

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIÓLOGO

“Degradación del Colorante Textil Azul Índigo de Agua Artificialmente Contaminada por las Enzimas Peroxidasas y Lacasas de Diferentes Vegetales”

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO
P R E S E N T A:**

JUAN ARTEMIO HERNÁNDEZ PÉREZ

**DIRECTORA:
DRA. LEONORA SÁNCHEZ GARCÍA-FIGUEROA**



2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**, por su apoyo decidido, generoso y desinteresado durante mis estudios de licenciatura y desde luego en muchas otras ocasiones a través de sus múltiples instancias.

A la **FACULTAD DE ESTUDIOS SUPEROPRES ZARAGOZA** por ser tan generosa y darme todos los medios necesario para poder terminar con mis estudios de licenciatura.

A todo el comité tutorial

BIÓL. MARÍA DE LOS ÁNGELES GALVÁN VILLANUEVA
Q. MARTHA ORTIZ ROJAS
BIÓL. LETICIA LÓPEZ VICENTE
BIÓL. ANA LAURA MALDONADO TENA

Por haber revisado mi tesis de licenciatura y aportado su valioso conocimiento

DRA. LEONORA FRANCISCA SÁNCHEZ GARCÍA-FIGUEROA

Debo agradecerle de manera sincera los conocimientos que compartió conmigo, en especial su valioso tiempo que invirtió en mí, y sobre todo la paciencia y apoyo en la dirección de este trabajo.

DEDICATORIAS

CANDELARIA PÉREZ RIVERA

Te dedico este trabajo ya que gracias a tu apoyo, cuidado y consejos he podido abrirme camino y llegar hasta esta etapa en mi vida. Gracias por ser mi Madre. T.A.

Mi familia

A todos mis hermanos y hermanas por el apoyo que me brindan, por ser tan unidos y sobre todo por la gran confianza que existe entre todos nosotros. Gracias por permitirme formar parte de cada uno de ustedes.

Mis Amigos

Estoy muy agradecido por conocer a cada uno de ustedes, por haber compartido juntos esta generación y por compartir sus grandes virtudes de las cuales he aprendido mucho... Saraí V., Sergio E., Miguel C., Eduardo O., Mario S., Alfonso N., Daniel Josué C., Marco Rodrigo A., Carlos C., Ricardo Geovanni H., Mario C., Miguel O., y todos los demás Maik 's.

Sandra Vergara Salgado

Por compartir y dedicar tu valioso tiempo en estos momentos de mi vida, por ese gran apoyo y seguridad que me brindas, muchas gracias.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
I. Marco Teórico	4
1. Biorremediación	4
1.1. Remediación microbiana	5
1.2. Degradación enzimática	5
1.3. Remediación con plantas (fitorremediación)	6
2. Enzimas vegetales	7
2.1. Lacasas	7
2.1.1. Actividad enzimática de la lacasa	8
2.1.2. Importancia de las Lacasas	8
2.2. Peroxidasas vegetales	9
2.2.1. Actividad enzimática de la peroxidasa	9
2.2.2. Importancia de las peroxidasas vegetales	10
3. Aguas residuales e industriales	11
3.1. Los colorantes artificiales	12
3.2. Colorante índigo carmín	13
II. Problemática y Justificación	15
1. Problemática	15

2. Justificación	17
III. Hipótesis y Objetivos	19
1. Hipótesis	19
2. Objetivos generales	19
3. Objetivos particulares	19
IV. Material y Metodología	20
1. Trabajo de campo	20
1.1. Obtención del material biológico	20
2. Trabajo de laboratorio	20
2.1. Preparación del material vegetal	20
2.1.1. Preparación del extracto concentrado	21
2.1.2. Preparación del extracto diluido	21
2.1.3. Preparación del extracto diluido directamente con la solución problema	21
2.1.4. Obtención de bagazo	21
2.2. Preparación de la solución artificialmente contaminada a diferentes concentraciones	22
2.3. Determinación de la actividad enzimática	22
2.3.1. Actividad peroxidasa	22
2.3.2. Actividad lacasa	23
2.4. Biorremediación	24
2.4.1. Extracto concentrado con diferentes concentraciones	24

de índigo carmín	
2.4.2. Biorremediación con bagazo	25
2.4.3. Extracto concentrado y bagazo con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno	26
2.4.4. Extracto diluido y extracto diluido directamente con la solución problema a diferentes concentraciones (monitoreo de pH)	27
2.4.5. Extracto concentrado con diferentes valores de pH	28
2.5. Lecturas de las muestras de biorremediación	29
2.6. Búsqueda de ácido antranílico	29
3. Trabajo de gabinete	30
4. Diagrama de flujo general	31
V. Resultados	32
1. Determinación de la actividad enzimática	32
1.1. Actividad peroxidasa	32
1.2. Actividad lacasa	33
2. Extracto concentrado con diferentes concentraciones de índigo carmín	34
3. Biorremediación con bagazo	37
4. Extracto concentrado y bagazo con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno	39
5. Extracto diluido y extracto diluido directamente con la solución problema a diferentes concentraciones (monitoreo de pH)	44

6. Extracto concentrado con diferentes valores de pH	50
7. Búsqueda de ácido antranílico	51
VI. Análisis de Resultados	55
VII. Conclusiones	58
VIII. Recomendaciones	59
Bibliografía	60
Anexo	66

