiedades anafiliticas usando la PIT-SLOPE modificando la temperatura en sistema aceite agua. Para la estabilidad de espuma se usó el doble de la CMC y se probó la estabilidad en analizador de espuma por 20 minutos con 5 repeticiones.
		Emulsiones	Tamaño de gota		
		Propiedades anifililiticas	Nivel hidrofílico		
		Espuma	Estabilidad de espuma		
		Pureza de las saponinas extraídas de los residuos de la quinua	Porcentaje de pureza de saponina.	**Técnica:** -Cavitación hidrodinámica -Filtración secuenciada mediante membranas de ultrafiltración y nanofiltración - Secado por aspersión **Instrumento:** •Sistema de cavitación •Filtro de membranas •Spray Drying •Espectrofotómetro GENESYS ™ 180 UV-Vis	El residuo granos de quinua “Chenopodium quinoa” se dispersó en una solución etanólica y se sometió a cavitación hidrodinámica mediante un sistema de cavitación, la mezcla resultante se acidificó y se dejó decantar. El sobrenadante se recuperó y se filtró secuencialmente mediante membranas de ultrafiltración y nanofiltración y se secó por aspersión, obteniéndose un polvo oscuro. La solución se hizo reaccionar con vainillina y una solución de ácido sulfúrico y se incubó Tras la reacción, se midió la absorbancia
Dependientes	Movilización de hidrocarburos	Concentración de hidrocarburos liberados del suelo (mg/kg)	- Desorción	**Técnica:** •Espectrofotometría UV-VIS •Análisis químico del sobrenadante •Disolución en agua **Instrumento:** Espectrofotómetro GENESYS ™ 180 UV-Vis •Medidor de humedad	Para evaluar la movilización del hidrocarburo liberado del suelo, se mide en la fase acuosa y seca, con el espectrofotómetro UV-Vis, evaluando su absorbancia en periodo de tiempo establecido y sus parámetros iniciales, durante y finales indicara la cantidad de desorción y solubilización cuantitativamente.
		Aumento de hidrocarburos en fase acuosa	- Solubilización		
	Biodegradación de hidrocarburos	% de degradación de hidrocarburos	- Reducción de contaminantes	**Técnica:** •Recuento en Placa •Disolución serial **Instrumento:** Ensayo estandarizado por la ISO 4833-1:2013	La concentración remanente de hidrocarburos se comparará cuantitativamente con el control positivo, el cual para comprobar micro ecosistema se hará recuento de placa con el método de la norma ISO 4833
		Aumento de UFC	- Actividad microbiana		

Nota. Elaboración propia.

2. Campo de verificación

2.1. Ubicación espacial

El trabajo de investigación se realizó de manera Ex situ por simulación de contaminación en el Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Católica de Santa María, provincia de Arequipa, departamento de Arequipa. La institución educativa superior geográficamente, está situado a una latitud de 16°24'22" S y una longitud de 71°32'51" O. La Universidad (sede central) Urb. San José s/n, Umacollo.

2.2. Ubicación temporal

Esta investigación tuvo una duración total de once meses, la etapa experimental de laboratorio se llevará a acabo de abril 2025 a diciembre 2025. Dado el alcance temporal y los objetivos específicos del estudio, esta investigación se consideró coyuntural.

2.3. Unidades de estudio

2.3.1 Muestras de tierra

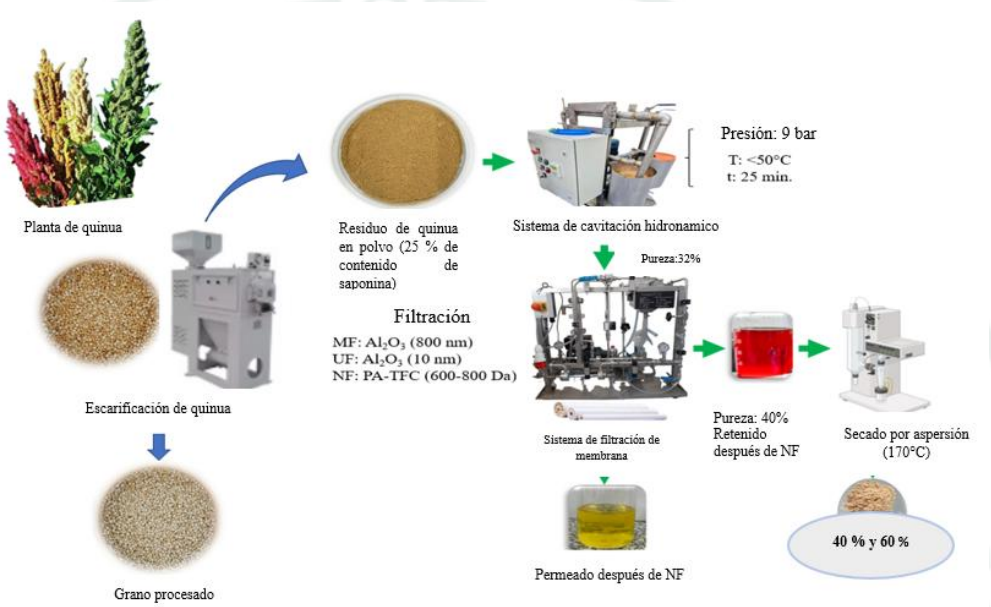
Las muestras de tierra utilizado en el presente estudio, fueron recolectados de un cultivo de VID ubicado en el distrito de Tiabaya, provincia y departamento de Arequipa.

2.3.2 Obtención de extractos de saponina

El polvo de quinua (residuo) se obtuvo tras la escarificación mecánica de granos de Chenopodium quinoa y posteriormente se analizó su contenido de saponinas. Posteriormente, el residuo se dispersó en una solución etanólica al 80 % (v/v) y se sometió a un proceso de extracción mediante cavitación hidrodinámica conforme se muestra en el diagrama mostrado en la Figura 1, el proceso de extracción se realizó a una presión de 9 bar y 35 °C durante 15 min. Tras la extracción, la mezcla resultante se acidificó a pH 4 y se dejó decantar. El sobrenadante se recuperó y se filtró secuencialmente mediante membranas de ultrafiltración (800 nm) y nanofiltración (10 nm y 600-800 Da). El retenido de nanofiltración (600-800 Da) se secó por aspersión, obteniéndose un polvo oscuro. Posteriormente, el polvo seco se re-disolvió en agua y se sometió a un

proceso de adsorción con resina macroporosa AB-8. La adsorción se realizó con 50 g de polvo disueltos en 1 L de agua y 50 g de resina previamente activada, a 25 °C durante 24 h. Tras la adsorción, se realizó la desorción con una solución etanólica al 80 % (v/v) y se secó, obteniendo de esta forma el extracto de saponina en polvo con 60% de pureza.

Figura 1. Proceso de purificación de saponina.



Nota. Elaboración propia.

Finalmente, el extracto recuperado se secó por aspersión en un atomizador y el polvo resultante se analizó para determinar su contenido de saponinas siguiendo el método descrito por Hiai et al. (1975). Para la cuantificación de saponina, se disolvieron 500 mg de polvo de extracto de saponinas en etanol al 80 % (v/v). La solución se hizo reaccionar con vainillina y una solución de ácido sulfúrico-etanol (90 %) y se incubó a 60 °C durante 1 h. Tras la reacción, se midió la absorbancia a 600 nm con un espectrofotómetro GENESYS™ 150 (Thermo Scientific, EE. UU). Se utilizó ácido oleanólico como estándar para construir la curva de calibración.

2.3.2 Caracterización techno-funcional de los extractos de saponina

2.3.2.1. Tensión Superficial.

La caracterización del extracto de saponina con nivel de pureza de 40% y 60 % se realizó en el laboratorio de la facultad de Química de

la Universidad Central de Lille en Francia usando el tensiómetro de fuerza Kruss K-100, para hallar la Concetracion Critica Micelar (CMC) a partir de la tensión superficial de cada saponina para esto se realizó diluciones logarítmicas desde 0.001 g/L a 10 g/L a partir de soluciones stock concentradas usando agua ultra pura, la cual tiene como tensión superficial conocida de 72 mN/m esta también se usa para calibrar el tensiómetro de fuerza y para mantener los parámetros y resultados reproducibles del estudio, se mantuvo el ambiente a una temperatura de 25°C (27) quien hace énfasis en mantener el parámetro de la temperatura constante.

Tanto la CMC y la tensión superficial en CMC (γCMC) se determinaron a partir de su punto de ruptura de la tensión superficial versus los perfiles de Concetracion de surfactante.

Los valores de exceso de superficie máximo (a_1^s) y el area por molécula en la interfaz (Γ), también se calcularon la ecuación de la Isoterma de Gibbs expresada de la siguiente manera para un tensioactivo no iónico (26).

$$\Gamma = -\frac{1}{2.303\ RT}\left(\frac{d\gamma}{d\log C}\right)_t$$

Donde γ es la tensión superficial (mN/m) y R= 8.314 J/mol.K

El área por molécula en la interfaz (a_1^s) se expresa en angstroms cuadrados usando la ecuación siguiente

$$a_1^s = \frac{10^{16}}{N\Gamma}$$ **Ecuación 1**

Lo cual se reportó y comparo con otros estudios de surfactantes como se muestra en la Tabla 2.

2.3.2.2. PIT-Slope (Phase Inversion Temperature).

El PIT-Slope, fue realizado en laboratorio de la facultad de Química de la Universidad Central de Lille en Francia. Para esto se utilizó un matraz de doble pared con salida y entrada de agua conectada calentador o chiller que circula agua, se introdujo un conductímetro en una tapa de jebe para mantener la hermeticidad y agrego un agitador magnético en el matraz para mantener la agitación constante y controlada (500 rpm); todo este sistema se montó en un hot plate con ayuda de un soporte universal y conectado a una computadora que marca en tiempo real la temperatura vs la conductividad.

Se parámetro el rango de temperatura en el calentador a aumentar y disminuir un grado centígrado por minuto durante 15 minutos durante las corridas de calentamiento y enfriamiento; con el objetivo de observar la "inversión" lo cual se refiere a que visualmente en la computadora se observa que a una temperatura exacta el sistema se invierte haciendo la gráfica caiga cuando el sistema se calienta y cuando el sistema se enfría justa a la esa misma temperatura el sistema regresa a la normalidad haciendo que el grafico suba, esto es el llamado PIT SLOPE. El contenido del matraz es un sistema de agua salada y aceite en este caso se utilizó usó una solución de agua salada NaCl, n- octano y 3 % en peso de C10E4 como primera "corrida", ya que este sistema se usa como blanco ya que su temperatura de inversión es de 17°C y así se comprueba que el sistema este bien ensamblado y los compuesto en la proporción adecuada, a este sistema se le fue agregando la Saponina de 40 % que fue disuelta en una solución al 5 % cuidando que el balance de agua y aceite estén en condiciones iguales, así como el peso en porcentaje respecto a saponina, se registró dos corridas de aumento de temperatura y dos de disminución por cada vez que al sistema se le aumentaba la solución de saponina, así mismo el rango de temperatura fue aumentando hasta que la inversión no se dio más. Lo mismo se realizó con la saponina de 60 %.

Este método fue replicado del estudio de saponinas de Furcraea Foetida realizada por Randriamamonjy el al. (2022) (26)

2.3.2.3 Propiedades emulsionantes.

Fue realizado en los laboratorios de la Ecole Centrale de Lille en Francia, para determinar las propiedades de emulsión de los extractos de saponinas con 40 % y 60 % de pureza, se usó un sistema de agua y miristato de isopropilo (IPM) en relación 50/50 p/p. para tener un sistema agua – aceite O/W Se probaron diferentes concentraciones de saponinas, a los cuales se le sometió a una agitación por dos minutos con el ULTRA TURRAX® a una a velocidad de 16000 rpm. Por la naturaleza orgánica de la saponina y para su preservación en el tiempo también se hizo un comparativo añadiendo el 2- fenoxietanol como conservante orgánico conocido por su eficacia contra bacterias, levaduras y mohos, así como lo indica la Academia Española de Dermatología y Venereología, para su análisis se usó el Granulómetro Masterizer Hydro, 3000 (26) el cual mide el tamaño de gota y halla el promedio de 10 mediciones por minuto y para comprobar la forma redonda de gota se observó en un microscopio óptico a 500x.

2.3.2. Estabilidad de Espuma

Fue realizado en los laboratorios Intuitu Chevrolet, Lille en Francia Las propiedades espumantes de las saponinas se estudiaron utilizando el DFA-100 de Krüss La concentración se fijó 2 veces la CMC para todas las muestras. Se añadieron 50 ml de la solución a la columna de vidrio CY4572. Se envió aire presurizado a la columna a través de un papel de filtro FL4551 (12–25 µm) a una velocidad de 0,2 L/min y se detuvo la formación de espuma a una altura total (líquido+espuma) de 180 mm. La espuma (hfoam), el líquido (hliquid) y la altura total (h) se monitorearon durante 20 min después de alcanzar los 180 mm. La distribución del tamaño de las burbujas fue monitoreada por el software ADVANCE a una altura de 10 cm. Todos los experimentos se realizaron al menos por

triplicado. La densidad máxima de la espuma (FD) y la estabilidad de la espuma (FS) a 1200 s se definen como sigue en la ecuación 2 y 3:

$$FD_{t=0} = \frac{\text{Vliquid in the foam}}{\text{Vfoam}} \times 100 \qquad \textbf{Ecuación 2}$$

$$FS_{t=1200} = \frac{\text{hfoam}_t}{\text{hfoam}_{t=0}} \times 100 \qquad \textbf{Ecuación 3}$$

la formación de espuma es máxima en concentraciones cercanas o superiores a la CMC (28)

2.3.3. Caracterización de suelo

Para la caracterización se recolecto alrededor de 2 kilos de tierra agrícola fértil para cultivo de vid, usando el método ZigZag, para posteriormente en laboratorio de Bioprocesos de UCSM se realizó un tamizado grueso para luego contaminarla con petróleo simulando una contaminación ex situ y se realizó análisis microbiológico (hongos y bacterias) tanto en la tierra contaminada y sin contaminar.

2.3.4. Procedimiento de muestreo de suelo.

Se utilizo el método de muestreo ZigZag, basado en las recomendaciones del Manual de muestreo USDA (Soil Survey Manual) y la norma ISO 18400-102:2017, el cual se realizó de la siguiente manera;

- Se delimito el área de estudio 1 hectárea.
- Se camino en un patrón de zigzag a lo largo del terreno,
- Cada 20 metros se tomó una submuestra del suelo, se toma entre 15 a 20 submuestras.
- Se escarbo a una profundidad de 20 cm en cada submuestra.
- Se recolecto aproximadamente de 500 g a 1000 g.
- Se preservo en una bolsa de plástico y se rotula.

2.4. Estrategias de recolección de datos

2.4.1. Organización

- Se llevo a cabo la recolección de datos con la revisión y recopilación de publicaciones.

- Se consolido los datos y se prospecto ensayos en el laboratorio de bioprocesos ubicada dentro de la Universidad Católica de Santa María.
- Se recolecto el suelo agrícola que fue sometido a contaminación.
- Se caracterizo la saponina en la universidad de Lille Francia
- Se hallo la Concetracion critica micelar de cada saponina.
- Por cada 1200 g de suelo agrícola se añadió 6000 mg de petróleo comercial para tener una contaminación moderada, posteriormente se mezcló hasta homogeneizar, procedimiento usado en estudios de contaminación y remediación de suelo así lo reportan Urum & Pekdemir et. al. (29) (2004) y Mulligan et al. (2005) (30)
- Se dejo reposar por 48 horas para permitir que la absorción del hidrocarburo, es decir contamine al suelo.
- Se halló la curva de calibración o cuantificación del petróleo comercial adquirido en un grifo aleatorio, para esto se usó un picnómetro y se calculó la densidad exacta del petróleo la cuál fue 0,894 gr/cm, para posteriormente medir en el Espectrofotómetro GENESYS ™ 180 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific), este espectrofotómetro esta calibrado y certificado como se muestra en el **Anexo 2**, posteriormente se uso diluciones seriadas con hexano se calculó la curva de calibración, con la cual se obtuvo la ecuación de la recta donde se despejo la variable "x" y reemplazo "y". como se muestra en la ecuación 2 en anexos. Así se cuantifico la concentración de petróleo para cada nivel de absorbancia como muestra en la siguiente tabla.

Tabla 2. Absorbancia del petróleo en distintas diluciones y su concentración en g/L.

DILUCION g/L	ABSORBANCIA	CONCENTRACION g/L
1,00	1,148	0,98
0,50	0,622	0,52
0,25	0,327	0,26
0,13	0,167	0,12
0,06	0,088	0,05

Nota. Elaboración propia.

- Se uso el hexano como solvente debido a su alta eficiencia de extracción, baja polaridad, por su bajo ruido en el espectrofotómetro y alta selectividad con los hidrocarburos, estos se encuentran a una absorbancia de 250 nm, así se reporta en el EPA Method 1664
- Se dividió en 4 muestras de 25 gr de tierra contaminada y se llevó a una humedad del 60 %, con agua ultrapura, de las cuales: dos fueron sometidas al tratamiento de saponina de 40 % y de 60 %, una fue el control positivo usando un surfactante químico comercial el tween 80 y finalmente una sin ningún tratamiento para usarlo de control negativo cada muestra se realizó por triplicado para 4 mediciones cada 7 días. es decir 45 unidades de estudio.
- Se uso un "blanco" o control positivo de tierra sin contaminar y con 60 % de humedad sin ningún tratamiento esta también se realizó por triplicado para 4 mediciones cada 7 días. Dando 15 unidades de estudio.
- Se agrego la saponina del 40% y 60 % según su Concetracion Critica Micelar CM. en caso de la saponina de 40 % fue de 0.75 g/L y de la saponina de 60 % 0.22 g/L. Se deja en agitación a 180 rpm, se cubrió los matraces con 4 capas de gasas para evitar la evaporación del agua, pero permitiendo el intercambio de gases, a una temperatura de 25°C, estas son saponinas de extracion propia del laboratorio de investigación.
- Al momento de analizar las muestras se separa la parte acusa de la tierra con 6 capas de gaza y para evitar la contaminación de cruzada de la tierra al agua, cuando se separa la fase acuosa somete a una centrifugación mínima de 2000 RPM por dos minutos para poder decantar la tierra que se pudo haber filtrado a la fase acuosa y se pone hexano en relación 1:1 en mililitros, para luego someterla al vortex por 5 minutos a máxima potencia.
- Para analizar la cantidad de petróleo en la tierra se pesó 5 gr de tierra después de haber pasado 30 minutos a una temperatura de 21°C y se controla la humedad para tener una medición exacta en cada de medición para después agregar 10 mL de hexano y someterlo al vortex por 5 minutos a máxima potencia para luego registrar su absorbancia en el espectrómetro

- Se verifico y monitoreo los resultados, analizando la efectividad de la reducción de los hidrocarburos totales de petróleo (TPH) en las muestras con la medición en el espectrofotómetro en tres momentos clave de los tratamientos, se realizó el análisis a los 1, 7, 14 y 21 días. La disminución progresiva de los niveles de TPH con el tiempo fue el principal indicador del éxito de la biorremediación, como se muestras en el **Anexo 6** detallada semana a semana.
- Se realizo un análisis de tierra para hongos y bacterias para cada semana.
- Los datos fueron procesados en una base de datos en Excel, este conteo es detalla en el **Anexo 5.**
- Con la base de datos completa se procedió al análisis estadístico en Statgraphics XVII – X64, como se detalla en el **Anexo 1.**

2.5. Recursos

2.5.1. Humanos

- Investigador: Alexandra Pattricia Luperdi Puente de la Vega
- Asesor: Dr. Ruly Terán Hilares
- Personal técnico del laboratorio

2.5.2. Materiales

- Residuos de quinua.
- Etanol.
- Vainillina.
- Ácido oleanólico.
- Saponinas.
- Agua ultrafina.
- Bagueta.
- Matraz de doble fondo
- Tapa de jebe.
- Mangueras de jebe.
- Frascos de análisis desechables.

- Soporte universal
- Petróleo.
- Tierra.
- Agitador mecánico.
- Gaza.
- Ligas.
- Bureta.
- Beaker.
- Octano.
- Aceite de Girasol.
- Tween 80.
- Miristato isopropilo.
- Agua Salada.
- Libretas de campo.
- Agitador mecánico.
- Asa de Digrasky.
- Placas Petri de platico.
- Micropipetas.
- Ácido sulfúrico
- Tips de micropipeta.
- Celdas de cuarzo.
- Matraces.
- Programa Microsoft Excel 2016.
- Statgraphics.

2.5.3. Equipos

- Sistema de cavitación hidronamica de diseño propio del Laboratorio de Bioprocesos de UCSM
- Sistemas de membrana de filtración INOPOR – Fabricado en Alemania
- Spray Driying – Yamato GB 210B.
- Incubadora CLW- POL- EKO hecho en Alemania.

- Cámara de Flujo Laminar Vertical BIOBASE BSC-4FA2, hecho en china.
- Balanza analítica 0.1 mg SERIE AB – Armotec.
- Tensiómetro de fuerza Kruss K-100 (Kruss, Alemania)
- Espectrofotómetro GENESYS ™ 180 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, USA).
- Membranas de nanofiltración
- Chiller o calentador CSL-CHILLER Cleaver Scientific hecho en reino unido
- Conductímetro HI 2315
- Agitador ultrasonidos (Sonotrode S26d2) (Hielscher, Alemania)
- Computadora y/o laptop.
- Impresora.
- Computadoras y/o laptop.
- Cámara fotográfica.