ÍNDICE DE GRÁFICAS

No. De Gráfica	Resultados	Páginas
1	Actividad peroxidasa	32
2	Actividad lacasa	33
3 - 6	Extracto concentrado con diferentes concentraciones de índigo carmín	34 - 36
7	Biorremediación con bagazo	37
8 - 14	Extracto concentrado y bagazo con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno	39 – 43
15 - 20	Extracto diluido y extracto diluido directamente con la solución problema a diferentes concentraciones (monitoreo de pH)	44 – 49
21	Extracto concentrado con diferentes valores de pH	50
22	Búsqueda de ácido antranílico	51
23	Curva estándar para la cuantificación del Índigo Carmín	67
24	Curva estándar para la cuantificación del ácido antranílico	67

ÍNDICE DE FIGURAS

No. De Figura	Resultados	Página
1	Ecuación en la cual se observa la reacción entre 4 moléculas de guayacol y 4 moléculas de peróxido de hidrógeno, gracias a la catálisis de la peroxidasa se obtiene un producto de tetraguayacol y 8 moles de agua.	10
2	Estructura molecular del índigo carmín.	14
3	Estructuras químicas de diferentes colorantes textiles.	16
4	Productos primarios en la degradación del colorante índigo carmín según Ramya y Colaboradores (2007).	18
5	Vegetal preparado para realizar la extracción.	20
6	Obtención del extracto enzimático diluido (izquierda) y el bagazo vegetal (derecha).	21
7	Solución de Índigo Carmín a 1000 ppm.	22
8	Peso del Bagazo vegetal para las muestras de biodegradación.	25
9	Bagazo de los vegetales en matraz erlenmeyer de 125 ml para las muestras de biodegradación.	25
10	Muestras preparadas para la biodegradación del bagazo de los vegetales tallo de flor de calabaza y tallo de brócoli.	25
11	Muestra del bagazo de brócoli con una tinción rojiza.	38
12	Muestras en proceso de biodegradación.	38
13	Muestras del bagazo de brócoli y de la muestra control después de 24 h de biodegradación.	38

14	Muestras con extracto diluido de la cáscara de tomate verde, cáscara de melón y tallo de brócoli después de 48 h de biodegradación comparadas con la muestra control de índigo carmín.	45
15	Muestras con extracto diluido directamente con la solución problema de la cáscara de melón y tallo de brócoli después de 48 h de biodegradación comparadas con la muestra control.	46
16	Cromatografía de las muestras extraídas con éter, reveladas con la lámpara de cromatografía en el modo de longitud larga.	52
17	Cromatografía de las muestras extraídas con éter, sin revelar.	52
18	Cromatografía aplicada a las muestras sin tratamiento de extracción.	53
19	Cromatografía en placa fina del extracto diluido del tallo de brócoli (2) y ácido antranílico (1) corrida con acetato de etilo.	54

RESUMEN

La fitorremediación es el uso de plantas para limpiar ambientes contaminados. Aunque se encuentra en desarrollo, constituye una alternativa muy interesante, debido a la capacidad que tienen algunas especies vegetales de absorber, acumular y/o tolerar altas concentraciones de contaminantes como metales pesados, compuestos orgánicos y radioactivos.

El carácter de las enzimas y los sistemas de enzimas en los microorganismos que son adecuados para la descomposición de los colorantes ha sido ampliamente investigado. El esfuerzo se ha dedicado a la separación, el aislamiento y estudio de estas enzimas. Un conocimiento exacto de los procesos enzimáticos que rigen la descomposición de los colorantes es importante para la protección del medio ambiente desde un punto de vista teórico y práctico.

Las peroxidasas contenidas en el tejido vegetal median el acoplamiento oxidativo de contaminantes fenólicos, seguido por la precipitación de los polímeros formados en el medio acuoso. La lacasa (p-difenol:dioxígeno:oxido-reductasa), es una enzima la cual usa al oxígeno molecular como oxidante (Bourbonnais y Piacce, 1990).

El objetivo de este trabajo es biodegradar el colorante índigo carmín en aguas contaminadas utilizando las enzimas lacasa y peroxidasa presentes en el tallo de brócoli (*Brassica oleracea* L.), cáscara de rábano (*Raphanus sativus* L.), cáscara de tomate verde (*Physalis ixocarpa* Brot.), espinaca (*Spinacia oleracea* L.), tallo de flor de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) y lirio acuático (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms). Se utilizó el extracto de cada vegetal y su bagazo en diferentes condiciones (con adición y sin adición de peróxido de hidrógeno, a diferente pH, a diferente concentración de colorante en las aguas contaminadas artificialmente), se determinó la actividad lacasa y peroxidasa de cada vegetal, la biodegradación se monitoreó por espectrofotometría, también se realizó la identificación de ácido antranílico en muestras específicas.

Se comprobó la biodegradación del colorante textil índigo carmín con el uso de diferentes formas de extractos vegetales que contienen enzimas peroxidasa y lacasa en sus tejidos. El pH 7 es el más adecuado para realizar las biorremediaciones para el extracto concentrado del tallo de flor de calabaza y el extracto concentrado del tallo de brócoli. El tallo, la raíz, hoja de espinaca y la hoja de lirio acuático fueron los vegetales que presentaron mejor actividad lacasa y el tallo de brócoli y el tallo de flor de calabaza fueron los vegetales con mejores registros de actividad peroxidasa. Se comprobó la existencia de ácido antranílico en la biodegradación del índigo carmín por medio de la aplicación de una cromatografía en capa fina.