2.5.4. Financieros

El proyecto fue financiado por PROCIENCIA, en el marco del proyecto titulado "Nuevas perspectivas de valorización de la saponina de la quinua: Extracción, purificación, caracterización fisicoquímica y tecno-funcional" con el número de contrato: PE501086190-2024, cuyo responsable técnico del proyecto es el Dr. Ruly Terán Hilares.

2.5.5. Institucionales

Se uso del laboratorio de Bioprocesos de la Universidad católica de Santa María y la Universidad Central de Lille 2 en la escuela de Química.

2.6. Validación de Instrumentos

La validación de estos instrumentos se vio reflejado en la reducción de hidrocarburos totales (TPH) en el suelo cuando los niveles concentración de petróleo descendieron; el incremento en la cantidad de TPH en la fase acuosa usando indico la movilización THP. Esas mediciones se realizaron en el Espectrofotómetro GENESYS ™ 180 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific) calibrado y de confianza científica, antes durante y al final de los tratamientos: a los 1, 7, 14 y 21 días respectivamente.

Se uso el estándar del ISO 4833-1:2013 para el recuento microbiano de unidades formadoras de colonias (UFC).

2.7. Criterios para el manejo estadístico de resultados

2.7.1. A nivel de recolección

Los datos recolectados fueron producto del ensayo investigativo en el laboratorio fueron categorizados, analizados y clasificados en una matriz en Excel 2016, para su análisis e interpretación.

2.7.2. A nivel de sistematización

a. Clasificación

Se elaboro una matriz con los datos recolectados, donde se clasifico por lo días trascurridos, cantidad de Hidrocarburos TPH bio-degradado, absorbancia concentración de saponinas y conteo en placa. La matriz será diseñada en Microsoft Excel 2016.

b. Tabulación

Se organizó y los datos recolectados en una tabla, de forma ordenada y estructurada, para su análisis e interpretación. Se clasifico los valores por variables, tratamientos, repeticiones o bloques para el análisis estadístico, como el ANOVA.

c. Graficación

Se represento visualmente los datos obtenidos en la investigación mediante gráficos o diagramas, con el fin de facilitar su comprensión, comparación y análisis. Permitió identificar tendencias, patrones o diferencias entre grupos, como tratamientos, repeticiones o bloques, y es especialmente útil después de tabular y procesar los datos estadísticamente.

2.7.3. A nivel de análisis de datos

El análisis de datos obtenidos se analizó estadísticamente mediante un ANOVA MULTIFACTORIAL con un nivel de significancia de $p < 0.05$, Seguido por la prueba de Tukey para comparación múltiple para identificar entre qué tratamientos ocurren dichas diferencias. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando software como Statgraphics XVII – X64.

.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

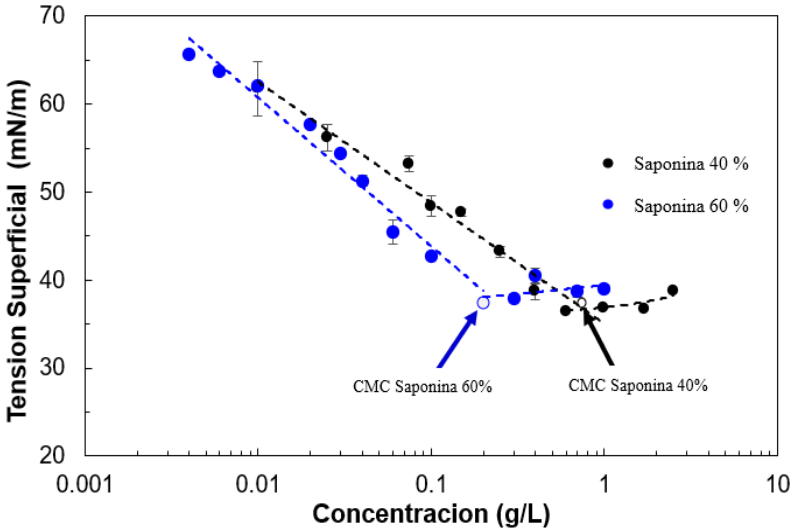
1. Resultados y discusión

1.1. Caracterización de las propiedades tensoactivas de la saponina

1.1.1. Tensión superficial

En los extractos de saponina obtenidos a diferentes niveles de pureza se determinó la tensión superficial con el objetivo de evaluar su comportamiento tensioactivo. Para ello se analizaron los perfiles de tensión superficial en función de la concentración de saponina, y los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 2**. Como se observa, el incremento en la pureza del extracto de saponina de 40 % a 60 % produjo una disminución notable en la concentración micelar crítica (CMC), pasando de 0.75 g/L a 0.22 g/L. Este comportamiento indica un proceso de autoensamblaje más eficiente y una mayor capacidad de adsorción interfacial por parte de las moléculas de saponina con mayor grado de pureza, lo que permite la formación de micelas a concentraciones más bajas.

Figura 2. Variación de la tensión superficial en función de la concentración de extractos de saponina de quinua con diferentes niveles de pureza.



Nota. Elaboración propia.

En consecuencia, el extracto de saponina con pureza del 60 % presenta una CMC menor que el extracto con pureza del 40 %. Este comportamiento puede explicarse considerando que valores bajos de CMC suelen asociarse con una mayor eficiencia tensioactiva, lo que refleja una mayor proporción de moléculas anfifílicas activas disponibles en la solución. Diversos estudios han señalado que la pureza del surfactante influye directamente en la capacidad de reducción de la tensión superficial y en la eficiencia de formación de micelas. En particular, Swaraj Deodhar et al. (26) y Russo Martínez (31) reportaron que surfactantes

con menor CMC presentan mayor eficiencia interfacial, debido a la mayor disponibilidad de moléculas activas capaces de adsorberse en la interfase. Los valores de CMC obtenidos en este estudio se encuentran dentro del rango reportado para otras saponinas vegetales. Por ejemplo, las saponinas comerciales obtenidas de Quillaja saponaria presentan valores de CMC entre 0.026 y 0.03 g/L, mientras que en saponinas extraídas de torta de semilla de Camellia oleifera se ha reportado una CMC cercana a 0.15 g/L (32). Aunque las saponinas de quinua presentan valores de CMC ligeramente superiores en comparación con algunos biosurfactantes comerciales, los resultados obtenidos demuestran un comportamiento tensioactivo comparable.

En la **Figura 2** también se observa que el incremento en la concentración de saponina provoca una reducción progresiva de la tensión superficial del agua, desde aproximadamente 72 mN/m hasta valores cercanos a 36–38 mN/m. A partir de este punto, la tensión superficial se estabiliza, lo cual indica la saturación de la interfase y la formación de micelas en la solución. Este comportamiento es característico de los surfactantes y ha sido ampliamente reportado para saponinas triterpenoides de alta pureza, las cuales presentan una elevada eficiencia interfacial y una alta capacidad emulsificante. Los valores obtenidos en este estudio son comparables con los reportados para otras saponinas vegetales, lo que evidencia el potencial de los extractos de quinua para aplicaciones en sistemas emulsificados, como se muestra en la **Tabla 3**.

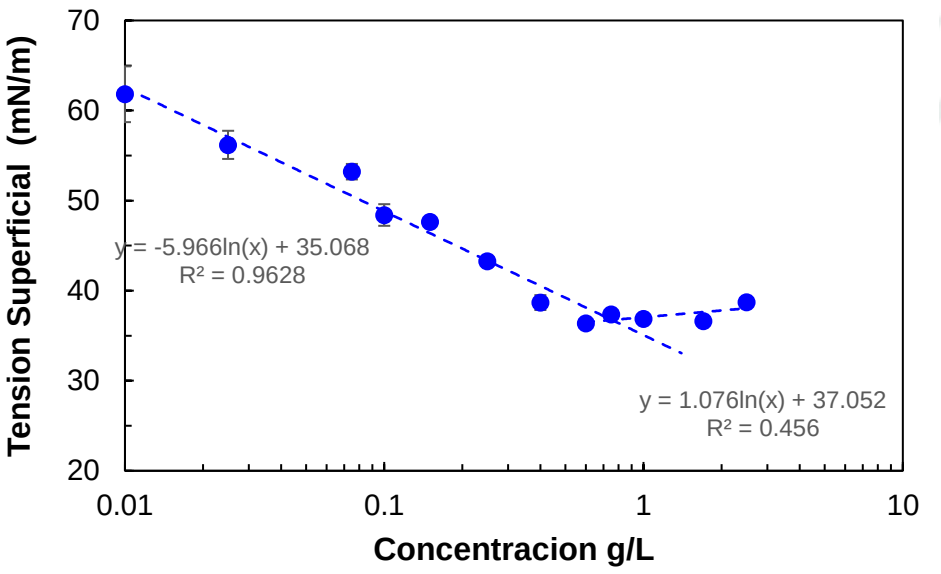
Por el contrario, los extractos crudos de saponinas provenientes de quinua u otras especies vegetales, como Albizia procera o Saponaria officinalis, suelen presentar valores de CMC considerablemente más elevados, generalmente entre 1 y 7 g/L. Este comportamiento se atribuye principalmente a la presencia de impurezas y compuestos no tensioactivos en los extractos, los cuales interfieren en el proceso de adsorción interfacial y reducen la eficiencia tensioactiva del sistema. Al comparar estos resultados con surfactantes sintéticos como el Tween 60, que presenta purezas superiores al 90 %, se observa que su CMC se encuentra en un orden de magnitud similar al de las saponinas de quinua, aunque la tensión superficial alcanzada puede ser ligeramente menor. Esto indica que, aunque los surfactantes sintéticos pueden presentar mayor eficiencia en términos de CMC, las saponinas de quinua constituyen una alternativa natural con un desempeño competitivo y un importante potencial para aplicaciones en procesos de remediación ambiental y formulaciones emulsificantes.

En general, los resultados obtenidos demuestran que la pureza del extracto de saponina influye directamente en la concentración micelar crítica. Los surfactantes con mayor grado de pureza presentan una mayor capacidad para saturar la interfase y formar micelas a concentraciones más bajas, mientras que las soluciones con mayores niveles de impurezas requieren concentraciones más altas de surfactante para alcanzar el mismo efecto debido a la interferencia de compuestos no tensioactivos presentes en la mezcla (26).

La estimación detallada de la CMC para los extractos de saponina evaluados se presenta en la **Figura 3** y la **Figura 4**. En estas figuras se identifica el punto de transición donde la reducción de la tensión superficial deja de ser proporcional al incremento de la concentración y comienza a estabilizarse, indicando la formación de micelas.

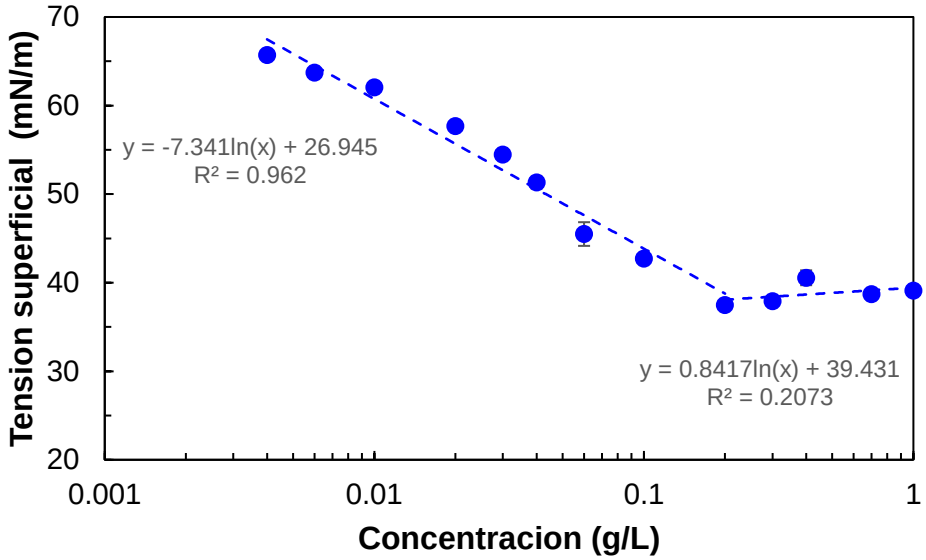
Para determinar la CMC se calcularon las ecuaciones de las rectas correspondientes a la región de disminución de la tensión superficial y a la región de saturación; posteriormente ambas ecuaciones se igualaron para determinar el punto de intersección, como se muestra en las ecuaciones 4 y 5 presentadas en el **Anexo 4**. Mediante este procedimiento se obtuvieron valores de CMC de 0.75 g/L para la saponina con pureza del 40 % y de 0.22 g/L para la saponina con pureza del 60 %. Este método de determinación de la CMC es ampliamente utilizado en estudios de caracterización de surfactantes y ha sido reportado previamente para saponinas obtenidas de diferentes fuentes vegetales, como Furcraea foetida (26).

Figura 3. Tensión superficial de la Saponina de pureza del 40 %.



Nota. Elaboración propia.

Figura 4. Tensión superficial de la Saponina de pureza del 60 %.



Nota. Elaboración propia.

Finalmente, en la **Tabla 3** se presentan de manera comparativa los valores de CMC reportados en diferentes estudios para saponinas provenientes de diversas fuentes vegetales. Esta comparación permite contextualizar los resultados obtenidos y evaluar el desempeño tensioactivo de los extractos de saponina de quinua en relación con otros biosurfactantes reportados en la literatura. En términos generales, se observa que tanto la pureza del extracto como el método de extracción influyen directamente en la concentración micelar crítica y en la capacidad de reducción de la tensión superficial. Estas propiedades determinan el desempeño interfacial y emulsificante de los biosurfactantes, lo que resulta particularmente relevante para aplicaciones en procesos de biorremediación y en sistemas de emulsificación.

Tabla 3. Comparación de la concentración micelar crítica (CMC) y propiedades tensioactivas de diferentes saponinas reportadas en la literatura

Fuente	Extracion	Purificación	Pureza	CMC (g/L)	γCMC (mN/m)	Tipo de saponina	Referencia
Saponina de Quinua	Cavitación hidronamica usando 80 % de etanol	Membrana (UF and NF)	40%	0.75	36.70	Triterpenoide	Este estudio
		Membrana seguida de absorción en resina AB-8	60%	0.22	38.20		Este estudio
Saponina de Quinua	Cavitación hidronamica usando agua	precipitación a pH 4.5 con filtración 30 nm y extracion con metanol y secado	40%	1.2	50	Triterpenoide	(33)
Semillas de quinua	Extracion hidroalcohólica con 80% etanol por 16 horas	Filtrado y liofilizado	ND	3.3	31	Triterpenoide	(34)
Furcraea foetida	Soxhlet (n-butanol)	Precipitado en acetato de etilo y recristalizado en isopropanol	ND	0.24	49.20	Esteroidal	(26)
Saffron corm (cormo de azafrán)	Remojo en etanol (50%) y calentado a ebullición	Tratamiento con n- hexano, metanol con acetona	84.43%	2.73	48.71	Triterpenoide	(35)
Saponaria officinalis L.	Hervido	Filtrado en prensa de aceite y papel filtro; evaporado	ND	1	44.33	Triterpenoide	(36)
Albizia procera	Macerado 72 h en 70% metanol	Filtrado y evaporado	Crudo	7	44	Triterpenoide	(37).
Acanthophyllum Glandulosum	Soxhlet (n-hexano). Hervido del polvo desgrasado en agua 120 min	Dispersión en agua destilada y partición con n-butanol con precipitación con dietil éter y secado	Parcialmente purificado	0.48	> 40	Triterpenoide	(38)
Torta de semilla de Carmellia oleifera	Extracion acuosa 80°C por 2 horas	precipitación con etanol y liofilización	65%	0.15	36	Triterpenoide	(39)
Raiz de Glycyrrhiza glabra	Extracion por reflujo con etanol acuoso	Cromatografía en coluna de silica y evaporación.	80%	0.09	34	Triterpenoide	(40)
Corteza de Quillaja Saponaria	Extracion con agua caliente y secado por aspersión	Extracto comercial grado alimentario purificado	15 % active	0.026	43.50	Triterpenoide	(26)
Quillaja Saponaria	Extracion acuosa y Concetracion por membrana	Precipitación con etanol y secado	20 %	0.03	42	Triterpenoide	(30)
Saponina S 0019 (TCI)	Estándar comercial	_	≥90 %	0.43	39.10	Triterpenoide	(26)
Q-Naturale 200 V (Ingredion)	Extracto comercial de Quillaja Saponaria	Secado por aspersión y estandarizado	15 %	0.026	43.50	Triterpenoide	(26)
Tween 60 (T60)	Surfactante sintético	-	≥99 %	0.027	40.24	Surfactante sintético no iónico	(35)
Cascara de Chenopodium quinoa	Maceración convencional en etanol acuosa	Partición liquido -liquido con n-butanol y evaporación	Parcialmente purificado	0.35	39	Triterpenoide	(41)

Nota. Elaboración propia.

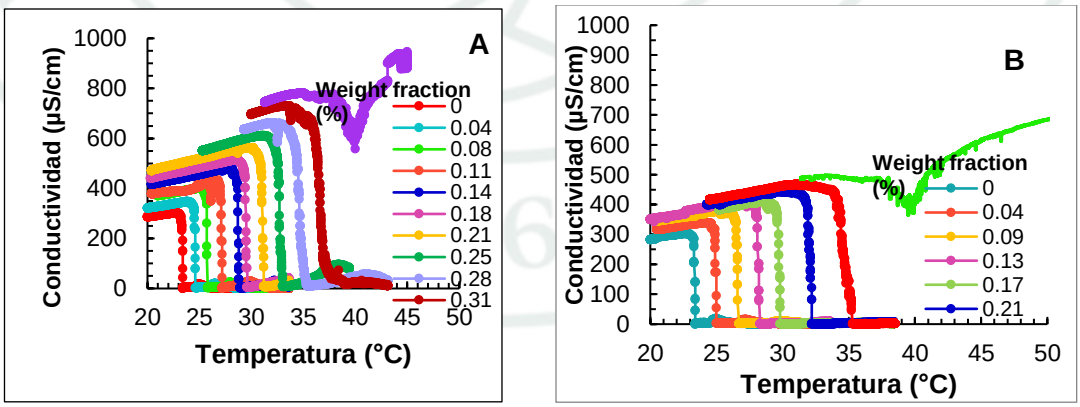
Es importante mencionar que según varios estudios indican que los surfactantes de origen natural que tengan menor CMC alcanzan la saturación interfacial más rápido y reduce la tensión superficial a concentraciones más bajas lo que indica una mayor eficiencia tensoactiva, lo cual es de interés para el actual estudio ya que en aplicaciones de biorremediación esta propiedad ayuda a la biodisponibilidad de hidrocarburos hidrofóbicos y facilita su degradación microbiana (42) (43) (44). Por lo cual en este ensayo se usó la CMC de cada saponina para el experimento.

1.1.2. Comportamiento anfifilico en surfactantes

1.1.2.1.PIT-Slope (Phase Inversion Temperature).

El análisis del comportamiento anfifílico de los surfactantes se evaluó mediante la determinación de la pendiente de inversión de fase térmica (PIT-slope, Phase Inversion Temperature). Este método permite comparar el grado de hidrofobicidad o hidrofilicidad de surfactantes no iónicos y biosurfactantes, como las saponinas, mediante el análisis de la estabilidad de las emulsiones frente a cambios de temperatura. El PIT corresponde a la temperatura específica en la cual una emulsión invierte su fase, pasando de aceite en agua (O/W) a agua en aceite (W/O). Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 5**.

Figura 5. Perfil de conductividad Vs temperatura en saponinas de 40 % y 60 %.



Nota. Elaboración propia.

En la **Figura 5A** (saponina al 40 %) y **Figura 5B** (saponina al 60 %) se muestra la relación entre la conductividad y la temperatura a diferentes concentraciones en peso de saponina. En ambos casos se observa una caída pronunciada de la conductividad, fenómeno característico de la temperatura de inversión de fase (PIT). Esta disminución abrupta es típica de surfactantes no iónicos y está asociada con la transición de emulsiones O/W hacia emulsiones W/O, proceso que ocurre debido a la deshidratación progresiva de los grupos polares del surfactante al incrementarse la temperatura.

Asimismo, se observa que el PIT aumenta a medida que se incrementa la concentración de saponina en el sistema. Al comparar los perfiles de conductividad en la región correspondiente a emulsiones O/W a temperatura constante, se aprecia que la adición de saponinas incrementa la conductividad de la fase acuosa, comportamiento reportado previamente para sistemas emulsificados que contienen biosurfactantes vegetales (45) (46) (47) (48).

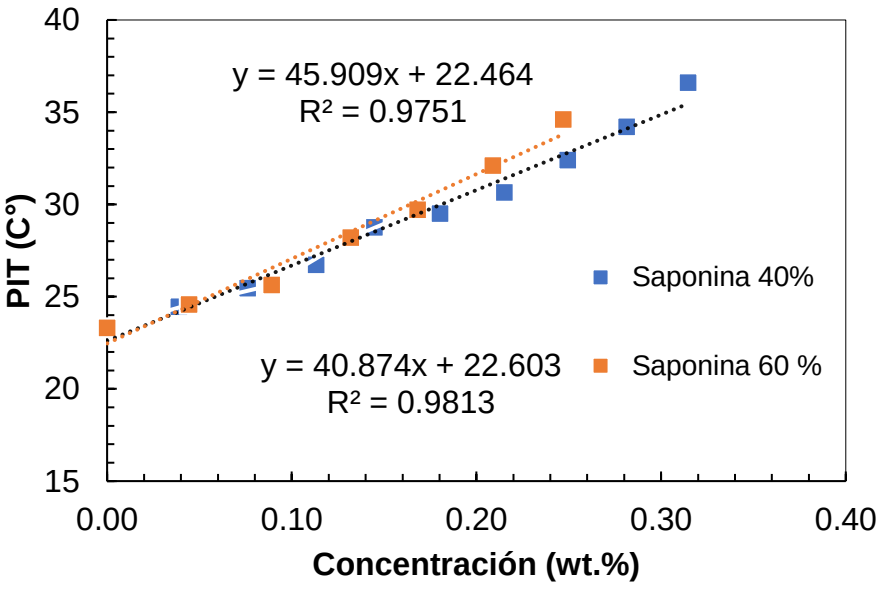
Este resultado sugiere la posible presencia de compuestos iónicos, tales como sales o ácidos orgánicos, en los extractos de saponinas, cuya concentración puede variar dependiendo del grado de pureza del extracto. En este sentido, la saponina con mayor pureza (60 %) presentó la inversión de fase a una temperatura ligeramente menor en comparación con la saponina al 40 %. Este comportamiento podría atribuirse a la menor presencia de compuestos acompañantes capaces de modificar el equilibrio interfacial del sistema, más que a un cambio intrínseco en la hidrofilicidad de la molécula de saponina.

La evolución del PIT a diferentes concentraciones de saponina se muestra en la **Figura 6**. En ambos extractos, tanto para la saponina al 40 % como para la saponina al 60 %, se requiere una temperatura superior a la del surfactante de referencia C10E4 para inducir la inversión del sistema W/O a O/W. Este comportamiento indica que las saponinas derivadas de residuos de quinua presentan un carácter más hidrofílico que el surfactante C10E4, resultado que coincide con lo reportado (26), quienes también utilizaron este compuesto como referencia en estudios de comportamiento interfacial (26).

En la **Figura 6** también se presentan las ecuaciones lineales obtenidas para cada sistema. El extracto de saponina al 60 % mostró una pendiente ligeramente mayor, lo que indica una mayor sensibilidad del sistema frente al incremento de temperatura. Este comportamiento es consistente con lo observado en surfactantes no iónicos de origen natural, donde el aumento de temperatura promueve la deshidratación progresiva de los grupos polares, modificando el balance hidrofílico-lipofílico efectivo del sistema (26) (49).

Las pendientes obtenidas para ambos extractos resultaron muy próximas entre sí, lo que sugiere que el mecanismo dominante de hidratación y deshidratación de los grupos glucosídicos frente al incremento de temperatura es similar en ambos casos. Esto indica que el comportamiento interfacial está principalmente gobernado por la estructura intrínseca de la molécula de la saponina. No obstante, el mayor grado de pureza podría modular ligeramente el balance hidrofílico-lipofílico efectivo del sistema, favoreciendo un carácter marginalmente más hidrofóbico en el extracto al 60 % (49) (50).

Figura 6. Evolución del PIT a diversas concentraciones de saponinas.



Nota. Elaboración propia.

En la **Tabla 4** se presenta una comparación de las propiedades interfaciales de diferentes saponinas naturales y surfactantes en sistemas equivalentes. Se observa que las saponinas de quinua presentan valores de CMC

relativamente mayores (0.22–0.75 g/L) en comparación con saponinas purificadas provenientes de Furcraea foetida o productos comerciales como Q-Naturale 200 V. Este comportamiento es consistente con la naturaleza multicomponente de los extractos de quinua y su menor grado de pureza relativa. En sistemas que contienen surfactantes naturales, la presencia de fracciones no tensioactivas y la distribución estructural de las saponinas triterpénicas tienden a incrementar la concentración requerida para alcanzar la micelización (26) (35).

Tabla 4. Tabla de comparación de surfactantes naturales y comerciales.

Surfactante	**CMC (g/L)**	**γCMC (mN/m)**	**Γmax·1010 (mol/cm2)**	**a_1^s (Å2)**	**PIT-slope (◦C/wt%)**	**Referencia**
Saponina de Quinua al 40 %	0.75	36.70	2.41 ± 0.10	69 ± 3	40.9 ± 2.0	Este estudio
Saponina de Quinua al 60 %	0.22	38.20	2.96 ± 0.12	56 ± 2	45.9 ± 2.5	Este estudio
Saponina de Furcracea Foetida	0.24	49.20	2.2 ± 0.1	75 ± 4	10.2 ± 0.8	(26)
Saponina S0019 (TCI)	0.43	39.10	2.2 ± 0.1	77 ± 4	9.5 ± 0.2	(26)
Saponina Q-naturale 200 V	0.026	43.50	3.9 ± 0.4	43 ± 5	18 ± 1	(27)
Grano crudo de Azafrán (SS) – 84% purity	2.73	48.71	-	-	-	(35)
Tween 60 (T60)	0.027	40.24	-	-	-	(35)
Extracto acuoso de jaboncillo rico en saponinas	1	44.33	1.94	85.6	-	(36)

Nota. Elaboración propia.

A pesar de presentar valores de CMC más elevados, las saponinas de quinua muestran valores de tensión superficial en la CMC comparables a los reportados para surfactantes comerciales y biosurfactantes vegetales. Los valores de γCMC obtenidos en este estudio (36.7–38.2 mN/m) se encuentran dentro del rango típicamente reportado para saponinas vegetales y surfactantes no iónicos naturales (26). Asimismo, en la **Tabla 4** se presentan los valores de adsorción interfacial máxima (Γmax). Las saponinas de quinua mostraron valores entre 2.41 y 2.96 $\times 10^{-10}$ mol/cm², muy cercanos a los reportados para saponinas de Furcraea foetida (2.2

$\times 10^{-10}$ mol/cm²), lo que sugiere una adsorción eficiente en la interfase aceite-agua. De manera similar, el área ocupada por molécula fue menor en el extracto de saponina al 60 % (56 Å²) en comparación con el extracto al 40 % (69 Å²), lo que indica un empaquetamiento interfacial más compacto asociado al mayor grado de pureza del surfactante (26).

Los valores de PIT reportados en la **Tabla 4** también permiten observar que las saponinas de quinua presentan pendientes de PIT superiores a las reportadas para otras saponinas vegetales. Por ejemplo, los valores obtenidos para las saponinas de quinua (40.9–45.9 °C·wt^{-1}) son considerablemente mayores que los reportados para Furcraea foetida (10.2 ± 0.8 °C·wt^{-1}) y para saponinas comerciales de Quillaja. Este mayor PIT sugiere un carácter hidrofílico efectivo más pronunciado y una mayor estabilidad del estado emulsificados O/W frente al incremento de temperatura. Esta diferencia podría atribuirse principalmente a la naturaleza multicomponente de las saponinas de quinua, cuya mayor heterogeneidad molecular incrementa la sensibilidad del equilibrio hidrofílico-lipofílico frente a variaciones en la concentración del surfactante (26).

En conjunto, estos resultados indican que, aunque las saponinas de quinua requieren concentraciones ligeramente mayores para alcanzar la CMC, presentan una capacidad de adsorción interfacial y una respuesta térmica comparables o incluso superiores a las saponinas purificadas. Esto sugiere que los extractos de saponinas de quinua pueden comportarse como surfactantes naturales eficaces en sistemas emulsificados, particularmente en aplicaciones donde una transición hidrofílica-lipofílica sensible a la concentración es deseable, como en procesos de solubilización o biorremediación de hidrocarburos (35) (51).

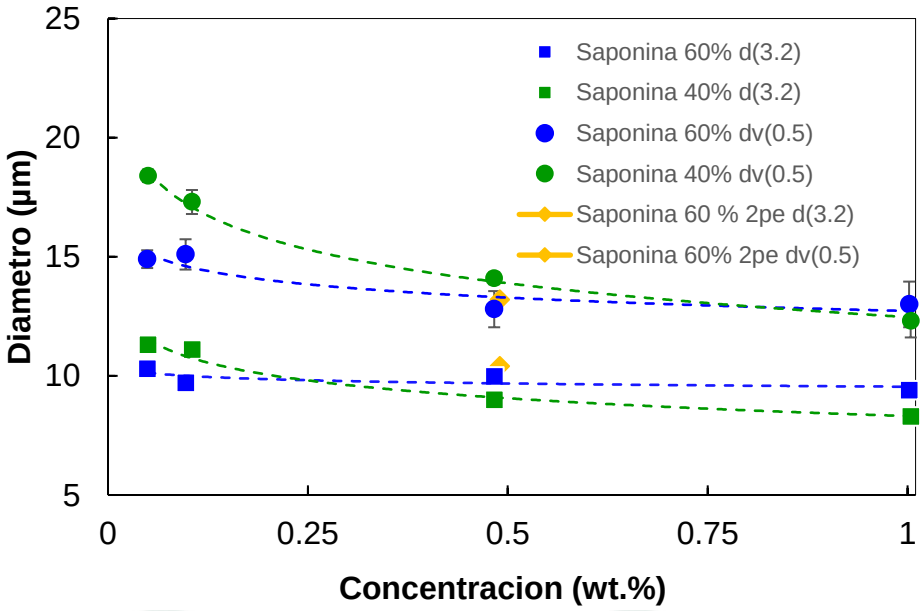
1.1.3. Propiedades emulsionantes.

Las propiedades emulsionantes de los extractos de saponina también fueron evaluadas mediante la formación de emulsiones a diferentes concentraciones de surfactante. Las emulsiones se prepararon mediante agitación intensa y posteriormente se adicionó 2-fenoxietanol como conservante para garantizar

su estabilidad durante el almacenamiento. La variación del diámetro promedio de gota en función de la concentración de saponina se presenta en la **Figura 7**, donde se comparan los extractos de saponina de 40 % y 60 % de pureza en presencia y ausencia de 2-fenoxietanol.

Los resultados muestran que la adición del conservante no produce cambios significativos en el tamaño de gota de las emulsiones. Sin embargo, se observa una tendencia decreciente en el diámetro de gota a medida que aumenta la concentración de saponina. Este comportamiento confirma la actividad superficial del biosurfactante, ya que concentraciones mayores de surfactante favorecen la adsorción en la interfase aceite-agua, reduciendo la tensión interfacial y permitiendo la formación de gotas más pequeñas y estables. Este comportamiento ha sido ampliamente reportado en estudios de emulsificación con surfactantes tanto sintéticos como naturales (52).

Figura 7. Promedio de diámetro de gotas de emulsión en diferente Concentración de saponinas



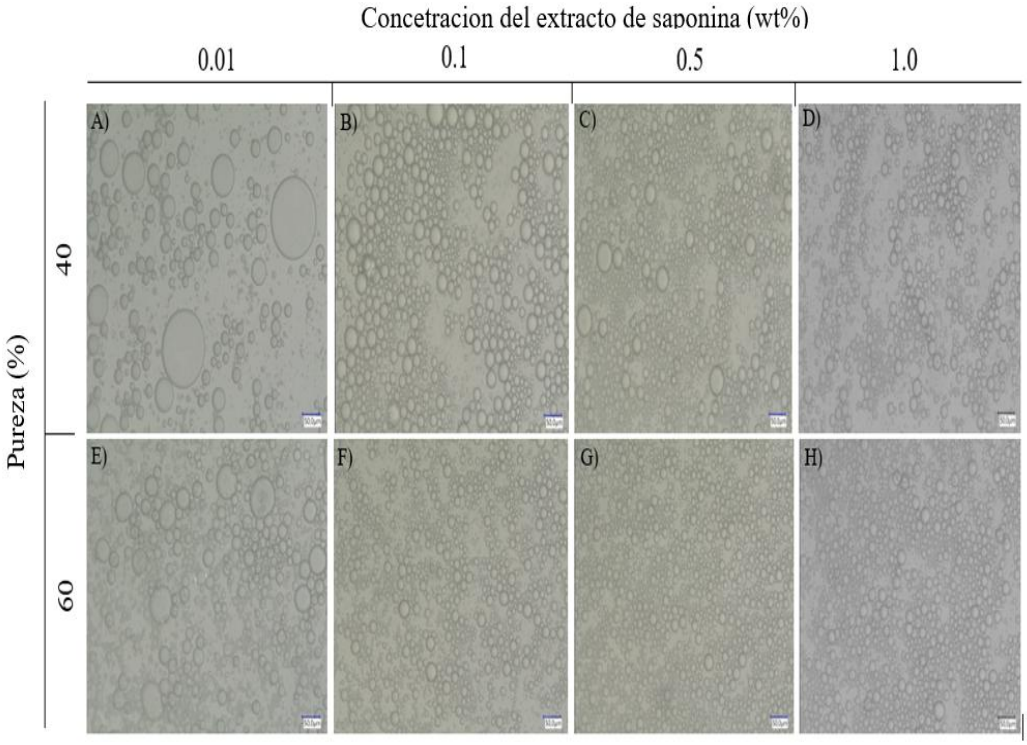
Nota. Elaboración propia.

La microestructura de los sistemas emulsificados se muestra en la **Figura 8**, donde se presentan imágenes microscópicas de emulsiones preparadas con extractos de saponina de quinua en concentraciones entre 0.01 y 1 % en peso, utilizando extractos con pureza de 40 % (A, B, C) y 60 % (D, E, F) en

un sistema aceite-agua 1:1. En estos sistemas se empleó agua ultrapura y miristato de isopropilo como fase oleosa, además de NaCl (0.01 M) para ajustar la fuerza iónica del medio.

Al comparar ambos extractos se observa que las emulsiones preparadas con saponina al 40 % presentan tamaños de gota ligeramente menores que las obtenidas con la saponina al 60 %. Este resultado sugiere que la eficiencia emulsificante no depende únicamente de la concentración de saponina, sino también de la composición química del extracto. En sistemas que contienen extractos parcialmente purificados, la presencia de compuestos coextraidos puede modificar la adsorción interfacial de las saponinas y alterar el proceso de estabilización de las emulsiones (53) (28).

Figura 8. Observación microestructural de sistemas de emulsión formados con extractos de saponinas de residuos de Chenopodium quinua en concentraciones A) Saponina 40 % 0.01 wt % B) Saponina 40 % 0.05 wt % C) Saponina 40 % 1 wt % D) Saponina 60 % 0.01 wt % E) Saponina 40 % 0.05 wt % F) Saponina 60 % 1 wt %



Nota. Elaboración propia.

Las saponinas de quinua mostraron un comportamiento comparable al reportado para biosurfactantes microbianos. En sistemas estabilizados por ramnolípidos, por ejemplo, se ha observado que al aproximarse a la CMC el tamaño de gota disminuye significativamente, pasando de diámetros de 20–50 µm a valores cercanos a 2–10 µm, seguido de una meseta cuando la interfase se encuentra saturada (52). Un comportamiento similar ha sido reportado para surfactina, la cual presenta CMC entre 10 y 30 mg/L y produce reducciones en el tamaño de gota hasta valores cercanos a 1–5 µm antes de alcanzar una fase de saturación interfacial (54) (55).

A diferencia de los surfactantes sintéticos como Tween 80 o SDS, las saponinas suelen generar emulsiones con distribuciones de tamaño de gota más amplias y diámetros promedio mayores. Por ejemplo, Tween 80 puede producir emulsiones con tamaños de gota entre 1 y 5 µm bajo condiciones de alta energía, debido a su estructura molecular bien definida y bajo peso molecular (56). De manera similar, el SDS permite formar emulsiones con diámetros de gota inferiores a 10 µm. En contraste, las saponinas presentan una naturaleza multicomponente y estructuras moleculares heterogéneas, lo que favorece la formación de agregados interfaciales menos uniformes y sistemas coloidales más complejos (53).

1.1.4. Estabilidad de Espuma.

Se evaluaron las capacidades de formación de espuma y estabilización de las saponinas de residuos de quinua en diferentes niveles de pureza a una concentración correspondiente al doble de su concentración micelar crítica (2CMC). La Figura 7 presenta la evolución temporal de la altura total de la espuma, la altura de la espuma y la altura del líquido para extractos de saponina de quinua al 40% y 60% de pureza. Ambas muestras exhibieron una capacidad de espuma comparable, alcanzando alturas máximas de espuma similares inmediatamente después de la generación. A pesar de esta similitud en la

formación inicial de espuma, se observaron marcadas diferencias durante el envejecimiento.

La espuma estabilizada con saponina de pureza del 60% mostró un drenaje de líquido más lento (curva roja) y una mayor retención de la altura de la espuma a lo largo del tiempo (curva verde), lo que indica la formación de películas interfaciales más cohesivas y elásticas. Por el contrario, la espuma producida con el extracto con una pureza del 40% mostró una disminución progresiva en la altura de la espuma, asociada con una mayor coalescencia y colapso, consistente con su temperatura de inversión de fase (PIT) más baja y su estabilidad interfacial reducida.

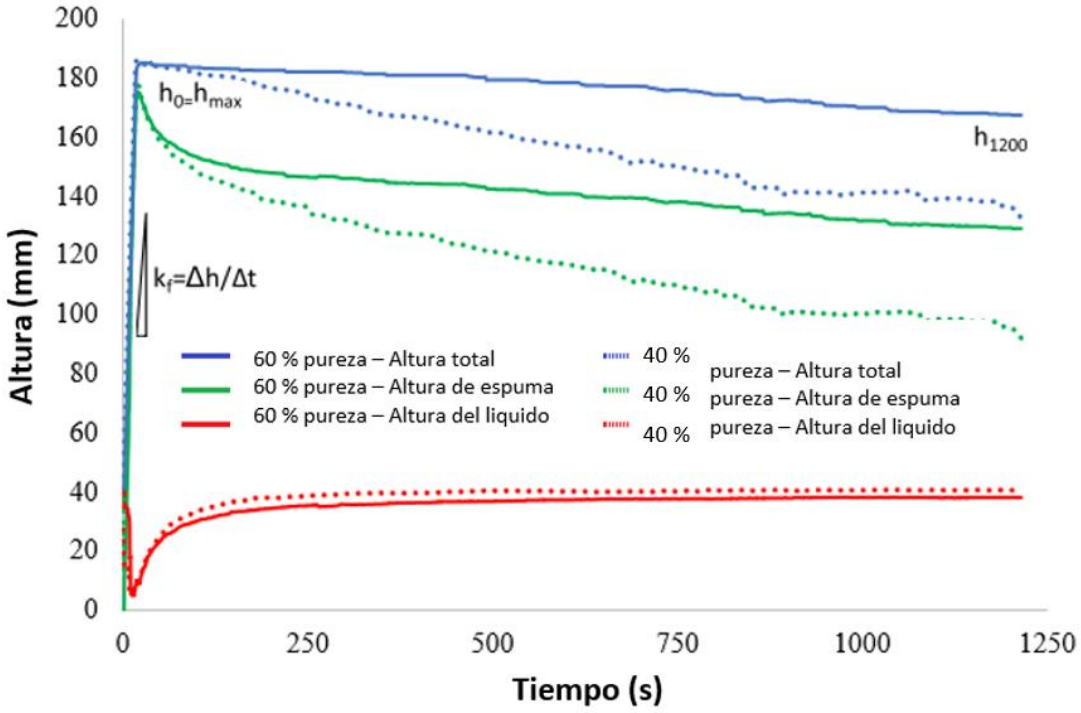
En cuanto a la estabilidad de la espuma, el 83,36% y el 76,32% del volumen inicial de espuma se retuvieron después de 300 y 1200 s, respectivamente. Estos valores son comparables (26) para saponinas de Furcraea foetida evaluadas a 2CMC (0,048% en peso), donde aproximadamente el 85% de la espuma inicial permaneció después de 1200 s, así como al 80% de estabilidad reportada para lauril sulfato de sodio (SLS) - Texapon N70 (0,054% en peso).

Cabe destacar que estas mediciones se realizaron en el mismo laboratorio y utilizando el mismo instrumento analítico, lo que respalda la validez de la comparación. Estos resultados indican que las saponinas de quinua de mayor pureza tienen un gran potencial como agentes espumantes naturales de base biológica para su incorporación en formulaciones de champús, detergentes naturales y aplicaciones relacionadas.

Asimismo, la estabilidad de espuma es un parámetro importante debido que los surfactantes de origen natural como las saponinas pueden reducir la tensión interfacial entre el agua y el petróleo favoreciendo la movilización y dispersión de compuestos hidrofóbicos en suelos contaminados, lo cual logra una mayor estabilidad de espuma haciendo que incremente el contacto entre el surfactante y el hidrocarburo mejorando los procesos de solubilización y remoción de petróleo, (52) (57) diversos estudios han reportado que los surfactantes naturales reducen efectivamente la tensión interfacial aceite-agua y mejora la

movilización, facilitando su recuperación o remediación en suelos contaminados.

Figura 9. Perfil de espumación, altura (mm) vs. tiempo (s) para extracto de saponina de Chenopodium quinoa con 40 y 60% de pureza a 2CMC.



Nota. Elaboración propia.