INTRODUCCIÓN

Los colorantes sintéticos se utilizan ampliamente en muchos campos de la tecnología hasta la fecha, por ejemplo, en las diversas ramas de la industria textil como de la industria de curtidos en la producción de papel, en tecnología de alimentos, en la investigación de productos agrícolas, en las células fotoelectroquímicas, y en colorantes para el cabello. Por otra parte, los colorantes sintéticos se han empleado para el control de la eficacia del tratamiento de aguas residuales, para el seguimiento de la determinación de la superficie específica de lodos activados de las aguas subterráneas, etc. Los colorantes sintéticos presentan una considerable diversidad estructural. Los colorantes empleados con mayor frecuencia a escala industrial son los azoicos, antraquinona, azufre, indigoides, de trifenilmetilo (tritulo), y derivados de ftalocianina. Sin embargo, hay que subrayar que la inmensa mayoría de los colorantes sintéticos actualmente utilizados en la industria son derivados azoicos. Cabe señalar que los equilibrios de hidracina azo-keto puede ser un factor vital en la distribución fácil de muchos de los sistema de colorantes azoicos (Forgacs, *et.al.*, 2004).

Desafortunadamente, la cantidad exacta de los colorantes producidos en el mundo no se conoce, se estima que más de 10.000 toneladas por año. Datos exactos sobre la cantidad de colorantes vertidas en el medio ambiente tampoco están disponibles. Se supone que hay una pérdida de 1-2% en la producción de colorantes y de 1-10% en el uso de los mismos. Debido a la producción a gran escala y de amplia aplicación, los colorantes sintéticos pueden provocar contaminación ambiental y son factores importantes de graves riesgos para la salud. Si bien, el creciente impacto de la protección del medio ambiente en el desarrollo industrial promueve el desarrollo de tecnologías ecológicamente amigables como el consumo reducido de agua dulce y una disminución en la concentración de contaminantes de las aguas residuales, la emisión de cantidades importantes de los colorantes sintéticos para el medio ambiente es motivo de preocupación pública y los problemas de la legislación son un serio desafío a los científicos del medio ambiente. Debido a su importancia comercial, el impacto y la toxicidad de los colorantes que se liberan en el medio ambiente han sido ampliamente estudiados. La formación de una amina carcinógena del colorante azul directo 14 por bacterias de la piel humana y la actividad anti fúngica de colorantes diazobenzeno 13 han sido establecidas. Como varios miles de diferentes colorantes sintéticos que se emplean, exhiben diversas actividades biológicas, es comprensible que nuestro conocimiento sobre su conducta en el medio ambiente y los peligros para la salud que entraña su uso es aún incompleto (Forgacs, *et.al.*, 2004).

Las tecnologías tradicionales de tratamiento de aguas residuales han demostrado ser notablemente ineficaces para el tratamiento de aguas residuales de colorantes textiles sintéticos debido a la estabilidad química de estos contaminantes.

Una alternativa interesante es el empleo de las peroxidasas y lacasas encontradas en distintos vegetales para la degradación de dichos colorantes textiles.

Enzimas como lignin peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasas han estado relacionadas con la decoloración de colorantes. Las enzimas pueden actuar sobre contaminantes recalcitrantes específicos para ser removidos por precipitación o transformación de estos a productos inocuos. La degradación oxidativa de compuestos coloreados es significativamente estimulada a través del uso de enzimas oxidativas (Ulson de Souza y Forgiarini, 2007).

La peroxidasa del rábano europeo se ha usado en muchos estudios para la remoción de compuestos fenólicos de medios acuosos; actualmente no se aplica a escala industrial, debido principalmente al alto costo del tratamiento enzimático (Dec y Bollag, 1994).

El propósito del estudio fue el de examinar la aplicación de las peroxidasas y lacasa de varios materiales vegetales (cáscara de rábano, cáscara de tomate verde, tallo de brócoli, tallo de flor de calabaza, espinaca y lirio acuático) utilizando su extracto de forma concentrada y diluida para la biodegradación del colorante sintético industrial índigo carmín en medio acuoso con diversas condiciones como pH del medio y agregando peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones.

I. MARCO TEÓRICO

1. BIORREMEDIACIÓN

El crecimiento de la población y el avance de las actividades industriales a partir del siglo XIX trajeron aparejados serios problemas de contaminación ambiental. Desde entonces, los países generan más desperdicios, muchos de ellos no biodegradables o que se degradan muy lentamente en la naturaleza, lo que provoca su acumulación en el ambiente sin tener un destino seguro o un tratamiento adecuado. De este modo, en lugares donde no existe control sobre la emisión y el tratamiento de los desechos, es factible encontrar una amplia gama de contaminantes. Habitualmente, los casos de contaminación que reciben mayor atención en la prensa son los derrames de petróleo.