1.2. Potencial de la saponina en la movilización y biodegradación de hidrocarburos en suelo contaminado.

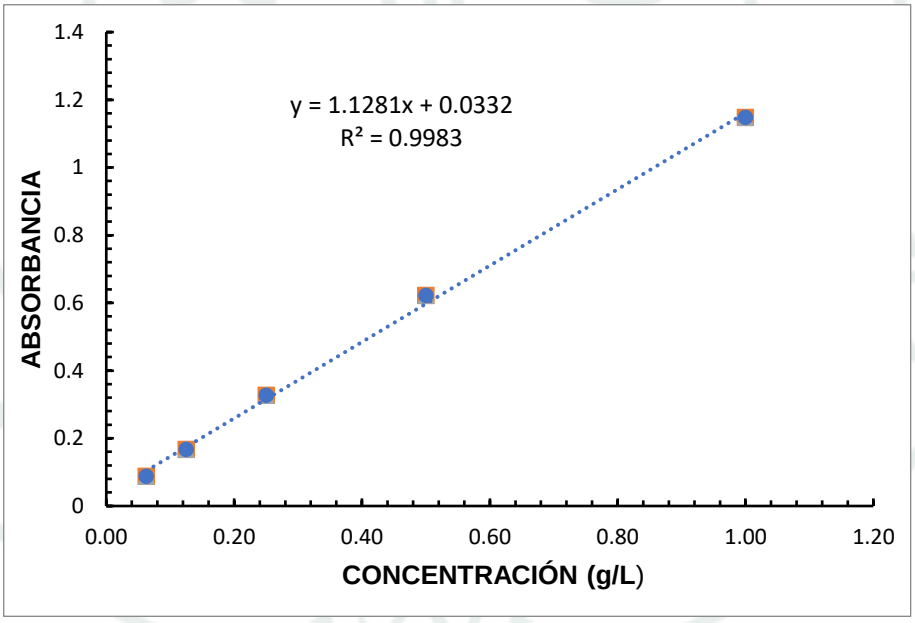
1.2.1. Curva de calibración para la cuantificación de petróleo

Para cuantificar la concentración de petróleo se construyó una curva de calibración utilizando petróleo comercial y se determinó la densidad exacta del petróleo empleado en el estudio, la cual fue 0.894 g/cm³. Se empleó hexano como solvente de extracción y blanco analítico debido a su baja polaridad, alta selectividad hacia hidrocarburos, mínima interferencia espectral y baja absorbancia a 250 nm. Estas características reducen el ruido instrumental durante la lectura espectrofotométrica y mejoran la sensibilidad del método. Este enfoque es consistente con metodologías reportadas para la determinación de hidrocarburos totales de petróleo

mediante espectrofotometría UV-Vis, donde se recomienda el uso de solventes no polares con baja interferencia espectral (58).

En la **Figura 10** se muestra la relación entre absorbancia y dilución, junto con la ecuación de la recta utilizada para la cuantificación. La medición espectrofotométrica se realizó en el rango de 200–400 nm, seleccionándose 250 nm como longitud de onda de trabajo debido a que en esta región se registran transiciones electrónicas características de compuestos aromáticos mono- y policíclicos. Estas fracciones son representativas de la contaminación por petróleo y suelen presentar máximos de absorción entre 220 y 280 nm, por lo que el uso de longitudes cercanas a 254–250 nm es común en cuantificación de hidrocarburos en extractos orgánicos (59) (58). Para hallar la curva de calibración se usaron las ecuaciones 3 y 4 que se detalla en **Anexo 4.**

Figura 10. Curva de calibración para la cuantificación espectrofotométrica de petróleo comercial (absorbancia vs dilución) a 250 nm



Nota. Elaboración propia.

1.2.2. Remoción de petróleo de la tierra contaminada y análisis del estado de contaminación del agua usada.

La dinámica de remoción del hidrocarburo fue evaluada diferenciando el comportamiento en la fase acuosa y en la fase sólida, así como el promedio entre

ambos medios, bajo los distintos tratamientos con surfactantes. El experimento se desarrolló durante 21 días, con evaluaciones cada 7 días desde el día 0, lo que permitió analizar la evolución temporal de la transferencia y disminución del petróleo en el sistema.

Los resultados fueron analizados mediante un ANOVA multifactorial para la concentración de petróleo, considerando como factores el medio de remoción (suelo y agua), el tratamiento aplicado (saponinas a diferentes concentraciones y controles) y el tiempo de evaluación (días). La interpretación del modelo se basó principalmente en el F-test y en los valores de p asociados a la suma de cuadrados tipo III; valores de p menores a 0.05 indican diferencias estadísticamente significativas al 95 % de confianza. Esta base de datos se detalla en el **Anexo 1**. Los resultados del análisis se presentan en la **Tabla 5**, donde se observa que todos los factores principales y sus interacciones resultaron significativos ($p < 0.05$). Además, el cuadrado medio residual fue bajo (0.0197094), lo que sugiere un ajuste adecuado del modelo F-test y una explicación robusta de la variabilidad observada.

Tabla 5. Resultados del ANOVA multifactorial para la concentración de petróleo considerando medio de remoción (suelo/agua), tratamientos y tiempo.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	p-valor
Remoción del suelo vs contaminación de agua)	8.57285	1	8.57285	434.96	0.0000
Días	1.48366	3	0.494553	25.09	0.0000
Tratamientos	0.851816	4	0.212954	10.80	0.0000
Remoción × Días	0.778173	3	0.259391	13.16	0.0000
Remoción × Tratamientos	0.459882	4	0.11497	5.83	0.0003
Días × Tratamientos	0.638144	12	0.0531787	2.70	0.0037
Residual	1.81326	92	0.0197094	—	—
Total (corregido)	14.5978	119	—	—	—

Nota. Elaboración propia y Statgraphics XVII – X64.

La evolución temporal del petróleo en suelo y agua se muestra en la **Figura 11**. En la fase acuosa se observa un incremento de la concentración entre el día 0 y

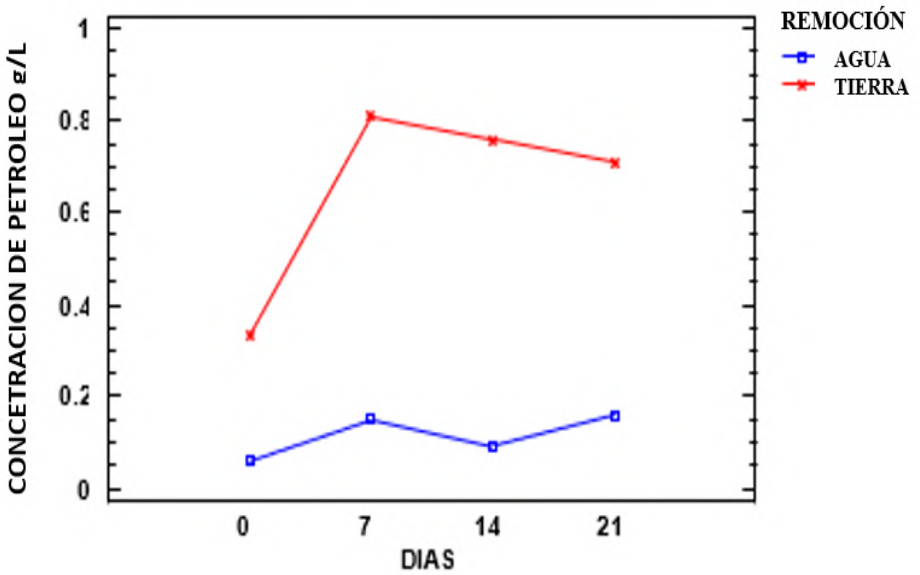
el día 7. Este aumento se explica por la naturaleza anfifílica de las saponinas, que reduce rápidamente la tensión superficial e interfacial y favorece la desorción del petróleo previamente adsorbido en el suelo, promoviendo su transferencia hacia el agua; un patrón similar ha sido reportado en sistemas de biorremediación asistida por biosurfactantes (60). Posteriormente, en el día 14 se registra una disminución de la concentración en el agua, lo cual sugiere la transición hacia un régimen donde predominan procesos biológicos. En esta etapa, el aumento de biodisponibilidad facilita la activación del microbiota degradadora nativa, induciendo la disminución de hidrocarburos totales (15). Durante este periodo se degradan principalmente fracciones alifáticas ligeras y medianas, mientras que las saponinas continúan estabilizando emulsiones que mantienen al contaminante parcialmente disponible en el sistema (57) (52). En el día 21 se observa un ligero incremento en el agua, el cual puede asociarse a la movilización tardía de fracciones inicialmente fuertemente adsorbidas al suelo y/o a la formación de productos intermedios más solubles derivados de la biodegradación parcial de compuestos de mayor peso molecular, los cuales pueden acumularse temporalmente en la fase acuosa.

En el caso del suelo (fase sólida), que constituye el objetivo principal del proceso de biorremediación, la **Figura 11** muestra que en el día 0 se registra la contaminación inicial antes de que el tratamiento ejerza un efecto significativo. En esta etapa el petróleo se encuentra predominantemente retenido en la matriz del suelo, especialmente asociado a partículas finas y materia orgánica, lo que limita su movilidad y biodisponibilidad; por tanto, esta concentración inicial sirve como línea base para evaluar la eficiencia del proceso (57) (52).

Es importante señalar que la **Figura 11** representa el promedio global de tratamientos, controles y blanco, tanto en suelo como en agua, por lo que posteriormente se analizó el comportamiento por tratamiento para establecer comparaciones específicas. Entre el día 0 y el día 7 se observa un incremento de la concentración en suelo, lo cual puede parecer contradictorio, pero ha sido descrito en procesos de biorremediación asistida por biosurfactantes. Este efecto se atribuye a la desorción y redistribución interna del contaminante inducida por la acción tensioactiva, que permite que fracciones previamente no detectadas o pobremente extraíbles pasen a ser cuantificadas (52) (57) (15). En los días 14 y

21 se evidencia una disminución progresiva de petróleo en suelo, indicando el ingreso a una fase predominantemente biológica donde la biodegradación supera la movilización del contaminante. En esta etapa se asume que la comunidad microbiana se encuentra adaptada al hidrocarburo como fuente de carbono, incrementando la eficiencia del consumo del contaminante (61) (15). La reducción continúa hacia el día 21, aunque a una tasa más lenta, lo que es consistente con la persistencia de fracciones recalcitrantes, particularmente hidrocarburos aromáticos de mayor peso molecular (52) (62).

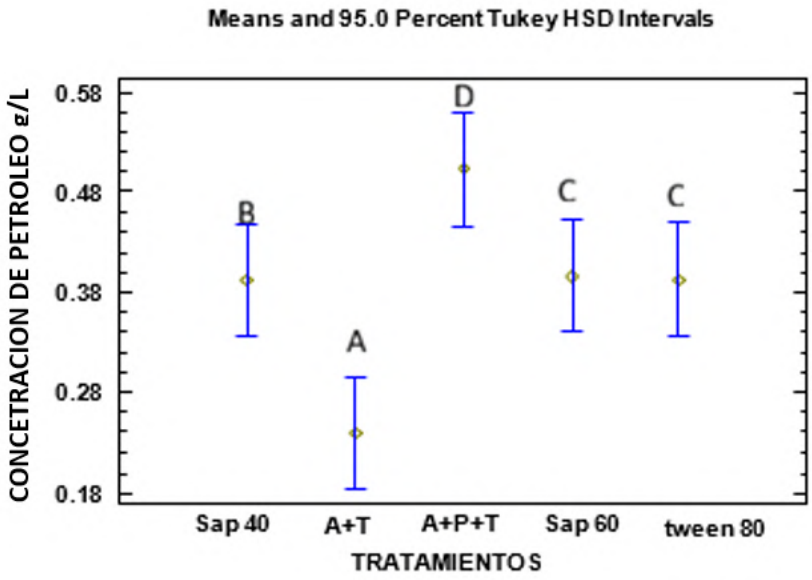
Figura 11. Concentración de petróleo en suelo y agua durante el proceso de remoción asistida por surfactantes.



Nota. Elaboración propia y Statgraphics XVII – X64.

La comparación global entre tratamientos se presenta en la **Figura 12**, donde se observa que los tratamientos con saponina al 60 % y Tween-80 presentan comportamientos estadísticamente similares, mientras que los controles se ubican en los extremos, reflejando los escenarios de mínima y máxima eficiencia del sistema.

Figura 12. Comparación global de la concentración de petróleo entre tratamientos y controles.



Nota. Elaboración propia y Statgraphics XVII – X64.

1.2.3. Análisis de remoción de petróleo para la tierra y agua sometida a los diferentes tratamientos con surfactantes.

Dado que el objetivo principal del estudio es la biorremediación del suelo contaminado, se realizó un análisis estadístico independiente considerando únicamente la concentración de petróleo en la fase sólida (tierra). Los resultados del ANOVA se presentan en la **Tabla 6**, donde se evidencia que tanto el tiempo como el tratamiento tienen efectos estadísticamente significativos sobre la concentración de petróleo en suelo. El factor días presentó un valor de $F = 21.81$ con $p < 0.0001$, lo que confirma que la evolución temporal del sistema es determinante para el desempeño del proceso, especialmente durante etapas tempranas donde ocurren fenómenos de desorción y solubilización inducidos por surfactantes naturales (34) (15). De manera similar, el factor tratamiento también fue significativo, evidenciando que el tipo de surfactante aplicado influye directamente en la respuesta del sistema, lo cual concuerda con reportes que destacan el rol de la composición química, concentración y capacidad de reducción de tensión superficial en la eficiencia de remoción (57) (61). La interacción días × tratamiento también fue

significativa, lo que indica que el efecto de cada tratamiento depende del tiempo de exposición y de la progresión de procesos fisicoquímicos y biológicos dentro del suelo, tal como ha sido descrito para biosurfactantes en sistemas de remediación (34) (61).

Tabla 6. Resultados del ANOVA para la concentración de petróleo en suelo en función del tiempo y el tratamiento aplicado.

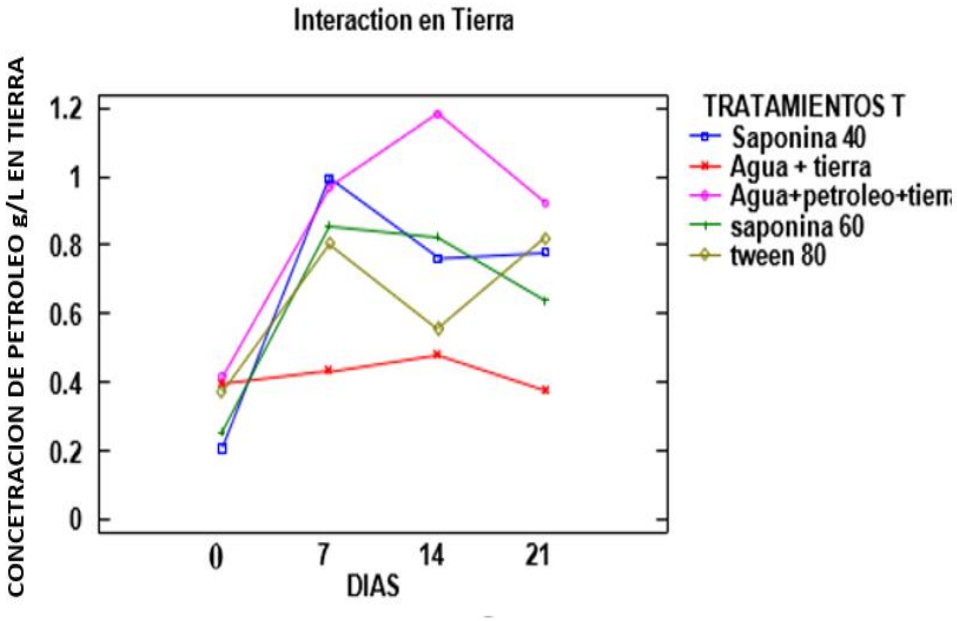
Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	p-valor
Días	2.1563	3	0.718768	21.81	0.0000
Tratamientos	1.2386	4	0.309651	9.39	0.0000
Días × Tratamientos	0.920229	12	0.0766857	2.33	0.0228
Residual	1.31851	40	0.0329628	—	—
Total (corregido)	5.63365	59	—	—	—

Nota. Elaboración propia y Statgraphics XVII – X64.

La interacción entre tratamientos y tiempo en suelo se muestra en la **Figura 13**. En el día 0 se registran las concentraciones iniciales para cada sistema. El blanco (suelo sin contaminación) mantiene un comportamiento estable y cercano a valores mínimos durante todo el periodo, mientras que el control contaminado sin tratamiento muestra una tendencia general al incremento, con una disminución recién hacia el día 21.

Los tratamientos con saponina al 40 % y Tween-80 presentan una dinámica similar, caracterizada por un incremento inicial seguido de una disminución progresiva, mientras que la saponina al 60 % muestra un comportamiento más cercano al control contaminado, aunque a diferentes niveles de concentración.

Figura 13. Interacción entre tratamientos y tiempo en la concentración de petróleo en suelo contaminado.



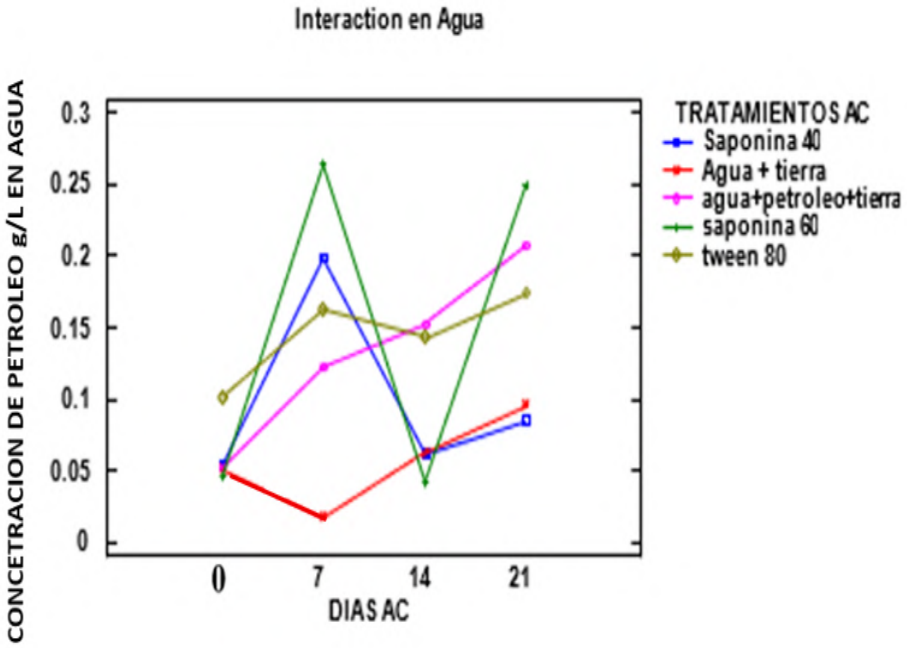
Nota. Elaboración propia y Statgraphics XVII – X64.

Este patrón se explica por la naturaleza anfifílica de la saponina, que favorece la formación de micelas y la movilización de hidrocarburos, facilitando la desorción del contaminante desde la matriz del suelo; por ello los tratamientos se aplicaron considerando concentraciones cercanas a la CMC (63) (15). El incremento inicial entre el día 0 y 7 seguido de una disminución ha sido reportado en estudios recientes, donde se atribuye a la movilización temprana del petróleo adsorbido inducida por la reducción de la tensión interfacial y la micelización (34) (15). A medida que avanza el proceso, los biosurfactantes pasan de promover principalmente movilización y emulsificación en etapas tempranas a facilitar biodegradación en etapas posteriores al incrementar la biodisponibilidad del contaminante para el microbiota del suelo (34) (61).

La interacción tiempo–tratamiento en la fase acuosa se muestra en la **Figura 14**. En los tratamientos con saponina (40 % y 60 %) y Tween-80 se observa un incremento entre el día 0 y 7, seguido de una reducción hacia el día 14 y un nuevo incremento hacia el día 21. Aunque este comportamiento podría interpretarse como recontaminación, es característico de la transferencia de hidrocarburos desde la fase sólida hacia la fase acuosa en sistemas asistidos por

surfactantes, donde la movilización y la degradación ocurren de manera simultánea y dinámica (8) (15).

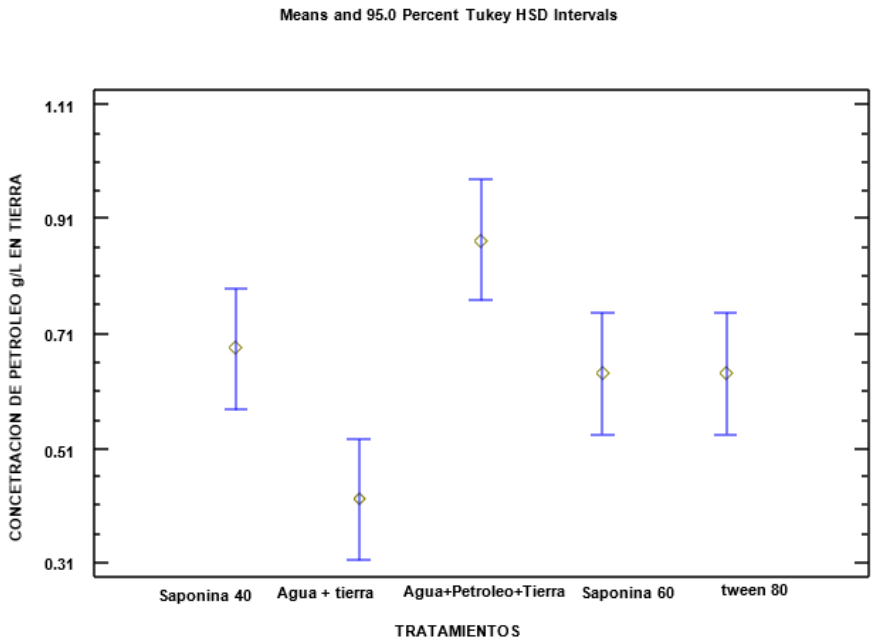
Figura 14. Interacción entre tratamientos y tiempo en la concentración de petróleo en la fase acuosa.



Nota. Elaboración propia y Statgraphics XVII – X64.

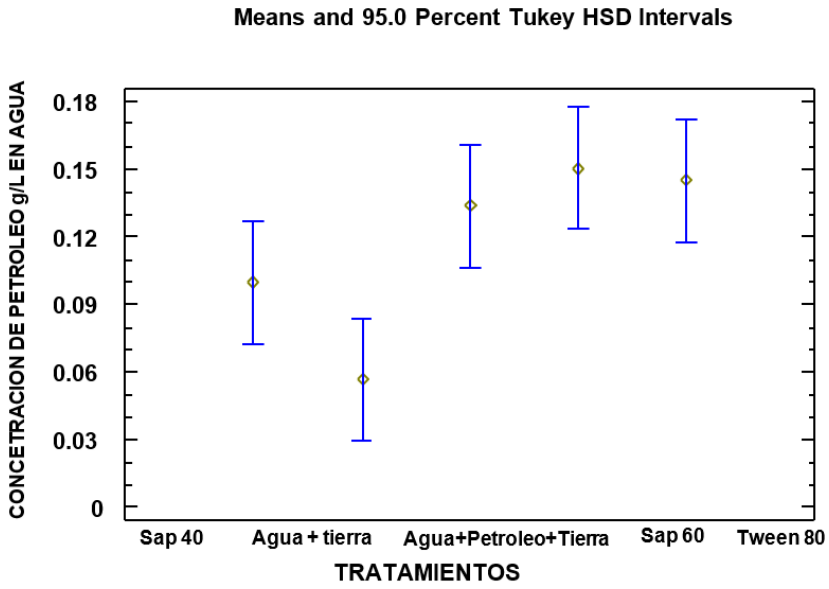
Finalmente, las comparaciones específicas por tratamiento se presentan en la **Figura 15** (suelo) y **Figura 16** (agua). En ambas se observa que la saponina al 40 % y el Tween-80 presentan tendencias similares, lo cual es un resultado relevante considerando que el Tween-80 es un surfactante sintético ampliamente utilizado como referencia en procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

Figura 15. Comparación entre tratamientos de la concentración de petróleo en suelo durante el proceso de remoción.



Nota. Elaboración propia y Statgraphics XVII – X64.

Figura 16. Comparación entre tratamientos de la concentración de petróleo en agua durante el proceso de remoción.



Nota. Elaboración propia y Statgraphics XVII – X64.

1.3. Evaluación del impacto ambiental del suelo contaminado mediante análisis microbiológico.

La actividad microbiana del suelo fue evaluada como un indicador indirecto del impacto ambiental generado por la contaminación con petróleo y por los tratamientos aplicados. Para ello se determinó el recuento de bacterias y hongos mediante cultivos en placa por triplicado en agar nutritivo para bacterias y agar PDA para hongos, siguiendo el procedimiento descrito en la norma ISO 4833-1:2013. El recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) se calculó utilizando la ecuación correspondiente descrita en el **Anexo 4.** Los resultados corresponden al promedio del recuento microbiano obtenido para cada tratamiento y control durante el experimento, incluyendo los tratamientos con saponina de quinua con pureza de 40 % y 60 %, el surfactante sintético Tween-80, el control contaminado sin surfactante (T+A+P) y el control sin contaminación por petróleo (T+A). Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Recuento microbiano de bacterias y hongos en suelo contaminado posterior al tratamiento con saponinas de quinua

Tratamiento de tierra	Bacterias (UFC/mL)		Hongos (UFC/mL)	
	Día 0	Día 21	Día 0	Día 21
Saponina 40 %	8.00×10^7	6.67×10^6	1.33×10^4	3.33×10^3
Saponina 60 %	8.00×10^7	0	1.33×10^4	0
Tween-80	8.00×10^7	2.33×10^7	1.33×10^4	6.67×10^3
Sin surfactante (T+A+P)	8.00×10^7	6.67×10^6	1.33×10^4	0
Suelo sin contaminación (T+A)	1.40×10^8	3.33×10^6	5.33×10^4	3.33×10^3

Nota. Elaboración propia

* **Nota:** Los valores corresponden al promedio del recuento de **unidades formadoras de colonias (UFC)** obtenidas por triplicado en agar nutritivo para bacterias y agar PDA para hongos, conforme al procedimiento descrito en la norma **ISO 4833-1:2013**.

En el día inicial se observó que el suelo sin contaminación por petróleo presentó el mayor recuento bacteriano, alcanzando 1.40×10^8 UFC, mientras que los tratamientos con suelo contaminado registraron valores cercanos a 8.00×10^7

UFC. Esta diferencia indica que la presencia de petróleo afecta negativamente la actividad microbiana del suelo desde las etapas iniciales del experimento. Este comportamiento ha sido reportado en la literatura, donde se describe que los hidrocarburos pueden alterar la integridad de las membranas celulares y afectar enzimas involucradas en el metabolismo microbiano, reduciendo así la capacidad de crecimiento de bacterias presentes en el suelo (64).

Luego de 21 días de incubación se observaron diferencias importantes entre tratamientos y controles. El tratamiento con Tween-80 presentó el mayor recuento bacteriano final (2.33×10^7 UFC), lo que sugiere que este surfactante favoreció la biodisponibilidad de los hidrocarburos y estimuló la actividad microbiana asociada a su degradación. El control contaminado sin surfactante (T+A+P) presentó un recuento final de 6.67×10^6 UFC, lo que indica que en ausencia de surfactantes la recuperación del microbiota del suelo es limitada debido a la baja disponibilidad de los compuestos hidrofóbicos presentes en el petróleo. El tratamiento con saponina al 40 % mostró un comportamiento similar al control contaminado, con un recuento final de 6.67×10^6 UFC, lo que sugiere que la estimulación microbiana fue moderada. En contraste, en el tratamiento con saponina al 60 % no se detectó crecimiento bacteriano al final del experimento, lo que podría indicar un posible efecto inhibitorio asociado a concentraciones más elevadas del biosurfactante, incluyendo saponinas, pueden presentar actividad antimicrobiana dependiendo de su concentración y de la sensibilidad de las comunidades microbianas del suelo (32) (65). Por otro lado, el suelo sin contaminación por petróleo (control T+A) mostró una disminución del recuento bacteriano hasta 3.33×10^6 UFC al final del experimento. Este descenso puede explicarse por el agotamiento progresivo de nutrientes disponibles o por la estabilización natural de la comunidad microbiana en ausencia de hidrocarburos como fuente adicional de carbono.

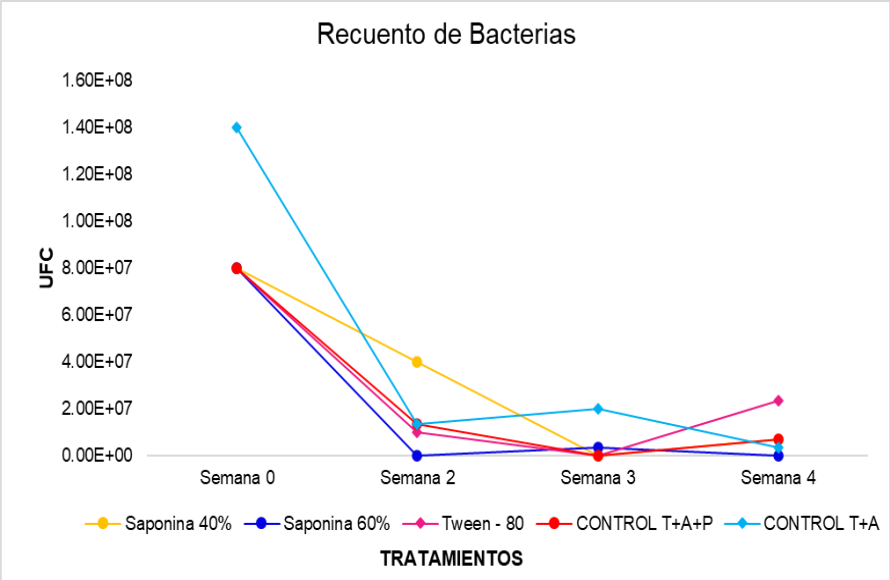
En el caso del recuento fúngico se observó un comportamiento similar en el día inicial. El suelo sin contaminación presentó el mayor recuento (5.33×10^4 UFC), mientras que los tratamientos con suelo contaminado registraron valores de aproximadamente 1.33×10^4 UFC. Esta diferencia evidencia nuevamente el impacto inicial del petróleo sobre el microbiota del suelo. Los hongos del suelo

suelen ser sensibles a la presencia de hidrocarburos en las etapas iniciales debido a los efectos tóxicos de ciertas fracciones del petróleo.

Al día 21 se observaron diferencias entre tratamientos. El tratamiento con Tween-80 presentó el mayor recuento fúngico detectable (6.67×10^3 UFC), seguido por el tratamiento con saponina al 40 % (3.33×10^3 UFC). En contraste, en el tratamiento con saponina al 60 % y en el control contaminado sin surfactante (T+A+P) no se detectó crecimiento fúngico al final del experimento. La reducción o desaparición del crecimiento fúngico puede explicarse por diversos factores, como el agotamiento de fracciones biodisponibles del petróleo, efectos acumulativos de toxicidad asociados a los surfactantes o metabolitos generados durante el proceso de degradación, o competencia microbiana dentro de la comunidad del suelo. En el suelo sin contaminación (T+A) también se observó una disminución del recuento fúngico hacia el final del experimento, alcanzando 3.33×10^3 UFC, lo cual puede relacionarse con la reducción de nutrientes disponibles o con la dinámica natural del microbiota del suelo. Estudios comparativos han señalado que, aunque los surfactantes pueden favorecer la degradación de hidrocarburos, concentraciones elevadas pueden comprometer la viabilidad de ciertos grupos microbianos, especialmente hongos (32) (65).

La evolución de los recuentos microbianos a lo largo del tiempo se muestra de manera gráfica en la **Figura 17** y la **Figura 18**, donde se observa la dinámica de bacterias y hongos durante el periodo experimental. En la **Figura 16** se muestra el comportamiento del recuento bacteriano en los diferentes tratamientos. En general, el tratamiento con Tween-80 presentó una mayor recuperación de la actividad bacteriana, mientras que los tratamientos con saponinas mostraron respuestas más moderadas o incluso inhibitorias dependiendo de la concentración utilizada.

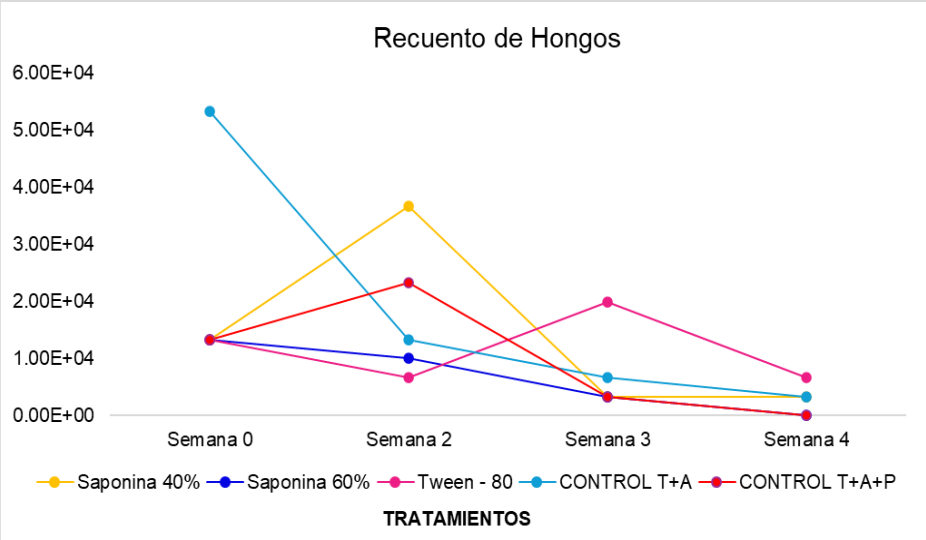
Figura 17. Evolución del recuento bacteriano (UFC) en suelo contaminado con petróleo tratado con saponinas de quinua y Tween-80.



Nota. Elaboración propia

En la **Figura 17** se presenta la evolución del recuento fúngico, donde se observa que el tratamiento con saponina al 40 % muestra un incremento en etapas intermedias seguido de una reducción progresiva, comportamiento que ha sido reportado en estudios donde las saponinas favorecen una respuesta microbiana temprana asociada a la solubilización parcial de hidrocarburos (57) (34). En el tratamiento con saponina al 60 % se observa una disminución continua del crecimiento fúngico, lo que concuerda con estudios donde biosurfactantes con mayor fracción hidrofóbica generan una movilización más intensa del contaminante, pero una menor estimulación microbiana (63) (15). En el caso del Tween-80 también se observa un comportamiento fluctuante, con una respuesta microbiana posterior asociada a la mayor disponibilidad de hidrocarburos solubilizados (8) (61).

Figura 18. Evolución del recuento fúngico (UFC) en suelo contaminado con petróleo tratado con saponinas de quinua y Tween-80.



Nota. Elaboración propia

Es importante considerar que bacterias y hongos cumplen roles diferentes en los procesos de degradación de hidrocarburos en el suelo. Las bacterias suelen responder más rápidamente a la presencia de compuestos orgánicos fácilmente degradables, participando principalmente en la degradación de fracciones alifáticas del petróleo. Por el contrario, los hongos presentan mayor capacidad para tolerar compuestos más complejos, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, y suelen participar en etapas posteriores del proceso de degradación (66) (67).

En conjunto, los resultados obtenidos indican que las saponinas de quinua influyen en la dinámica microbiana del suelo contaminado; sin embargo, su efecto depende de la concentración utilizada. Concentraciones moderadas pueden favorecer parcialmente la biodisponibilidad del contaminante, mientras que concentraciones más altas pueden generar efectos inhibitorios sobre el microbiota del suelo. Estos resultados sugieren que una mayor concentración de biosurfactante no necesariamente se traduce en una mayor eficiencia del proceso de biorremediación.

CONCLUSIONES

PRIMERA. Los tratamientos con los extractos de residuos de quinua y purificación a saponinas demostraron propiedades tensoactivas dependientes del nivel de pureza, es así que la saponina de 60% presentó una menor Concentración Micelar Critica (CMC) del 0.22 g/L en comparación con el extracto de saponina de 40% de pureza que tuvo un CMC de 0.75 g/L, evidenciando así mayor eficiencia interfacial y capacidad de auto samblaje, lo cual es congruente con el mejor desempeño en capacidad emulsificante y estabilidad de espuma, confirmando que la pureza favorece el comportamiento anfifílico y funcionalidad como biosurfactantes.

SEGUNDA. Las saponinas aplicadas con pureza del 60 % logró una remoción de hidrocarburos en suelos contaminados evidenciada por una reducción estadísticamente significativa ($p<0.05$) en la concentración de petróleo respecto al control negativo (tierra contaminada sin tratamiento). Este comportamiento en su desempeño es comparable con el surfactante sintético Tween 80, demostrando que las saponinas extraídas de residuos de quinua pueden actuar como una alternativa natural y eficaz en procesos de biorremediación.

TERCERA El conteo microbiano mostró que las bacterias presentaron una disminución inicial asociada al estrés generado por la movilización del petróleo, donde se muestra una adaptación progresiva, mientras que los hongos evidencian mayor tolerancia. La saponina de 40% favoreció una respuesta microbiana más equilibrada en contraste con la saponina de 60% y Tween 80 que produjeron una inhibición parcial respecto al control positivo (tierra sin contaminar). En conjunto los resultados confirman que las concentraciones intermedias de saponina optimizan la biodegradación al mantener la vida microbiana.

RECOMENDACIONES

1. Potenciar la biorremediación mediante la combinación de saponinas con cepas biodegradadoras específicas (Pseudomonas, Bacillus), buscando sinergias que preserven la actividad microbiana y mejoren la degradación.
2. Validar la efectividad del tratamiento a través de estudios piloto en campo y en laboratorios certificados, considerando la variabilidad ambiental, tipos de suelos y escalabilidad.
3. Realizar evaluaciones integrales del impacto ambiental del proceso, incluyendo análisis de ciclo de vida, huella de carbono, calidad del suelo postratamiento y promoción de modelos de economía circular que valoricen residuos y reduzcan el impacto ambiental.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Kamble N, Bera S, Bhedase S, Gaur V, Chowdhury D. Revisión sobre las aplicaciones del microbioma en la vida humana. Bacteria 2024. 2024 Mar;: p. 141–159.

2. Fontes AL SMPLORSJCC. Biodegradation of petroleum hydrocarbons based pollutants in contaminated soil by exogenous effective microorganisms and indigenous microbiome. Chemosphere. 2023; 320:138012.

3. King A SBJCLD. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils using native microbial consortia. Environmental Science Journal. 2023 58(4):123–130..

4. Kumar S SASRGP. Strategies for remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated environments: A comprehensive review. Science of the Total Environment. 2023; 857(159593).

5. Yang A LYTXJYDWYLXSQWYQ. Adsorption–Desorption and Interfacial Distribution Characteristics of Petroleum Hydrocarbons in Soil Systems. Water Air Soil Pollut. 2025;236(280)..

6. Badmus S, Amusa H, Oyehan T, Saleh T. Riesgos ambientales y toxicidad de los surfactantes: Resumen de técnicas de análisis, evaluación y remediación. Environ. Sci. Pollut. 2021; 28(62085–62104.).

7. Jarzębski M, Smułek W, Siejak P, Kobus-Cisowska J, Pieczirak D, Baranowska H, et al. Extracto como posible estabilizador de emulsión. Hidrocoll alimentario. 2019 , 97 , 105237..

8. Santos D, Rufino R, Luna J, Santos V, Sarubbo. LA Biosurfactantes: biomoléculas multifuncionales del siglo XXI. Int. J. Mol. Ciencia. 2016 , 17 , 401..

9. Gordillo-Bastidas E, Díaz-Rizzolo D, Roura E, Massanés T, Gomis R. Quinoa (Chenopodium quinoa Willd), del valor nutricional a los posibles beneficios para la salud: una revisión integradora. J. Nutr. Ciencia de los alimentos. 2016 , 6 , 3..

10. Grancic P BLea. Plant biomass extracted eco-friendly natural surfactant enhanced bioavailability and biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated soil. Environmental Research. 2023;226:115813..

11. Gaur S SACPGSJA. Remediation of waste engine oil contaminated soil using rhamnolipid based detergent formulation. Materials Today: Proceedings. 2023;77:31–38..

12. Arulprakash Arumugam CFJSSKORDFZXGSKRBXL. Plant biomass extracted eco-friendly natural surfactant enhanced bio-electrokinetic remediation of crude oil contaminated soil. Environmental Research. 2024;(117913): p. 0013-9351.

13. Milad Norouzpour MNAAHARMSAK. Experimental investigation of the effect of a quinoa-derived saponin-based green natural surfactant on enhanced oil recovery. Fuel. 2022; 318.

14. Lunder M GPea. Plant biomass extracted eco-friendly natural surfactant enhanced bioavailability and biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated soil. Environmental Research. 2023;226:115813..

15. Liu Y WXZLCJLH. Functional nanoparticle-stabilized surfactant foam for remediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil. Journal of Hazardous Materials. 2022;436:129093..

16. Jain A GSSACPGS. Remediation of waste engine oil contaminated soil using rhamnolipid-based detergent formulation. Materials Today: Proceedings. 2023;77:31–38..

17. S. A. Introduction of Petroleum Hydrocarbons Contaminants and its Human Effects. J Environ Sci Public Health. 2019;3(1):1–9.

18. Hirasaki GJ MCSRTDLJMHJMLJJRPGWW. Field Demonstration of the Surfactant/Foam Process for Aquifer Remediation. SPE Annual Technical Conference and Exhibition. 1997 oct; 5-8.

19. Osei-Bonsu K GPSN. Relationship between bulk foam stability, surfactant formulation and oil displacement efficiency in porous media. Fuel. 2017;203:403–410..

20. Khatib ZL HGFA. Effects of capillary pressure on coalescence and phase mobilities in foams flowing through porous media. SPE Reservoir Engineering. 1988;3(3):919–926..

21. Keshavarzi B MFLAKMNAMA. Surfactant-enhanced soil washing for removal of petroleum hydrocarbons from contaminated soils: A review. Pedosphere. 2018;28(3):383–410..

22. Jia Liu WyLHxCSqLLhYKmPCCXfH. Applications of functional nanoparticle–stabilized surfactant foam in petroleum-contaminated soil remediation. Journal of Hazardous Materials. 2023; 130267(0304-3894).

23. Abayneh Ayele BEFKADU QC. Surfactant-Enhanced Soil Washing for Removal of Petroleum Hydrocarbons from Contaminated Soils: A Review. Pedosphere. 2018;: p. 383.

24. Mandal T DDMS. Surfactant-enhanced aquifer remediation: Mechanisms, influences, limitations and the countermeasures. Chemosphere. 2020;253:126647..

25. colaboradores JYy. Identificacion y valoracion de las saponinas de chenopodium quinoa, Ayacucho. Revista de investigacio de la Universisas Nacional de San Cristoblan de Huamanga. 2018.

26. Randriamamonjy TH OJAMSPea. Comparative study on the amphiphilicity, emulsifying and foaming properties of saponins extracted from Furcraea foetida. Colloids Surf A Physicochem Eng Asp. 2022; 653(129923).