Actualmente, se hacen esfuerzos en muchos países para controlar la liberación de contaminantes y para acelerar la descomposición de los existentes por medio de técnicas apropiadas de remediación. Por ejemplo, existen métodos ex-situ para la remediación de cuerpos de agua en los que se incluye la extracción de los contaminantes por medio de la adsorción del carbón activado, el tratamiento con microorganismos como bacterias y hongos y la extracción de contaminantes del aire por medio de filtros especializados. En cuanto a los métodos in-situ suponen pruebas de actividad microbiana aeróbica y anaeróbica en el acuífero. Todas estas técnicas involucran relativamente un gran gasto de capital y personal así como también altos costos de operaciones.

En las últimas décadas, entre las técnicas empleadas para contrarrestar los efectos de los contaminantes, se comenzó a utilizar una práctica llamada biorremediación. El término biorremediación fue acuñado a principios de la década de los '80, y proviene del concepto de *remediación*, que hace referencia a la aplicación de estrategias físico-químicas para evitar el daño y la contaminación en suelos. Los científicos se dieron cuenta que era posible aplicar estrategias de remediación que fuesen biológicas, basadas esencialmente en la observación de la capacidad de los microorganismos de degradar en forma natural ciertos compuestos contaminantes.

Entonces, la biorremediación surge como una rama de la biotecnología que busca resolver los problemas de contaminación mediante el uso de seres vivos (microorganismos y plantas) capaces de degradar compuestos que provocan desequilibrio en el medio ambiente, ya sea suelo, sedimento, fango o mar.

En los procesos de biorremediación generalmente se emplean mezclas de ciertos microorganismos o plantas capaces de degradar o acumular sustancias contaminantes tales como metales pesados y compuestos orgánicos derivados de petróleo o sintéticos. Básicamente, los procesos de biorremediación pueden ser de tres tipos:

1.1. Remediación microbiana

En este tipo de remediación se usan microorganismos directamente en el foco de la contaminación. Los microorganismos utilizados en biorremediación pueden ser los ya existentes (autóctonos) en el sitio contaminado o pueden provenir de otros ecosistemas, en cuyo caso deben ser agregados o inoculados. La descontaminación se produce debido a la capacidad natural que tienen ciertos organismos de transformar moléculas en sustancias más pequeñas, que resultan menos tóxicas. El hombre ha aprendido a aprovechar estos procesos metabólicos de los microorganismos. De esta forma, los microorganismos que pueden degradar compuestos tóxicos para el ambiente y convertirlos en compuestos inocuos o menos tóxicos, se aprovechan en el proceso de biorremediación. De esta forma, reducen la polución de los sistemas acuáticos y terrestres. La gran diversidad de microorganismos existente ofrece muchos recursos para limpiar el medio ambiente y, en la actualidad, esta área está siendo objeto de intensa investigación.

Existen, por ejemplo, bacterias y hongos que pueden degradar con relativa facilidad petróleo y sus derivados, benceno, tolueno, acetona, pesticidas, herbicidas, éteres, alcoholes simples, entre otros. Los metales pesados como uranio, cadmio y mercurio no son biodegradables, pero las bacterias pueden concentrarlos de tal modo que se puedan aislar para que sean eliminados más fácilmente.

1.2. Degradación enzimática

Este tipo de degradación consiste en el empleo de enzimas en el sitio contaminado con el fin de degradar las sustancias nocivas. Estas enzimas se obtienen en cantidades industriales por bacterias que las producen naturalmente, o por bacterias modificadas genéticamente que son comercializadas por las empresas biotecnológicas.

Por ejemplo, existe un amplio número de industrias de procesamiento de alimentos que producen residuos que necesariamente deben ser posteriormente tratados. En estos casos, se aplican grupos de enzimas que hidrolizan polímeros complejos para luego terminar de degradarlos con el uso de microorganismos. Un ejemplo lo constituyen las enzimas lipasas (que degradan lípidos) que se usan junto a cultivos bacterianos para eliminar los depósitos de grasa procedentes de las paredes de las tuberías que transportan los efluentes.

Otras enzimas que rompen polímeros utilizados de forma similar son las celulasas, proteinasas y amilasas, que degradan celulosa, proteínas y almidón, respectivamente.

Existen enzimas capaces de degradar compuestos altamente tóxicos. Estas enzimas son utilizadas en tratamientos en donde los microorganismos no pueden desarrollarse debido a la alta toxicidad de los contaminantes. Por ejemplo, se emplea la enzima peroxidasa

para iniciar la degradación de fenoles y aminas aromáticas presentes en aguas residuales de muchas industrias.

1.3. Remediación con plantas (fitorremediación)

La idea básica de utilizar a las plantas como remedio para el ambiente es muy antigua y no se puede citar alguna fuente en particular, sin embargo a lo largo del tiempo, varios científicos trabajando interdisciplinariamente con otros investigadores han desarrollado estas técnicas haciéndolas una tecnología ambiental muy prometedora.

La fitorremediación es una tecnología emergente que utiliza a las plantas que en ocasiones se asocian a microorganismos para remover, transformar o contener tóxicos químicos localizados en el suelo, sedimentos, cuerpos de agua, superficie del agua, y hasta en la atmósfera, se define como el uso de plantas verdes para remover contaminantes del ambiente de una manera inofensiva. En la actualidad la fitorremediación es objeto de una gran cantidad de publicaciones e interés científico y un tema de muchos estudios recientes (Raskin, *et.al.*, 1997).