27. Rizzo V BAPR. Experimental determination of surface tension of bio-based surfactants. Sep Purif Technol. 2022;282:120047. 2022; 282(120047).

28. Yang J ea. Effect of purity of saponins on emulsion stability. J Surfactants Deterg. 2013; 16(3)(455–63.).

29. Rosen MJ KJ. Surfactants and interfacial phenomena. 4th ed.Hoboken: Wiley. 2012.

30. Yang Y LMSAMD. Formation and stability of emulsions using natural surfactants: Quillaja saponin as an emulsifier. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2021; 69(5): p. 1660-1670.

31. Russo-Martínez N VXMACJea. Enhancing spontaneous biosurfactant production through water steeping of olive mill waste. Sci Rep. 2025; 15:7676.

32. Zhang D ZLLF. Influences of surfactants on pyrene biodegradation in soil. Environ Pollut. 2012; 164:66–73.

33. García-Bustos KA SMSdSSea. Saponin molecules from quinoa residues: exploring their surfactant, emulsifying, and detergent properties. Molecules. 2024; 29(20):4928.

34. Bezza FA CE. Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged petroleum-contaminated soil. Process Saf Environ Prot. 2021 146:40-49..

35. Esmaeilian A ea. Natural surfactants and plant-derived saponins for interfacial applications. J Mol Liq. 2024.

36. Zdzieńnicka A ea. Surface properties of aqueous plant-derived saponin extracts. Colloids Surf A. 2025.

37. radhan A BSCKMSBA. Saponins from Albizia procera extract: Surfactant activity and preliminary analysis. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2022; 643(128778.).

38. Dabestani M TSDN. A natural source of saponin: Comprehensive study on interfacial properties of Chubak (Acanthophyllum glandulosum) root extract and related saponins. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2021; 629:127442.

39. Sun S ZCLSYHZHYC. Improving emulsifying properties using mixed natural emulsifiers: Tea saponin and golden pompano protein. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2023; 656:130311.

40. Chen Y YHLJWYJL. Tea saponin as a natural surfactant: Structure, foaming, emulsifying properties and applications. Food Hydrocolloids. 2020; 101:105538.

41. Medina-Meza IG ANSSGG. GC-MS profiling of triterpenoid saponins from quinoa (Chenopodium quinoa Willd.). 2021. ; 338: p. 128-134.

42. Wang H LQLYZW. Plant-based biosurfactants: Properties, characterization and environmental applications. J Clean Prod. 2023; 382:135246.

43. Saleem SS ZYMGQN. Biosurfactants and their role in improving hydrocarbon biodegradation. Environ Pollut. 2021; 273(116467).

44. Zhang C LXCYWC. Application of biosurfactants in soil remediation: A review. Environ Technol Innov. 2020; 20:101065.

45. Shinoda K SH. The stability of O/W type emulsions as functions of temperature and the HLB of emulsifiers. J Colloid Interface Sci. 1969; 30(2)(258–63).

46. Shinoda K FS. Emulsions and solubilization. New York: Wiley. 1986.

47. TF T. Emulsion formation and stability. Weinheim: Wiley-VCH. 2013.

48. Mitra S DS. Phase inversion temperature behavior of nonionic surfactants. Langmuir. 1997; 13(14)(3888–95).

49. Romero Vega G GSP. Molecules. Bio-based surfactants and biosurfactants: an overview and main characteristics. 2025; 30(4)(863).

50. Simões CR dSMdSRHRMATMea. Biosurfactants: properties, production, and application. Resources. 2024; 13(6)(81.).

51. Romero Vega G GS. Bio-based surfactants and biosurfactants: main characteristics. Molecules. 2025; 30(863).

52. CN. M. Environmental applications for biosurfactants. Environ Pollut. 2005; 133(2):183–198.

53. Güçlü-Üstündağ O MG. Saponins: properties, applications and processing. Crit Rev Food Sci Nutr. 2007; 47(3)(231–58.).

54. Desai JD BI. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol Mol Biol Rev. 1997; 61(1)(47–64.).

55. Van Hamme JD SAWO. Physiological aspects of microbial surfactant production. Biotechnol Adv. 2006;24(6):604–20..

56. McClements DJ. Food emulsions: Principles, practices, and techniques. Boca Raton (FL). 2015.

57. Pacwa-Płociniczak M PGPSZCS. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. Int J Mol Sci. 2011; 12(1):633–654.

58. Wang Z,FM,&PD. Oil spill identification and quantification using spectroscopic techniques. Journal of Chromatography A. 2010.

59. Okparanma RN,&MAM. Determination of total petroleum hydrocarbon in soils. Environmental Monitoring and Assessment. 2013.

60. Mora-Ocación J GCJCPA. Extraction and quantification of saponins in quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) genotypes. Foods. 2022; 11(5):673.

61. Banat IM FAGIea. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Appl Microbiol Biotechnol. 2010; 87(2)(427–444.).

62. Urum K PT. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. Chemosphere. 2004; 57(9):1139–1150.

63. Fenibo EO DSSH. review on microbial surfactants: production, classification, properties and characterization. J Adv Microbiol. 2020; 0(2):1-21.

64. Varjani SJ UV. Bioaugmentation with biosurfactants for hydrocarbon degradation. Bioresour Technol. 2021 330; 289(112502).

65. Cameotra SS BJ. Biosurfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Crit Rev Environ Sci Technol. 2003; 33(2)(111–26).

66. Eras-Muñoz E,FA,SA,FX,>. Microbial biosurfactants: a review of recent environmental applications. Bioengineered. 2022.; 13(5)(12365–12391).

67. Dias MAM NM. Bacterial-derived surfactants: an update on general aspects and forthcoming applications. Braz J Microbiol. 2023 marzo; 54(1): p. 103-123.

68. Gonzales G PARCCD. Cuantificación de saponinas en residuos de quinua real (Chenopodium quinoa Willd.). Rev Boliv Quím. 2015; 32(1)(11-19).

69. Michel J, Fingas M. Derrames de petróleo: Causas, consecuencias, prevención y contramedidas. En Combustibles fósiles: Estado actual y perspectivas futuras. World Scientific Publishing Company: Singapur. 2016;: p. 159-201.

70. Giwa A AAOOea. Plant biomass extracted eco-friendly natural surfactant enhanced bioavailability and biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated soil. Environmental Research. 2023; ;226:115813.

71. Kvenvolden KA CC. Natural seepage of crude oil into the marine environment. Geo-Marine Letters. 2003; 23(3-4):140–146.

72. Fleifel M ENMAMA. Surfactant-enhanced remediation of oil-contaminated soil and groundwater: A review. Sci Total Environ. 2020;743:140444..

73. Li X WXWYZYLJWL. Surfactant-enhanced remediation of oil-contaminated soil and groundwater: A review. Science of The Total Environment. 2020;743:140444..

74. Almeida CA QCdSMea..Migration of petroleum hydrocarbons in sandy soils. A short-term experimen.tJ. Environ Manage. 2021; 289(112502).

75. Wang L ea. Comparison of hexane and DCM for petroleum hydrocarbon extraction in soils. J Hazard Mater. 2021. 408.; 124888.

76. Santos DKF RRLJSVSL. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. J Mol Liq. 2021; 333(115971).

77. Jiménez-Peñalver P CMKAGRSAFX. Production and characterization of biosurfactants for environmental applications. olloids Surf B Biointerfaces. 2019; 183(110406).

78. AT. KHP. An experimental investigation on the determination of critical micelle co. J Phys Chem. 2025; 13(145-53).

79. Dev RS. Critical micellar concentration determination: measurements of surface tension vs concentration. In.: e437974077; 2020.

80. Deodhar S RPMMea. Determination of CMC of surfactants of differing purity from spreading experiments. Chem Phys J. 2020.

81. Sparg SG LMvSJ. Biological activities and distribution of plant saponins. J Ethnopharmacol. 2004; 94(2–3)(219–43).

82. Li J ea. In vitro and in silico studies of antimicrobial saponins. Processes. 2023; 11(10)(2856).

83. Sparg SG LMvSJ. Biological activities and distribution of plant saponins. J Ethnopharmacol. 2004; 94(2–3)(219–43).

84. Podolak I GASD. Saponins as cytotoxic agents: a review. Phytochem Rev. 2010 Sep;(425–74).

85. Ron EZ RE. Natural roles of biosurfactants. Environ Microbiol. 2001; 3(4):229–36.

86. Harms H SDWL. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. Nat Rev Microbiol. 2011; 9(3)(177–92.).

87. H. S. Mycoremediation: fungal bioremediation. Hoboken: Wiley-Interscience. 2006.

ANEXOS

Anexo 1. Matriz de datos estadísticos.

Remoción	Remoción	Días	Tratamiento	Absorbancia	Concetracion de petróleo g/L
agua	1	0	Saponina 40	0.099	0.058
agua	1	0	Saponina 40	0.100	0.059
agua	1	0	Saponina 40	0.084	0.045
agua	1	0	saponina 60	0.091	0.051
agua	1	0	saponina 60	0.073	0.035
agua	1	0	saponina 60	0.094	0.054
agua	1	0	tween 80	0.201	0.149
agua	1	0	tween 80	0.115	0.073
agua	1	0	tween 80	0.125	0.081
agua	1	0	agua + tierra	0.100	0.059
agua	1	0	agua + tierra	0.092	0.052
agua	1	0	agua + tierra	0.081	0.042
agua	1	0	agua+petroleo+tierra	0.105	0.064
agua	1	0	agua+petroleo+tierra	0.076	0.038
agua	1	0	agua+petroleo+tierra	0.097	0.057
agua	1	7	Saponina 40	0.270	0.210
agua	1	7	Saponina 40	0.250	0.192
agua	1	7	Saponina 40	0.252	0.194
agua	1	7	saponina 60	0.417	0.340
agua	1	7	saponina 60	0.336	0.268
agua	1	7	saponina 60	0.240	0.183
agua	1	7	tween 80	0.173	0.124
agua	1	7	tween 80	0.308	0.244
agua	1	7	tween 80	0.166	0.118
agua	1	7	agua + tierra	0.051	0.016
agua	1	7	agua + tierra	0.050	0.015
agua	1	7	agua + tierra	0.058	0.022
agua	1	7	agua+petroleo+tierra	0.245	0.188
agua	1	7	agua+petroleo+tierra	0.135	0.090
agua	1	7	agua+petroleo+tierra	0.136	0.091
agua	1	14	Saponina 40	0.188	0.137
agua	1	14	Saponina 40	0.057	0.021
agua	1	14	Saponina 40	0.065	0.028
agua	1	14	saponina 60	0.061	0.025
agua	1	14	saponina 60	0.107	0.065
agua	1	14	saponina 60	0.072	0.034
agua	1	14	tween 80	0.252	0.194
agua	1	14	tween 80	0.162	0.114
agua	1	14	tween 80	0.171	0.122
agua	1	14	agua + tierra	0.090	0.050
agua	1	14	agua + tierra	0.096	0.056

agua	1	14	agua + tierra	0.127	0.083
agua	1	14	agua+petroleo+tierra	0.199	0.147
agua	1	14	agua+petroleo+tierra	0.136	0.091
agua	1	14	agua+petroleo+tierra	0.280	0.219
agua	1	21	Saponina 40	0.110	0.068
agua	1	21	Saponina 40	0.138	0.093
agua	1	21	Saponina 40	0.138	0.093
agua	1	21	saponina 60	0.203	0.151
agua	1	21	saponina 60	0.357	0.287
agua	1	21	saponina 60	0.382	0.309
agua	1	21	tween 80	0.132	0.088
agua	1	21	tween 80	0.307	0.243
agua	1	21	tween 80	0.249	0.191
agua	1	21	agua + tierra	0.160	0.112
agua	1	21	agua + tierra	0.137	0.092
agua	1	21	agua + tierra	0.126	0.082
agua	1	21	agua+petroleo+tierra	0.213	0.159
agua	1	21	agua+petroleo+tierra	0.293	0.230
agua	1	21	agua+petroleo+tierra	0.293	0.230
tierra	2	1	Saponina 40	0.285	0.223
tierra	2	1	Saponina 40	0.373	0.301
tierra	2	1	Saponina 40	0.133	0.088
tierra	2	1	saponina 60	0.427	0.349
tierra	2	1	saponina 60	0.203	0.151
tierra	2	1	saponina 60	0.325	0.259
tierra	2	1	tween 80	0.635	0.533
tierra	2	1	tween 80	0.432	0.354
tierra	2	1	tween 80	0.302	0.238
tierra	2	1	agua + tierra	0.105	0.064
tierra	2	1	agua + tierra	0.117	0.074
tierra	2	1	agua + tierra	1.220	1.052
tierra	2	1	agua+petroleo+tierra	0.258	0.199
tierra	2	1	agua+petroleo+tierra	0.371	0.299
tierra	2	1	agua+petroleo+tierra	0.887	0.757
tierra	2	7	Saponina 40	1.053	0.904
tierra	2	7	Saponina 40	1.202	1.036
tierra	2	7	Saponina 40	1.209	1.042
tierra	2	7	saponina 60	0.713	0.603
tierra	2	7	saponina 60	0.912	0.779
tierra	2	7	saponina 60	1.359	1.175
tierra	2	7	tween 80	0.894	0.763
tierra	2	7	tween 80	0.958	0.820
tierra	2	7	tween 80	0.967	0.828
tierra	2	7	agua + tierra	0.547	0.455
tierra	2	7	agua + tierra	0.651	0.548
tierra	2	7	agua + tierra	0.361	0.291

tierra	2	7	agua+petroleo+tierra	0.942	0.806
tierra	2	7	agua+petroleo+tierra	1.331	1.150
tierra	2	7	agua+petroleo+tierra	1.103	0.948
tierra	2	14	Saponina 40	0.980	0.839
tierra	2	14	Saponina 40	0.802	0.681
tierra	2	14	Saponina 40	0.891	0.760
tierra	2	14	saponina 60	0.782	0.664
tierra	2	14	saponina 60	0.999	0.856
tierra	2	14	saponina 60	1.092	0.939
tierra	2	14	tween 80	0.647	0.544
tierra	2	14	tween 80	0.574	0.479
tierra	2	14	tween 80	0.770	0.653
tierra	2	14	agua + tierra	0.467	0.385
tierra	2	14	agua + tierra	0.610	0.511
tierra	2	14	agua + tierra	0.649	0.546
tierra	2	14	agua+petroleo+tierra	1.456	1.261
tierra	2	14	agua+petroleo+tierra	1.262	1.089
tierra	2	14	agua+petroleo+tierra	1.384	1.197
tierra	2	21	Saponina 40	0.932	0.797
tierra	2	21	Saponina 40	0.811	0.689
tierra	2	21	Saponina 40	0.987	0.845
tierra	2	21	saponina 60	0.740	0.627
tierra	2	21	saponina 60	0.738	0.625
tierra	2	21	saponina 60	0.778	0.660
tierra	2	21	tween 80	0.904	0.772
tierra	2	21	tween 80	0.934	0.799
tierra	2	21	tween 80	1.048	0.900
tierra	2	21	agua + tierra	0.401	0.326
tierra	2	21	agua + tierra	0.549	0.457
tierra	2	21	agua + tierra	0.422	0.345
tierra	2	21	agua+petroleo+tierra	1.078	0.926
tierra	2	21	agua+petroleo+tierra	1.085	0.932
tierra	2	21	agua+petroleo+tierra	1.056	0.907

Anexo 2. Informe de calibración de Espectrofotómetro.

RESEARCH PARTNERS ASSOCIATES

CONSTRUIMOS SOLUCIONES INTEGRALES

PRUEBA DE VERIFICACIÓN POSTERIOR AL CAMBIO DEL ESPEJO 1

SISTEMA DE VALIDACION
GENESYS 150

Cliente : **UNIVERSIDAD CATÓLICA SANTA MARÍA**

Sistema : **ESPECTROFOTOMETRO UV-VIS GENSYS 150**
Nro de Serie: **9A5X354048**

Set de Estándares de Longitud de Onda : RM-HG — Número de Serie: 43163, Fecha de Calibración: 22 de enero del 2024

Set de Estándares de Absorbancia : RM-1N2N3N — Número de Serie: 43163, Fecha de Calibración: 22 de enero del 2024

SISTEMA DE VALIDACION

EXACTITUD Y PRECISION DE LONGITUD DE ONDA

Tipo de Filtro	Posicion nominal del Pico	Rango	Tolerancia del Filtro	Tolerancia del Equipo	Rango Permitido (nm)	Valor Medido	Pasa/Falla
Holmium	278.68 nm	270 a 290	0.11	0.5	278.07 - 279.29	278.58	Pasa
Holmium	287.79 nm	280 a 290	0.11	0.5	287.18 - 288.40	287.64	Pasa
Holmium	333.79 nm	330 a 340	0.11	0.5	333.18 - 334.40	334.25	Pasa
Holmium	360.60 nm	355 a 365	0.11	0.5	359.99 - 361.21	360.70	Pasa
Holmium	417.6 nm	415 a 425	0.11	0.5	416.99 - 418.21	417.40	Pasa
Holmium	447.64 nm	445 a 455	0.11	0.5	447.03 - 448.25	447.59	Pasa
Holmium	537.22 nm	530 a 540	0.11	0.5	536.61 - 537.83	537.27	Pasa
Holmium	641.6 nm	634 a 644	0.11	0.5	640.99 - 642.21	641.72	Pasa

EXACTITUD Y PRECISION FOTOMETRICA

Filtro	Longitud de Onda	Valor Nominal	Tolerancia del Filtro	Tolerancia del Equipo	Rango Permitido (Abs)	Valor Medido	Pasa/Falla
131138	440.0 nm	1.0037	0.0027	0.0040	0.997 - 1.010	1.006	Pasa
	465.0 nm	0.9469	0.0027	0.0040	0.940 - 0.954	0.948	Pasa
	546.1 nm	1.0026	0.0027	0.0040	0.996 - 1.009	1.005	Pasa
	590.0 nm	1.1147	0.0027	0.0040	1.108 - 1.121	1.117	Pasa
	635.0 nm	1.1004	0.0027	0.0040	1.094 - 1.107	1.102	Pasa
125464	440.0 nm	0.7038	0.0027	0.0040	0.697 - 0.711	0.703	Pasa
	465.0 nm	0.6648	0.0027	0.0040	0.658 - 0.672	0.664	Pasa
	546.1 nm	0.7012	0.0027	0.0040	0.695 - 0.708	0.701	Pasa
	590.0 nm	0.7766	0.0027	0.0040	0.770 - 0.783	0.776	Pasa
	635.0 nm	0.7659	0.0027	0.0040	0.759 - 0.773	0.765	Pasa
127722	440.0 nm	0.5606	0.0027	0.0040	0.554 - 0.567	0.558	Pasa
	465.0 nm	0.5228	0.0027	0.0040	0.516 - 0.530	0.520	Pasa
	546.1 nm	0.5235	0.0027	0.0040	0.517 - 0.530	0.523	Pasa
	590.0 nm	0.5571	0.0027	0.0040	0.550 - 0.564	0.557	Pasa
	635.0 nm	0.5644	0.0027	0.0040	0.558 - 0.571	0.565	Pasa

Ing. de Servicio : **Pamela Gárate Gonzales** Firma

Cliente : **Ruly Terán** Firma

Reporte de Servicio : **ST2025-391** Fecha : **Jueves 22 de mayo del 2025**

Av. Guardia Civil N°657-661 / 6to piso / San Borja — rpasa@rpaperu.com

Anexo 3. ISO 4833.

INTERNATIONAL STANDARD

ISO 4833-2

First edition
2013-09-01

Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms —

Part 2: Colony count at 30 °C by the surface plating technique

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes —

Partie 2: Comptage des colonies à 30 °C par la technique d'ensemencement en surface

ISO 4833-2:2013
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3ed47b1a-4267-47cb-8989-3ed47b1a751b/iso-4833-2-2013

Reference number
ISO 4833-2:2013(E)

© ISO 2013

Contents

Page

Foreword iv

1 Scope 1

2 Normative references 1

3 Terms and definitions 2

4 Principle 2

5 Culture media and diluents 2

5.1 General 2

5.2 Diluents 2

5.3 Agar medium: plate count agar (PCA) 2

6 Apparatus 3

7 Sampling 4

8 Preparation of test sample 4

9 Procedure 4

9.1 Test portion, initial suspension and dilutions 4

9.2 Inoculation and incubation 4

9.3 Counting of colonies 5

10 Expression of results 5

11 Test report 5

Annex A (normative) **Surface colony count using a spiral plater** 6

Bibliography 12

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 4833-2:2013
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/598d43a0-a267-47ch-8989-3cd47b1a751b/iso-4833-2-2013

Foreword

ISO (the International Organization for Standardization) is a worldwide federation of national standards bodies (ISO member bodies). The work of preparing International Standards is normally carried out through ISO technical committees. Each member body interested in a subject for which a technical committee has been established has the right to be represented on that committee. International organizations, governmental and non-governmental, in liaison with ISO, also take part in the work. ISO collaborates closely with the International Electrotechnical Commission (IEC) on all matters of electrotechnical standardization.

The procedures used to develop this document and those intended for its further maintenance are described in the ISO/IEC Directives, Part 1. In particular the different approval criteria needed for the different types of ISO documents should be noted. This document was drafted in accordance with the editorial rules of the ISO/IEC Directives, Part 2, www.iso.org/directives.

Attention is drawn to the possibility that some of the elements of this document may be the subject of patent rights. ISO shall not be held responsible for identifying any or all such patent rights. Details of any patent rights identified during the development of the document will be in the Introduction and/or on the ISO list of patent declarations received, www.iso.org/patents.

Any trade name used in this document is information given for the convenience of users and does not constitute an endorsement.

The committee responsible for this document is ISO/TC 34, *Food products*, Subcommittee SC 9, *Microbiology*.

iTeh STANDARD PREVIEW

This first edition, together with ISO 4833-1, cancels and replaces ISO 4833:2003.

(standards.iteh.ai)

ISO 4833 consists of the following parts, under the general title *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms:*

ISO 4833-2:2013
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/598d43a0-a267-47cb-8989-
ISO 4833-2:2013

— *Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique*

— *Part 2: Colony count at 30 °C by the surface plating technique*

Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms —

Part 2:
Colony count at 30 °C by the surface plating technique

1 Scope

This part of ISO 4833 specifies a horizontal method for enumeration of microorganisms that are able to grow and form colonies on the surface of a solid medium after aerobic incubation at 30 °C. The method is applicable to:

a) products intended for human consumption or for animal feed;

b) environmental samples in the area of food and feed production and food handling.

This part of ISO 4833 is applicable to:

1) products containing heat-sensitive organisms that are likely to form a significant proportion of the total flora (e.g. psychrotrophic organisms in chilled and frozen foods, dried foods, other foods that may contain heat-sensitive organisms);

2) products containing obligately aerobic bacteria that are likely to form a significant proportion of the total flora (e.g. *Pseudomonas* spp.);

3) products that contain small particles that can prove difficult to distinguish from colonies in a pour plate;

4) products whose intense colour prevents the recognition of colonies in a pour plate;

5) products for which distinction between different types of colony is required as part of the assessment of food quality.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 4833-2:2013
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2f8bd13a8-a267-4f7cb-8f80-3cd47b1a751b/iso-4833-2-2013

In addition to the manual spread plating technique, this part of ISO 4833 also specifies the use of a spiral plater, a rapid method of performing surface colony counts (Annex A).

The applicability of this part of ISO 4833 to the examination of certain fermented food and animal feeds is limited and other media or incubation conditions can be more appropriate. However, this method can be applied to such products even though it is possible that the predominant microorganisms in these products are not detected effectively.

For some matrices, the method described in this part of ISO 4833 can give different results to those obtained using the method described in ISO 4833-1.

2 Normative references

The following documents, in whole or in part, are normatively referenced in this document and are indispensable for its application. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

ISO 6887 (all parts), *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination*

ISO 7218, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations*

© ISO 2013 – All rights reserved

ISO 11133, *Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media*

3 Terms and definitions

For the purposes of this document, the following terms and definitions apply.

3.1
microorganism
entity of microscopic size, encompassing bacteria, fungi, protozoa and viruses

[SOURCE: ISO/TS 11139:2006,[3] 2.26]

Note 1 to entry: For the purposes of this part of ISO 4833, microorganisms are bacteria, yeasts and moulds that are able to produce colonies under the conditions specified in this part of ISO 4833.

4 Principle

A specified quantity of the test sample, or a specified quantity of an initial suspension in the case of other products, is surface plated on a solid agar culture medium contained in Petri dishes.

Other plates are prepared under the same conditions using decimal dilutions of the test sample or of the initial suspension.

The plates are incubated under aerobic conditions at 30 °C for 72 h.

The number of microorganisms per gram of sample or the number of microorganisms per millilitre of sample is calculated from the number of colonies obtained on the plates containing fewer than 300 colonies.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 4833-2:2013
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/598d43a0-a267-47cb-8989-3ed47b1a751b/iso-4833-2-2013

5 Culture media and diluents

5.1 General

Follow ISO 11133 for the preparation, production and performance testing of culture media.

5.2 Diluents

Use the diluent(s) specified in ISO 6887 for the product concerned or the specific International Standard dealing with the product under examination.

5.3 **Agar medium**: plate count agar (PCA)

5.3.1 Composition

Enzymatic digest of animal tissues	5,0 g
Yeast extract	2,5 g
Glucose, anhydrous ($C_6H_{12}O_6$)	1,0 g
Agar[a]	9 g to 18 g
Water	1 000 ml

[a] Depending on the gel strength of the agar.

When dairy products are examined, add skimmed milk powder at 1,0 g/l of the culture medium. The skimmed milk powder shall be free from inhibitory substances.

© ISO 2013 – All rights reserved

5.3.2 Preparation

Dissolve the components or the dehydrated complete medium in the water, by heating if necessary. Mix thoroughly and leave to stand for several minutes.

Adjust the pH (6.5), if necessary, so that after sterilization it is 7,0 ± 0,2 at 25 °C.

Dispense the medium into flasks or bottles (6.9) of suitable capacity. Sterilize in an autoclave (6.1) at 121 °C for 15 min.

If the medium is to be used immediately, cool it in a water bath (6.4) maintained at 47 °C to 50 °C before use. If not, allow the medium to solidify in the flask or bottle. Before use, melt the medium completely in a boiling water bath, then cool it in the water bath (6.4) maintained at 47 °C to 50 °C.

5.3.3 Preparation of agar plates

Pour 15 ml to 20 ml of the medium into sterile Petri dishes (6.6) and allow to solidify.

The plates may be stored at (5 ± 3) °C for up to 4 weeks.

Immediately before use, the agar plates should be dried in accordance with ISO 11133.

5.3.4 Performance testing of the culture medium

5.3.4.1 General

iTeh STANDARD PREVIEW

Plate count agar is a non-selective medium, used in this part of ISO 4833 as a pre-poured plate for surface inoculation. Productivity shall be tested according to ISO 11133.

(standards.iteh.ai)

5.3.4.2 Productivity

ISO 4833-2:2013
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/598d43a0-a267-47eb-8989-
ISO 4833-2:2013

Incubation	(30 ± 1) °C for (72 ± 3) h
Control strains	*Escherichia coli* WDCM 00013 or WDCM 00012[a] [World Data Centre for Microorganisms (WDCM)]
	Bacillus subtilis subsp. *spizizenii* WDCM 00003[a]
	Staphylococcus aureus WDCM 00032 or WDCM 00034
Reference medium	Tryptone soya agar
Control method	Quantitative
Criterion	Productivity ratio (PR) ≥0,7

[a] The strains to be used by the user laboratory (minimum). See Reference [15] for information on culture collection strain numbers and contact details.

6 Apparatus

Disposable apparatus is an acceptable alternative to re-usable glassware and plastic if it has suitable specifications.

Usual microbiological laboratory equipment (see ISO 7218) and in particular the following.

6.1 **Oven** for dry sterilization or **autoclave** for wet sterilization, used in accordance with ISO 7218.

6.2 **Drying cabinet** or **incubator**, ventilated by convection, for drying plates, capable of being maintained between 37 °C and 55 °C, or **laminar flow cabinet**.

© ISO 2013 – All rights reserved

6.3 **Incubator,** capable of being maintained at (30 ± 1) °C.

6.4 **Water baths**, capable of being maintained at 47 °C to 50 °C, and another capable of maintaining water at boiling point.

6.5 **pH-meter**, accurate to within ±0,1 pH unit at 25 °C.

6.6 **Petri dishes**, made of glass or plastic, of diameter 90 mm to 100 mm, or140 mm.

6.7 **Total delivery graduated pipettes**, sterile, of nominal capacities 0,1 ml and 1 ml, ISO 835[1] class A, or automatic pipettes, ISO 8655-2,[2] with use of sterile tips.

6.8 **Colony-counting equipment** (optional), consisting of an illuminated base and, optionally, a mechanical or electronic digital counter.

6.9 **Bottles** or **flasks**, of appropriate capacity, for preparation, sterilization and, if necessary, storage of culture media.

6.10 **Spreaders,** made of glass, plastic or steel, sterile, for spreading the inoculum on the surface of the culture medium.

7 Sampling

Sampling is not part of the method specified in this part of ISO 4833. See the specific International Standard dealing with the product concerned. If there is no specific International Standard, it is recommended that the parties concerned come to an agreement on this subject.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

It is important the laboratory receive a truly representative sample which has not been damaged or changed during transport or storage.

ISO 4833-2:2013
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/598d43a0-a267-47cb-8989-3ed47b1a751b/iso-4833-2-2013

8 Preparation of test sample

Prepare the test sample in accordance with the specific International Standard appropriate to the product concerned.

9 Procedure

9.1 Test portion, initial suspension and dilutions

Follow the specifications of ISO 6887 or the specific International Standard appropriate to the product concerned.

9.2 Inoculation and incubation

9.2.1 Transfer, using a sterile pipette (6.7), 0,1 ml of the test sample, if the product is liquid, or of the initial suspension in the case of other products, to the centre of each of two agar plates (5.3). If plates from more than one dilution are prepared, this may be reduced to one agar plate (see ISO 7218).

If, for certain products, it is desirable to count low numbers of organisms, the limits of detection can be raised by a factor of 10 by inoculating 1,0 ml of the test sample, if liquid, or 1.0 ml of the initial suspension for other products, either on the surface of one large agar plate (140 mm) or on the surface of three small agar plates (90 mm). In both cases, prepare duplicates by using two large plates or six small ones.

9.2.2 Take one other agar plate (5.3). Use another sterile pipette (6.7) to dispense 0.1 ml of the 10^{-1} dilution (liquid products) or 0,1 ml of the 10^{-2} dilution (other products).

9.2.3 If necessary, repeat the procedure using further decimal dilutions, using a new sterile pipette for each dilution.

© ISO 2013 – All rights reserved

9.2.4 Carefully spread the inoculum uniformly and as quickly as possible over the surface of the agar plate, without touching the sides of the dish with the spreader (6.10). It is possible to use the same spreader for all dilutions from one sample beginning with the highest dilution and progressing in order to the dilution having the greatest amount of test material.

Leave the plates with the lids on for about 15 min at ambient temperature for the inoculum to be absorbed into the agar.

9.2.5 Invert the prepared plates and place them in the incubator (6.3) set at 30 °C, in accordance with ISO 7218. Incubate for (72 ± 3) h.

NOTE For inoculation using a spiral plater, see Annex A.

9.3 Counting of colonies

9.3.1 After the specified incubation period (see 9.2.3), select the agar plates with, if possible, fewer than 300 colonies. Count all colonies using the colony-counting equipment (6.8) if necessary. It is important that pinpoint colonies be included in the count; however, it is essential that the operator avoid mistaking particles of food for pinpoint colonies.

9.3.2 Spreading colonies shall be considered as single colonies. If spreading colonies are expected, examine the plates after 24 h or 48 h and mark the colonies visible. If less than one-quarter of the plate is overgrown by spreading colonies, count the colonies on the unaffected part of the plate and calculate the corresponding number for the entire plate. If more than one-quarter of the plate is overgrown by spreading colonies, discard the count for that plate. If all plates are affected by spreading colonies, count the most suitable plates and note in the test report that the result may be affected by spreading colonies.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

10 Expression of results

Follow the procedure specified in ISO 7218.

ISO 4833-2:2013
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/598d43a0-a267-47cb-8989-3ed47b1a751b/iso-4833-2-2013

11 Test report

The test report shall contain at least the following information:

a) all information necessary for the complete identification of the sample;

b) the sampling method used, if known,

c) the test method used, with reference to this part of ISO 4833 (ISO 4833-2:2013);

d) all operating details not specified in this part of ISO 4833, or regarded as optional, together with details of any incidents which may have influenced the test result(s);

e) the test result(s) obtained.

© ISO 2013 – All rights reserved

Anexo 4. Ecuaciones.

Ecuación 3.

$$y1 = y2$$

$$\text{Donde: } y1 = -5.966\ln(x) + 35.068$$

$$y2 = 1.076\ln(x) + 37.052$$

Remplazando:

$$-5.966\ln(x) + 35.068 = 1.076\ln(x) + 37.052$$

$$-7.042\ln(x) = 1.984$$

$$\ln(x) = \frac{1.984}{-7.042}$$

$$\ln(x) = -0.2817$$

$$x = 0.75$$

Ecuación 4.

$$y1 = y2$$

$$\text{Donde: } y1 = -7.341\ln(x) + 26.945$$

$$y2 = 0.817\ln(x) + 39.431$$

Remplazando:

$$-7.341\ln(x) + 26.945 = 0.817\ln(x) + 39.431$$

$$-8.158\ln(x) = 12.486$$

$$\ln(x) = \frac{12.486}{-8.1531}$$

$$\ln(x) = -1.531$$

$$x = 0.22$$

Ecuación 5.

Posterior a eso se usó la formula general:

$$\text{UFC/Ml} = \frac{\text{Numero de colonias contadas}}{\text{Volumen sembrado(ml)x Factor de dilucion}}$$

Donde:

- El número de colonias contadas: se sacó el promedio de las tres repeticiones como se muestras en la tabla 10.
- Volumen sembrado: 0.01 ml
- Factor de dilución: 10^3 y $10^{6.}$

Anexo 5. Conteo de Unidades formadoras de Colonias.

Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC)					
	Bacterias				
Repeticiones	Saponina 40%	Saponina 60%	Tween - 80	CONTROL T+A	CONTROL T+A+P
Repeticion 1	12	12	12	12	12
Repeticion 2	5	5	5	14	5
Repeticion 3	7	7	7	16	7
Semana 1	8	8	8	14	8
Repeticion 1	6	0	2	1	0
Repeticion 2	3	0	1	2	0
Repeticion 3	3	0	0	1	4
Semana 2	4	0	1	1.333333333	1.333333333
Repeticion 1	0	0	0	6	0
Repeticion 2	0	0	0	0	0
Repeticion 3	0	1	0	0	0
Semana 3	0	0.333333333	0	2	0
Repeticion 1	2	0	1	0	1
Repeticion 2	0	0	0	1	1
Repeticion 3	0	0	6	0	0
Semana 4	0.666666667	0	2.333333333	0.333333333	0.666666667

Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC)					
	Hongos				
Repeticiones	Saponina 40%	Saponina 60%	Tween - 80	CONTROL T+A	CONTROL T+A+P
Repeticion 1	0	0	0	7	0
Repeticion 2	1	1	1	4	1
Repeticion 3	3	3	3	5	3
Semana 1	1.333333333	1.333333333	1.333333333	5.333333333	1.333333333
Repeticion 1	6	1	0	1	4
Repeticion 2	4	0	1	3	0
Repeticion 3	1	2	1	0	3
Semana 2	3.666666667	1	0.666666667	1.333333333	2.333333333
Repeticion 1	0	0	1	1	0
Repeticion 2	1	1	2	1	1
Repeticion 3	0	0	3	0	0
Semana 3	0.333333333	0.333333333	2	0.666666667	0.333333333
Repeticion 1	1	0	1	0	0
Repeticion 2	0	0	0	1	0
Repeticion 3	0	0	1	0	0
Semana 4	0.333333333	0	0.666666667	0.333333333	0

Anexo 6. Espectrofotometría de cantidad de petróleo.

Semana 1

Barrido_26_08_2000_2:58:30

26-ago.-2000 03:49 a. m.

Nombre del método: Barrido 26-ago.-2000

Método creado: 26-ago.-2000 02:56 a. m.

Método actualizado: 26-ago.-2000 02:56 a. m.

N.º serie del instrumento: 9A5X354048

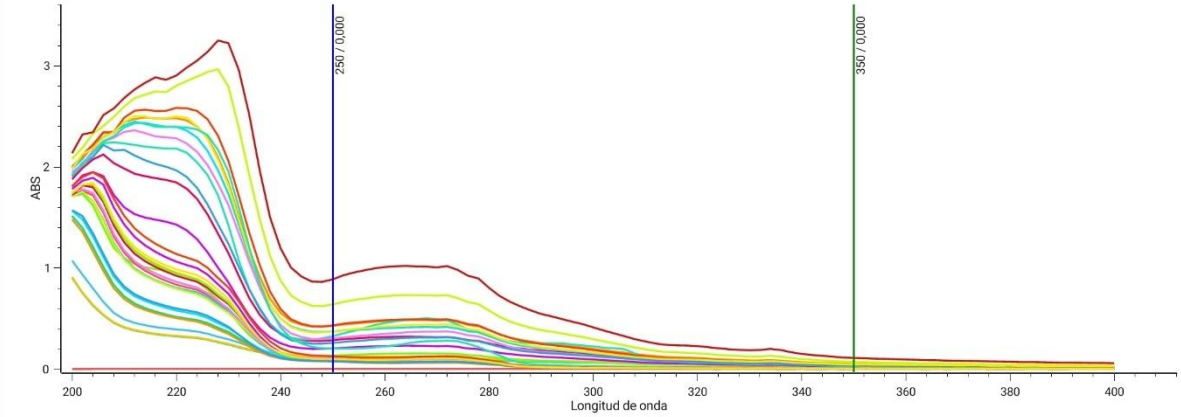
Modelo instrumento: GENESYS 150

Versión de paquete de software: 2.3

Firma:

Barrido:parámetros de método

Intervalo de longitudes de	**200 - 400 nm**
Intervalo	**2,0 nm**
Velocidad	**Rápida**



Ejemplo	ABS(250)	ABS(350)
Ejemplo 1	0,000	0,000
t+a tierra 1	0,105	0,021
t+a tierra 2	0,117	0,024
t+a tierra 3	0,122	0,026
sap 40 tierra 1	0,285	0,041
sap 40 tierra 2	0,373	0,043
sap 40 tierra 3	0,133	0,021
sap 60 tierra 1	0,427	0,050
sap 60 tierra 2	0,203	0,024
sap 60 tierra 3	0,325	0,028
t 80 tierra 1	0,639	0,069
t 80 tierra 2	0,432	0,039
t 80 tierra 3	0,302	0,032
a+t+p tierra 1	0,258	0,034

Barrido_26_08_2000_2:58:30

26-ago.-2000 03:49 a. m.

Nombre del método: Barrido 26-ago.-2000

Método creado: 26-ago.-2000 02:56 a. m.

Método actualizado: 26-ago.-2000 02:56 a. m.

N.º serie del instrumento: 9A5X354048

Modelo instrumento: GENESYS 150

Versión de paquete de software: 2.3

Firma:

Ejemplo	ABS(250)	ABS(350)
a+t+p tierra 2	0,371	0,044
a+t+p tierra 3	0,887	0,109
a+t agua 1	0,100	0,010
a+t agua 2	0,092	0,009
a+t agua 3	0,081	0,007
s 40 agua 1	0,099	0,006
s 40 agua 2	0,100	0,006
s 40 agua 3	0,089	0,004
s 60 agua 1	0,091	0,005
s 60 agua 2	0,073	0,003
s 60 agua 3	0,094	0,004
t 80 agua 1	0,201	0,005
t 80 agua 2	0,115	0,006
t 80 agua 3	0,125	0,004
a+t +p agua 1	0,105	0,006
a+t +p agua 2	0,076	0,003
a+t +p agua 3	0,097	0,002

Semana 2

Barrido_02_09_2000_3:42:08

02-sept.-2000 04:28 a. m.

Nombre del método: Barrido 02-sept.-2000

Método creado: 02-sept.-2000 03:41 a. m.

Método actualizado: 02-sept.-2000 03:41 a. m.

N.º serie del instrumento: 9A5X354048

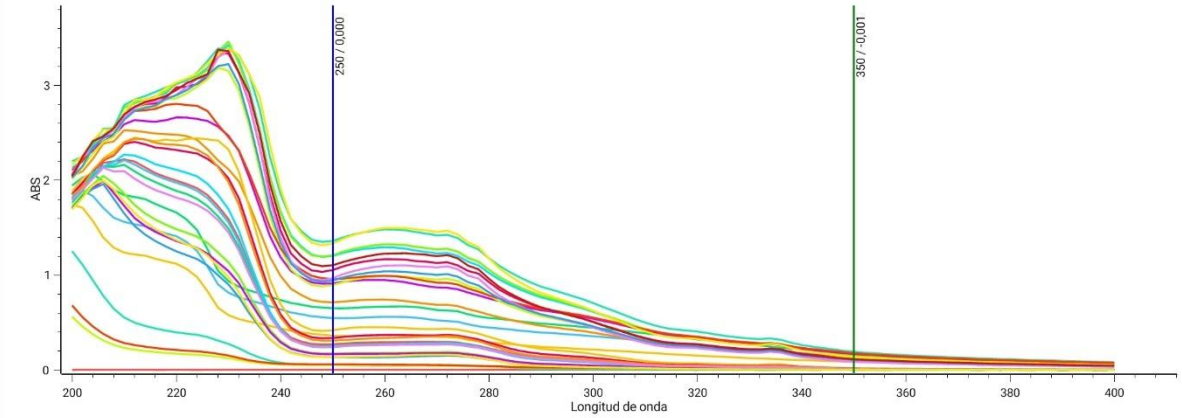
Modelo instrumento: GENESYS 150

Versión de paquete de software: 2.3

Firma:

Barrido:parámetros de método

Intervalo de longitudes de	**200 - 400 nm**
Intervalo	**2,0 nm**
Velocidad	**Rápida**



Ejemplo	ABS(250)	ABS(350)
Ejemplo 1	0,000	-0,001
tierra a+t 1	0,547	0,148
tierra a+t 2	0,651	0,178
tierra a+t 3	0,361	0,085
tierra sap 40 % 1	1,053	0,119
tierra sap 40 % 2	1,202	0,157
tierra sap 40 % 3	1,209	0,153
tierra sap 6 0 % 1	0,713	0,120
tierra sap 6 0 % 2	0,912	0,168
tierra sap 6 0 % 3	1,359	0,191
tierra sap t80 1	0,894	0,107
tierra sap t80 2	0,958	0,176
tierra sap t80 3	0,967	0,086
tierra a+t+p 1	0,942	0,106

Barrido_02_09_2000_3:42:08

02-sept.-2000 04:28 a. m.