Se está trabajando para desarrollar técnicas más económicas y efectivas con el fin de tratar grandes volúmenes de las fuentes naturales contaminadas. Esto conduce indudablemente a la búsqueda de nuevas técnicas de remediación, como la fitorremediación. Actualmente la fitorremediación es usada para tratar muchas clases de contaminantes incluyendo hidrocarburos petroleros, disolventes clorados, pesticidas, explosivos, metales pesados y radionúclidos y filtros de tiraderos. En muchos proyectos de remediación, la fitorremediación es vista como el paso final de limpieza, siguiendo al tratamiento inicial de alto nivel de contaminación. De cualquier manera cuando los contaminantes no son muy abundantes, la fitorremediación es quizá la estrategia de remediación más efectiva y económica (McCutcheon, *et.al.*, 2002).

Existen factores que afectan la distribución y absorción química dentro de las plantas vivas, algunos de ellos son:

- Las propiedades físicas y químicas del compuesto (solubilidad en agua, presión de vapor, peso molecular el coeficiente de partición octanol-agua).
- Características del ambiente (temperatura, pH, materia orgánica).
- Características de la planta (tipo del sistema de raíces y el tipo de enzimas).

Algunos de los mecanismos usados por las plantas para facilitar la remediación incluyen la fitoextracción, fitobombeo, fitoestabilización, fitotransformación/degradación, fitovolatilización y rizodegradación.

2. ENZIMAS VEGETALES

Un contaminante puede ser eliminado vía fitodegradación o fitotransformación por medio de las enzimas de la planta o co-factores enzimáticos. Dec y Bollag (1994) describen plantas que pueden eliminar el efecto tóxico de los anillos aromáticos en la ausencia de microorganismos, como por ejemplo la polimerización de compuestos fenólicos por plantas como el rábano picante (*Cochlearia armoracia*), papa (*Solanum tuberosum*) y el rábano blanco (*Raphanus sativus*) que contienen peroxidasas. El árbol del álamo (*Populus spp.*) es capaz de transformar tricloroetileno encontrado en suelos y cuerpos de agua (Bhunja, *et.al.*, 2000).

Algunas enzimas de particular interés para la fitorremediación incluyen a:

- Dehalogenasa (Transformación de compuestos clorados)
- Peroxidasa (Transformación de compuestos fenólicos y azo)
- Nitroreductasa (Transformación de explosivos y de otros compuestos nitrados)
- Nitrilasa (Transformación de compuestos ciano-aromáticos)
- Fosfatasa (Transformación de pesticidas organofosfatados)
- Laccasa (Transformación de compuestos azo, clorados y fenólicos)

2.1. Lacasas

Las lacasas (benzenodiol: oxidoreductasa del oxígeno, EC 1.10.3.2) son oxidasas que contienen cobre y que catalizan la reducción de oxígeno molecular a agua, sin pasar por una etapa de la producción de peróxido de hidrógeno. Han sido detectadas en muchas plantas y son secretadas por numerosos hongos, que catalizan la oxidación de una serie de sustancias aromáticas muy diferentes (difenoles, monofenoles metoxi-sustituidos, aminas aromáticas) con oxígeno como aceptor final de electrones (Thurston, 1994; Leonowicz, *et.al.*, 2001).

Estas enzimas se identificaron por primera vez en *Vernicifera rhus*, el árbol de la laca japonesa, y se encuentran distribuidos entre plantas y hongos (Hatakka, 1994; Mayer, 1987).

La especificidad de sustrato de las lacasas es también muy interesante debido a su capacidad de catalizar la oxidación de una amplia variedad de materias orgánicas (especialmente aromáticos) y compuestos inorgánicos (Reinhammar y Malstrom, 1981; Morozova, *et.al.*, 2007). Las lacasas de hongos, además de estar relacionados con diferentes procesos fisiológicos (Thurston, 1994), están involucrados en la degradación de la lignina abarcando también con peroxidasa de lignina (LIP) y manganeso peroxidasa (MnP) (Hatakka, 1994).

2.1.1. Actividad enzimática de la lacasa

La actividad lacasa comúnmente se determina por espectrofotometría basada en la capacidad de esta enzima para oxidar-colorear, los compuestos aromáticos tales como guayacol, siringaldazina, o 2,6 - dimetoxifenol (2,6-DMP) (Warushi, *et.al.*, 1992; Harkin y Obst, 1973) uno de los sustratos más comúnmente utilizado es el compuesto rico en electrones no fenólicos 2-2'-azinobis (ácido 3-etilbenztiazolina-6-sulfónico) (ABTS), porque en contraste con la sustratos fenólicos que forman quinonas, el potencial de oxidación de ABTS no depende del pH dentro del rango de 2-11 para proceder en un solo paso (Wolfenden, y Willson, 1982; Hünig, *et.al.*, 1964).

La oxidación de ABTS por la lacasa, produce una coloración de un verde-azul, medible a 436 nm. La mezcla de reacción por lo general consta de tampón de acetato en torno a un pH de 5, ABTS como sustrato (10 mM de concentración final), y el medio extracelular de hongos que contienen la actividad lacasa a medir (Terrón, *et.al.*, 2004).

En base al método espectrofotométrico de Li y colaboradores (1998), se medirá la actividad enzimática de la lacasa, el cual consiste en emplear ABTS como sustrato, midiendo el incremento de la absorbancia a 414 nm y usando un coeficiente de extinción molar de $36\ 000\ \text{mM}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$. Una unidad de lacasa (U) es la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de ABTS oxidado en un minuto. (Warushi, *et.al.*, 1992; Wolfenden y Willson, 1982).

2.1.2. Importancia de las lacasas

Las lacasas de algunos hongos basidiomicetes han demostrado ser eficaces en la oxidación de una serie de contaminantes, así como fenoles tóxicos de bajo peso molecular (Casa, *et.al.*, 2003), colorantes industriales (Abalulla, *et.al.*, 2000), clorofenoles (Ullah, *et.al.*, 2000), junto con el antraceno, fenantreno y otros hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Pickard, *et.al.*, 1999; Johannes y Majcherczyk, 2000).

La especificidad de sustrato bastante amplia de las lacasas fúngicas ha generado un mayor interés en una variedad de diferentes aplicaciones biotecnológicas para esta metaloenzima. Las lacasas actualmente se utilizan en la deslignificación de pasta, el blanqueado de colorantes textiles, la biorremediación de efluentes, además de ser utilizados en los detergentes y en biosensores, entre otras aplicaciones (Bauer, *et.al.*, 1999; Mayer y Staples, 2002).

2.2. Peroxidasas vegetales

Las enzimas peroxidasas (EC 1.11.1.7) están ampliamente distribuidas en animales, plantas y microorganismos, presentan múltiples formas isoenzimáticas que difieren tanto en la secuencia de sus aminoácidos como en sus propiedades químicas (Grambow, 1986). Los resultados de numerosos estudios realizados con diferentes especies, determinaron que las peroxidasas están involucradas en procesos fisiológicos relevantes de las plantas superiores tales como lignificación (Gaspar, *et.al.*, 1982), catabolismo de auxinas (Grambow, 1986), resistencia a patógenos (Reuvini, *et.al.*, 1992), así como en diversos mecanismos de respuesta que éstas presentan a diferentes situaciones de estrés (Tarrago, *et.al.*, 2003).

Las peroxidasas vegetales son enzimas que catalizan la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el poder oxidante del peróxido de hidrógeno, se utilizan ampliamente en bioquímica clínica; así los ensayos para la determinación y cuantificación de metabolitos como glucosa, ácido úrico, colesterol o triglicéridos en fluidos biológicos usan peroxidasa como enzima acoplada. También se utilizan las peroxidasas en inmunoensayos para la detección de virus tan conocidos como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) causante del SIDA o el virus del herpes. Las peroxidasas también se utilizan como biocatalizador para la generación de productos de interés biotecnológico e industrial como resinas fenólicas, adhesivos, antioxidantes, antiestáticos y protectores de radiación magnética, colorantes alimentarios y componentes bioactivos de detergentes.

Para extraer las enzimas de las células que las contienen, es necesario dividir finamente el tejido, por medio de un homogeneizador o una licuadora; los tratamientos más enérgicos comprenden la molienda del tejido con arena, el empleo de vibraciones ultrasónicas, los procesos alternados de congelamiento y descongelamiento, la autólisis, el desecado con calor o el empleo de solventes como la acetona, el éter y el tolueno. El desecado con acetona y la producción de los llamados polvos acetónicos constituyen un excelente ejemplo de rotura de la membrana celular y la obtención de un material rico en enzimas y de fácil conservación (Laguna, 1996).

2.2.1. Actividad enzimática de la peroxidasa

La peroxidasa es una hemoproteína (presenta como grupo prostético un grupo Hem) que cataliza la oxidación de compuestos dadores de hidrógeno, como o-fenilendiamina (aminas aromáticas), guayacol y pirogalol (fenoles) por medio de peróxidos (de ahí el nombre peroxidasa). El guayacol es el sustrato oxidable más usado para determinar la actividad de ésta enzima (figura 1), dicho sustrato es oxidado a un complejo coloreado de tetraguayacol (color rojo ladrillo) en presencia de peroxidasa, la velocidad de formación de coloración, es utilizada como medida de la actividad enzimática por lecturas espectrofotométricas de las absorbancias en relación con el tiempo (Fernández, *et.al.*, 2003; Pérez, *et.al.*, 2004; Santos de Araujo, *et.al.*, 2006).

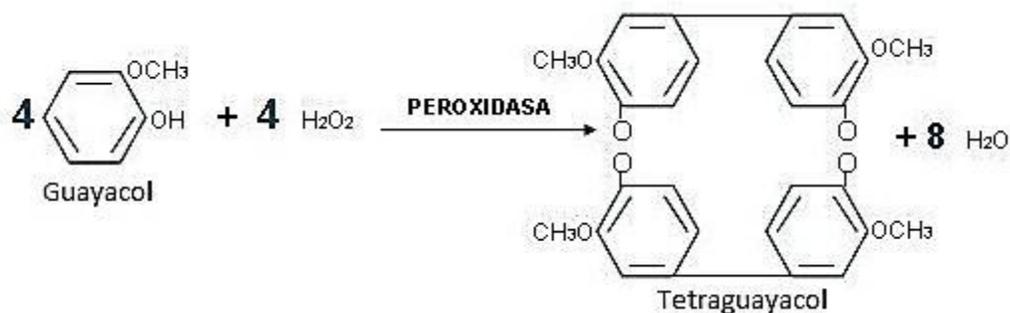


Figura 1. Reacción en la cual se observa la reacción entre 4 moléculas de guayacol y 4 moléculas de peróxido de hidrógeno, gracias a la catálisis de la peroxidasa se obtiene un producto de tetraguayacol y 8 moles de agua.