Nombre del método: Barrido 02-sept.-2000

Método creado: 02-sept.-2000 03:41 a. m.

Método actualizado: 02-sept.-2000 03:41 a. m.

N.º serie del instrumento: 9A5X354048

Modelo instrumento: GENESYS 150

Versión de paquete de software: 2.3

Firma:

Ejemplo	ABS(250)	ABS(350)
tierra a+t+p 2	1,331	0,135
tierra a+t+p 3	1,103	0,112
agua sap 40% 1	0,270	0,012
agua sap 40% 2	0,250	0,008
agua sap 40% 3	0,252	0,006
agua sap 60 % 1	0,417	0,018
agua sap 60 % 2	0,336	0,014
agua sap 60 % 3	0,240	0,005
agua t 80 % 1	0,173	0,001
agua t 80 % 2	0,308	0,013
agua t 80 % 3	0,166	0,003
agua t+a 1	0,051	0,002
agua t+a 2	0,050	0,008
agua t+a 3	0,058	0,008
agua t+a + p 1	0,245	0,013
agua t+a + p 2	0,135	0,004
agua t+a + p 3	0,136	0,002

Semana 3

Barrido_09_09_2000_3:16:45

09-sept.-2000 04:05 a. m.

Nombre del método: Barrido 09-sept.-2000

Método creado: 09-sept.-2000 03:13 a. m.

Método actualizado: 09-sept.-2000 03:13 a. m.

N.º serie del instrumento: 9A5X354048

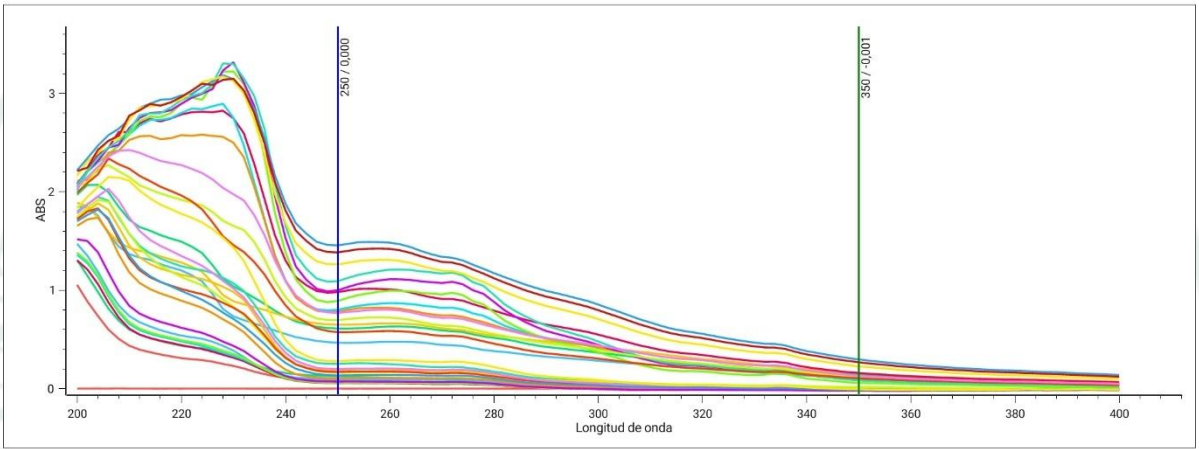
Modelo instrumento: GENESYS 150

Versión de paquete de software: 2.3

Firma:

Barrido:parámetros de método

Intervalo de longitudes de	**200 - 400 nm**
Intervalo	**2,0 nm**
Velocidad	**Rápida**



Ejemplo	ABS(250)	ABS(350)
Ejemplo 1	0,000	-0,001
tierra a+t 1	0,467	0,107
tierra a+t 2	0,610	0,142
tierra a+t 3	0,649	0,159
tierra sap 40% 1	0,980	0,159
tierra sap 40% 2	0,802	0,104
tierra sap 40% 3	0,891	0,060
tierra sap 60% 1	0,782	0,110
tierra sap 60% 2	0,999	0,086
tierra sap 60% 3	1,092	0,085
tierra t 80 1	0,697	0,123
tierra t 80 2	0,574	0,105
tierra t 80 3	0,770	0,128
tierra a+t+p 1	1,456	0,297

Barrido_09_09_2000_3:16:45

09-sept.-2000 04:05 a. m.

Nombre del método: Barrido 09-sept.-2000

Método creado: 09-sept.-2000 03:13 a. m.

Método actualizado: 09-sept.-2000 03:13 a. m.

N.º serie del instrumento: 9A5X354048

Modelo instrumento: GENESYS 150

Versión de paquete de software: 2.3

Firma:

Ejemplo	ABS(250)	ABS(350)
tierra a+t+p 2	1,262	0,227
tierra a+t+p 3	1,384	0,269
agua t+a 1	0,090	-0,008
agua t+a 2	0,096	-0,010
agua t+a 3	0,127	-0,002
agua sap 40% 1	0,188	-0,015
agua sap 40% 2	0,057	-0,022
agua sap 40% 3	0,065	-0,020
agua sap 60% 1	0,061	-0,021
agua sap 60 % 2	0,107	-0,019
agua sap 60 % 3	0,072	-0,022
agua t 80 1	0,252	-0,004
agua t 80 2	0,162	0,015
agua t 80 3	0,171	-0,011
agua a +t+p 1	0,199	-0,013
agua a +t+p 2	0,136	-0,014
agua a +t+p 3	0,280	-0,006

Semana 4

Barrido_16_09_2000_3:09:26

16-sept.-2000 04:00 a. m.

Nombre del método: Barrido 16-sept.-2000

Método creado: 16-sept.-2000 03:09 a. m.

Método actualizado: 16-sept.-2000 03:09 a. m.

N.º serie del instrumento: 9A5X354048

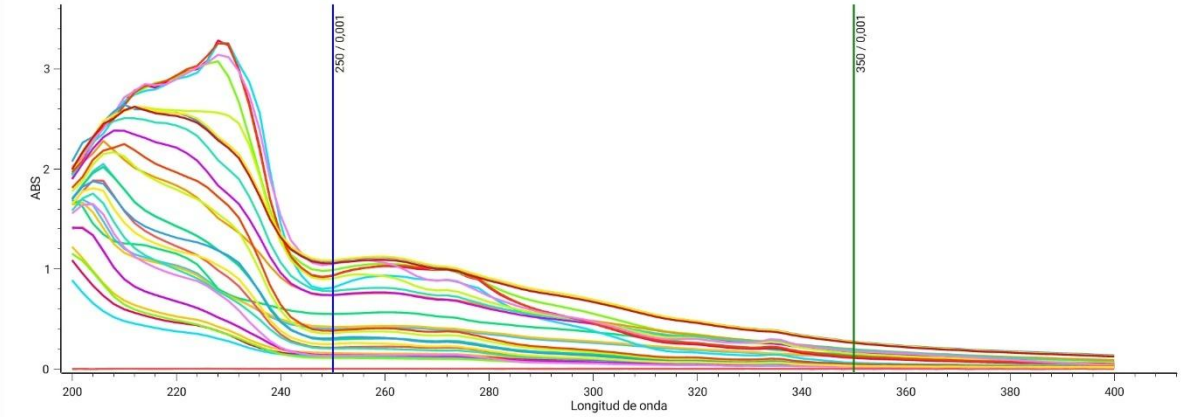
Modelo instrumento: GENESYS 150

Versión de paquete de software: 2.3

Firma:

Barrido:parámetros de método

Intervalo de longitudes de	**200 - 400 nm**
Intervalo	**2,0 nm**
Velocidad	**Rápida**



Ejemplo	ABS(250)	ABS(350)
Ejemplo 1	0,001	0,001
tierra a+t 1	0,401	0,119
tierra a+t 2	0,549	0,141
tierra a+t 3	0,422	0,122
tierra sap 40% 1	0,932	0,110
tierra sap 40% 2	0,811	0,062
tierra sap 40% 3	0,987	0,179
tierra sap 60% 1	0,740	0,198
tierra sap 60% 2	0,738	0,171
tierra sap 60% 3	0,778	0,193
tierra t 80 1	0,904	0,153
tierra t 80 2	0,934	0,125
tierra t 80 3	1,048	0,175
tierra a +t+p 1	1,078	0,273

Barrido_16_09_2000_3:09:26

16-sept.-2000 04:00 a. m.

Nombre del método: Barrido 16-sept.-2000

Método creado: 16-sept.-2000 03:09 a. m.

Método actualizado: 16-sept.-2000 03:09 a. m.

N.º serie del instrumento: 9A5X354048

Modelo instrumento: GENESYS 150

Versión de paquete de software: 2.3

Firma:

Ejemplo	ABS(250)	ABS(350)
tierra a +t+p 2	1,085	0,269
tierra a +t+p 3	1,056	0,260
agua a +t + p 1	0,213	0,037
agua a +t+ p 2	0,293	0,047
agua a +t+p 3	0,293	0,047
agua a +t 1	0,160	0,044
agua a + t 2	0,137	0,037
agua a + t 3	0,126	0,035
agua sap 40 % 1	0,110	0,025
agua sap 40 % 2	0,138	0,025
agua sap 40 % 3	0,138	0,026
agua sap 60 % 1	0,203	0,031
agua sap 60 % 2	0,357	0,042
agua sap 60 % 3	0,382	0,047
agua sap t 80 1	0,132	0,021
agua sap t 80 2	0,307	0,034
agua sap t 80 3	0,249	0,032

Anexo 7. Panel Fotográfico.

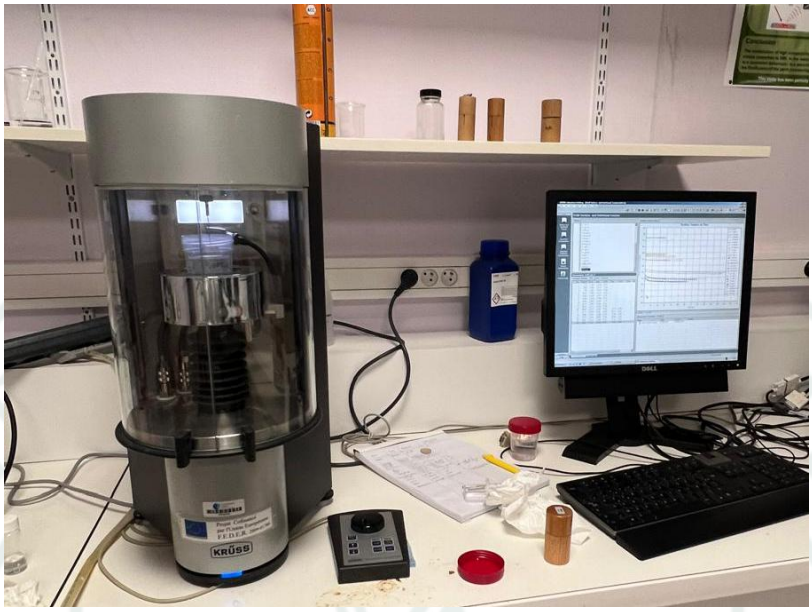


Figura 19. Tensiómetro de fuerza Kruss K-100

Figura 20. Sistema PIT-Slope

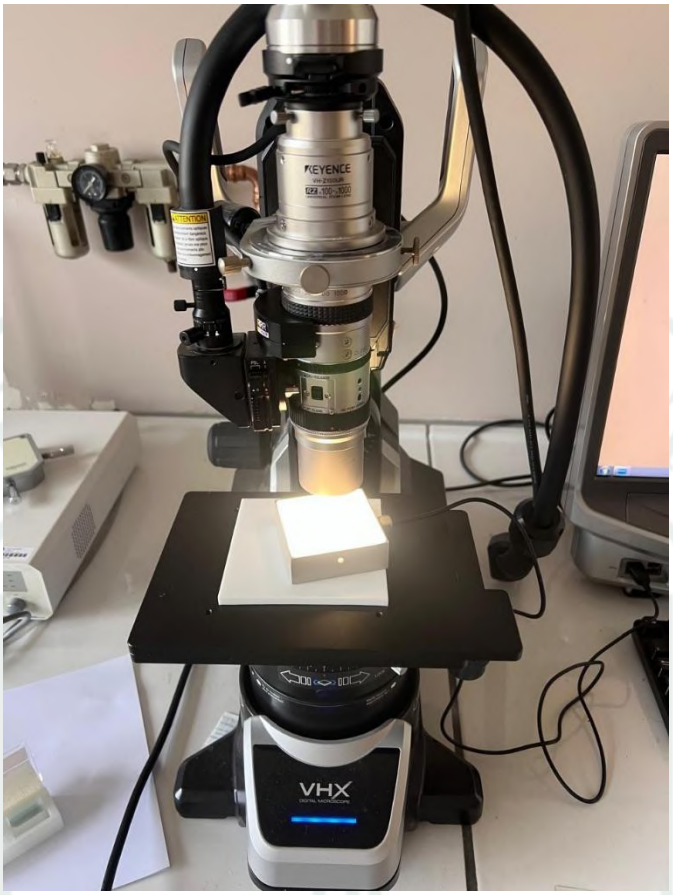


Figura 21. Microscopio electrónico.

Figura 22. Tamizado de tierra agrícola.

Figura 23. Contaminación de tierra con hidrocarburo.

Figura 24. Pesado de tierra y saponinas.

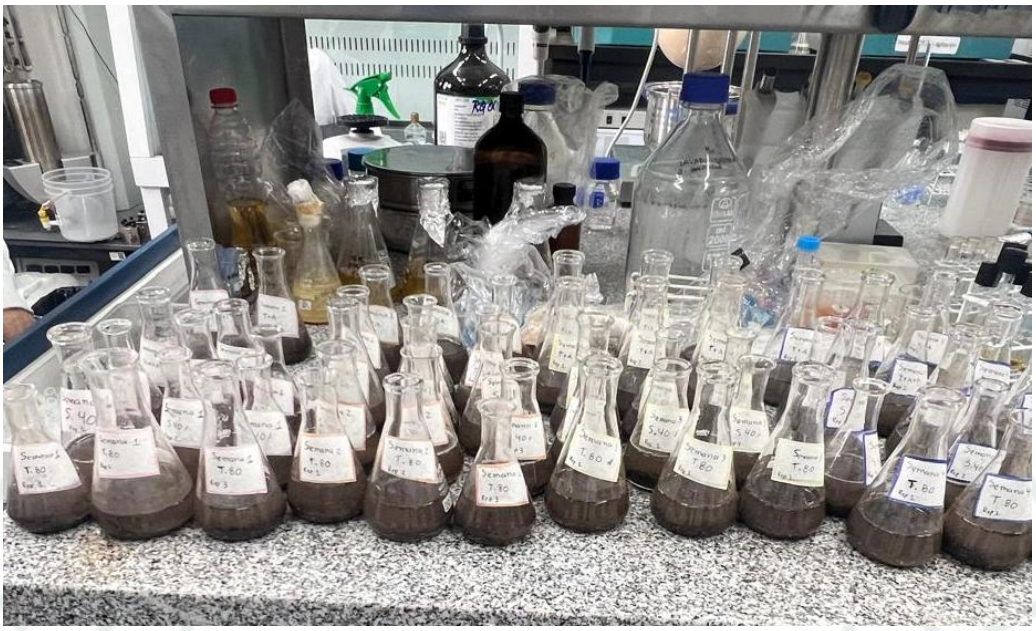


Figura 25. Diseño experimental con los 60 sistemas de ensayo.

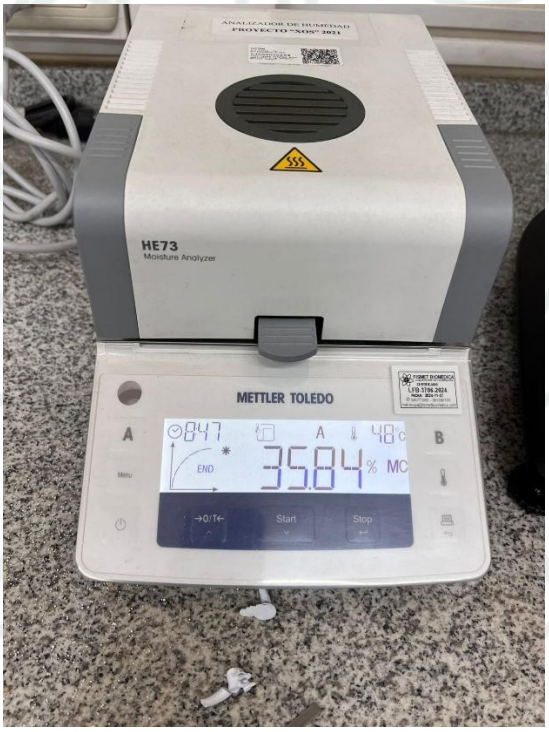


Figura 26. Medición de la Humedad de tierras

Figura 27. Centrifugación de fase acuosa.

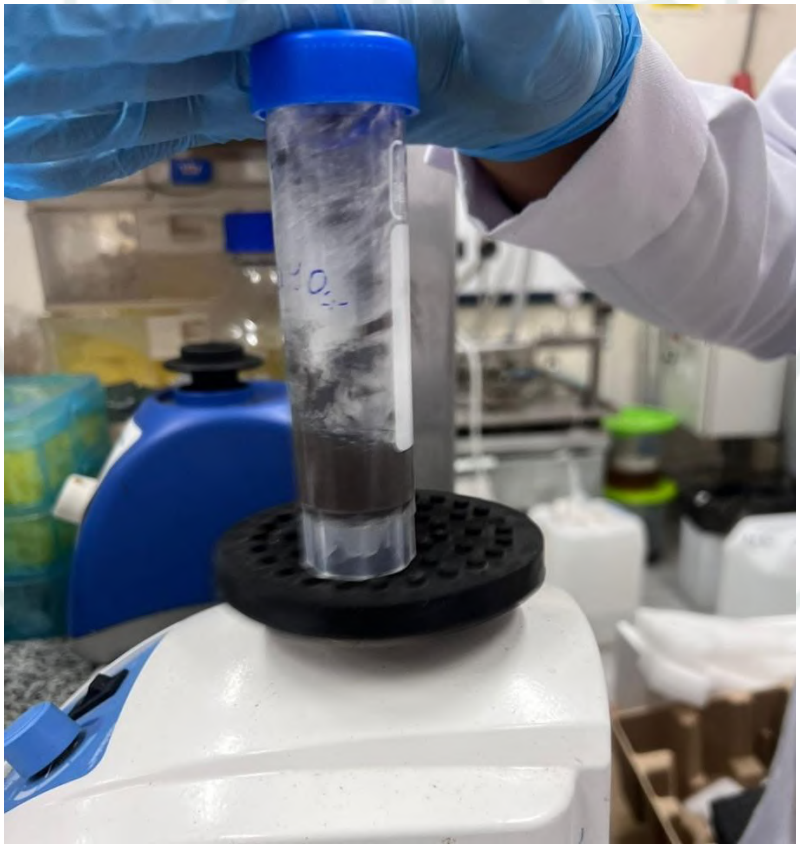


Figura 28. Fase de tierra Sometida a Votex.

Figura 29. Filtración con 4 capas de gaza.

Figura 30. Pesado de tierra filtrada para Conteo microbiano.

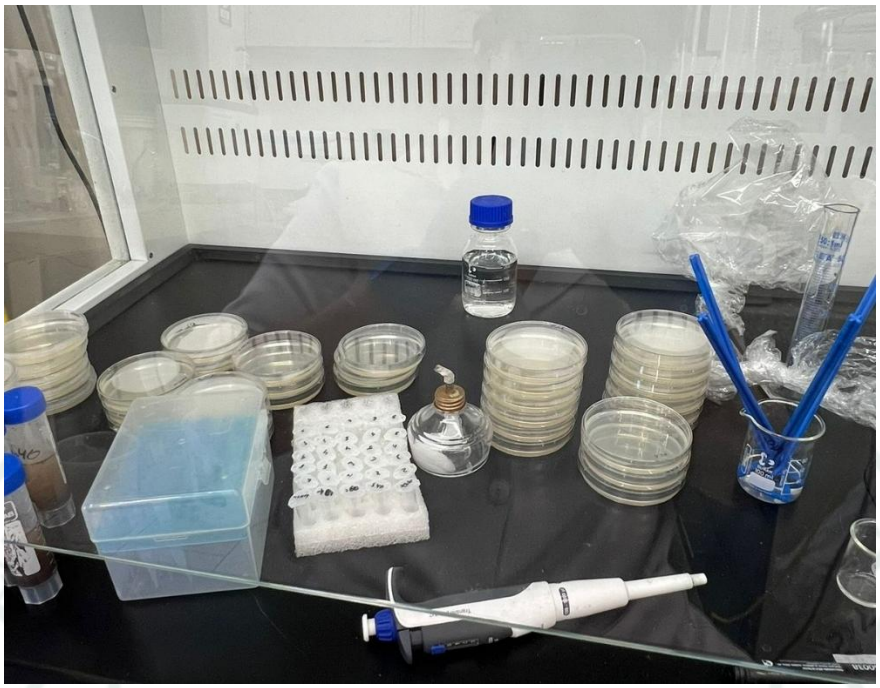


Figura 31. Análisis de tierra para conteo microbiano**.**