La actividad enzimática depende del vegetal (los rábanos picantes son especialmente activos), del sustrato oxidable que se emplea como reactivo y del pH y temperatura a que se trabaja (Duran y Esposito, 2000; Karam y Nicell, 1997). Tratándose del vegetal depende del tipo de suelo donde fue cultivado, el pH del suelo, el tipo de agua de riego, condiciones ambientales donde se sembró (clima), etc.

Las peroxidasas precisan de una mayor temperatura y más tiempo para su inactivación. Posee, además, la propiedad peculiar de la regeneración enzimática. Este fenómeno consiste en que al inactivarla por medio del calor recupera parcialmente su actividad después de un cierto tiempo. Esto ha sido explicado, aduciendo que la fracción proteica de la enzima sufre una desnaturalización sólo parcial, con pérdida de su estructura terciaria, si el calor se aplica en un tiempo muy corto, ocurriendo después una reversión de la proteína a su estado normal por recombinación de sus grupos hidrógenos o sulfhidrilos.

Este efecto del calor sobre la actividad peroxidasa es importante en la industria de alimentos y la regeneración enzimática de la peroxidasa puede causar serios problemas en los caracteres organolépticos. Se ha demostrado en el laboratorio que esta actividad enzimática puede depender totalmente del calentamiento (Bayramoglu y Arica, 2008; González, *et.al.*, 2006).

2.2.2. Importancia de las peroxidasas vegetales

Las peroxidasas llevan a cabo reacciones de deshidrogenación oxidativa. El mecanismo de esta reacción comienza cuando una molécula de H_2O_2 hace que el Fe^{3+} pase a Fe^{4+} generando un derivado oxo-ferril (IV) con un radical libre en la porfirina, al cual se le llama compuesto I. La histidina y la arginina facilitan el rompimiento del H_2O_2 y para que el Fe^{3+} acepte el protón que el rompimiento le proporciona, donando un electrón (Kobayashi, *et.al.*, 2001). En el segundo paso del mecanismo y gracias a la presencia de un agente reductor externo, se forma un oxo-ferril (IV) porfirina catiónica o compuesto II. La

catálisis oxidativa de la peroxidasa en solución acuosa da un incremento en la formación de compuestos oligoméricos, estos tienen baja solubilidad hacia el solvente, de tal modo que se forman polímeros de alto peso molecular que tienden a precipitarse (Akhtar y Husain, 2006; Buchanan y Nicell, 1997; Ghiourelotis y Nicell, 1999; Wright y Nicell, 1999; Kobayashi, *et al.*, 2001; Singh, *et al.*, 2006; Bayramoglu y Arica, 2008).

La peroxidasa del rábano europeo puede catalizar la formación de radicales libres por medio de la polimerización de una variedad de compuestos aromáticos incluyendo al fenol (Cheng, *et al.*, 2006; Cooper y Nicell, 1996; Tatsumi, *et al.*, 1994), clorofenoles (Lai y Lin, 2005; Tatsumi, *et al.*, 1996) y otros compuestos fenólicos (Zhang, *et al.*, 2007; Nicell y Wright, 1997). El uso de materiales vegetales como el rábano europeo (*Armoracia rusticana* L.) puede ser una alternativa viable para la desodorización de estiércol (Govere, *et al.*, 2007).

3. AGUAS RESIDUALES DE INDUSTRIAS TEXTILES

Desde las primeras civilizaciones el hombre usó colorantes naturales. Los pigmentos o sustancias coloreadas se extraían de plantas, animales y minerales. Estas materias eran empleadas para teñir ropas, pintar las pieles y fabricar objetos religiosos y recreativos. Las sustancias vegetales más empleadas eran: palo de campeche, cúrcuma, índigo natural. De animales se empleaba la cochinilla.

La industria textil es una de las más importantes a nivel mundial sin embargo la cantidad de sustancias químicas que se utilizan en el proceso de tinción y deslavado provoca que las descargas de agua residual de las fábricas de teñido y procesado de prendas textiles contenga una cantidad considerable de compuestos orgánicos e inorgánicos tóxicos al ambiente. Entre estos se encuentran los colorantes. Aunque la estructura de los colorantes sea de naturaleza orgánica, su degradación es lenta y difícil puesto que los organismos presentes en la naturaleza no poseen mecanismos adecuados para realizar su descomposición rápida y esto propicia que se acumulen en el ecosistema (Méndez, *et al.*, 2003).

De las 700.000 toneladas de colorantes y colorantes que se producen cada año en todo el mundo, del 10 al 15% se desechan en los efluentes provenientes de las operaciones de teñido. Casi el 50% del colorante que originalmente se encuentra en el baño de colorante nuevo, se desecha después de la coloración. La generación de agua residual en una instalación de teñido para la coloración reactiva y directa se encuentra en el orden de 15 a 20 galones por libra. La principal fuente de agua residual es el baño de colorante y el agua de lavado, los cuales contienen subproductos (colorante hidrolizado), algo de colorante intacto y sustancias químicas auxiliares (Giraldo, 2003; Doménech, 2001).

En el proceso de elaboración de productos textiles se presenta un gran número de operaciones unitarias retroalimentadas que utilizan diversas materias primas, como algodón, lana, fibras sintéticas, o mezclas de ellas. El impacto ambiental de sus efluentes

líquidos es muy diferente, por la gran variedad de materias primas y reactivos utilizados que varían según los métodos de producción (Mansilla, 2001; Aguedach, 2005).

En general, las moléculas de los colorantes utilizados en la actualidad son de estructuras muy variadas y complejas. La mayoría de ellos son de origen sintético, muy solubles en agua, altamente resistentes a la acción de agentes químicos y poco biodegradables. Alrededor del 60 % de los colorantes en uso de la industria textil actual son *colorantes reactivos*, que se caracterizan por formar una unión éter con la fibra, lo que garantiza una mayor duración del color en el tejido. Sus estructuras frecuentemente contienen grupos azo, antraquinona o ftalocianina (Doménech, 2001).

3.1. Los colorantes artificiales

Los colorantes pueden considerarse de origen natural o sintético. Los colorantes son sustancias que aplicadas a un determinado sustrato, casi siempre una fibra o tela, se fijan a él y le dan color, y son resistentes a la luz y el lavado. Los colorantes se conocen por la humanidad desde hace miles de años; los primeros fueron obtenidos de fuentes naturales, sin embargo, los que se emplean en la actualidad son casi todos sintéticos y son los más importantes en la tintura textil. Muchos de ellos proceden de aislar en laboratorio las sustancias correspondientes a los mismos en estado natural, parte de los cuales hemos visto, y proceder posteriormente a sintetizar químicamente colorantes idénticos a sus correspondientes naturales. El hecho de realizar colorantes sintéticos, es el de buscar y conseguir productos colorantes con cualidades apropiadas para los fines textiles que se les va a dar (Perinat, 1997).

Algunas características generales que definen y clasifican a la mayoría de los colorantes artificiales, son:

- Colorantes ácidos: Empleados para tintura de lanas, seda, poliamidas. Tienen diferentes grados de solidez.
- Colorantes básicos: Empleados para tintura directa de lana, seda y, sobre todo, las acrílicas, en las que se obtienen colores vivos y brillantes y con muy buenas solidez.
- Colorantes directos (sustantivos): Empleados para la tintura de celulósicas, con muy buenas solidez.
- Colorantes a la tina: Necesitan del oxígeno ambiental para ser efectivos. Su constitución química es análoga a la del índigo.
- Colorantes pigmentación: Necesitan de aglutinantes para su fijación.
- Colorantes dispersos: Fino grado de dispersión. Empleados para la tintura de rayón, acetatos y poliésteres. Se usan con auxiliares "carriers".
- Colorantes sulfurosos: Empleados para fibras celulósicas. Muy

- económicos pero de resultados pobres de matices.
- Colorantes de complejo metálico: Se emplean en la lana, de buena solidez.
- Colorantes sobre mordiente: Poco empleados.
- Colorantes reactivos: Empleados en la tintura de fibras celulósicas, mediante reacción química; producen matices de coloreado muy vivos y brillantes.

Los colorantes azoicos forman parte de una familia de sustancias orgánicas caracterizadas por la presencia de un grupo peculiar que contiene nitrógeno unido a anillos aromáticos. Todos se obtienen por síntesis química, no existiendo ninguno de ellos en la naturaleza. (Noona y Meggos, 1980; Comber y Haveland-Smith, 1982)

3.2. Colorante índigo carmín

El color añil, también conocido como índigo, corresponde a una longitud de onda de la luz de 4500 a 4770 Å, o entre 450 y 477 nm, se encuentra entre el azul y el violeta. El añil fue nombrado y definido por Isaac Newton cuando dividió el espectro óptico (que es un continuo de frecuencias). Este colorante es extraído de un arbusto llamado añil o índigo (del género *Indigofera*), siendo este nombre también usado para designar al color. El compuesto químico constituyente del índigo es la indigotina (Perinat, 1997).

Usado como colorante azul, fue probablemente el colorante más común en Europa junto con los púrpuras y el escarlata. Es el colorante vegetal más antiguo. Las vestiduras de las momias egipcias fueron teñidas con índigo. El índigo se encuentra en forma de un glucósido, en muchas plantas. Es una sustancia insoluble en agua. Es de color azul oscuro con reflejos bronceados. Se aplica en la industria textil. Es resistente a la luz y al lavado y su bajo costo hace que sea el colorante azul más empleado.

En América el colorante azul se extraía de diversas especies de plantas del género *Indigofera* conocidas en general con el nombre de jiquilite (de hasta 1,5 metros de altura), y se usaba normalmente para teñir túnicas y ropajes sacerdotales. El Salvador y Guatemala se destacaron por su vasta producción de añil (en particular cabe destacar el azul maya con que están pintados algunos murales de Bonampak, Chiapas) hasta mediados del siglo XVII, momento en el que comenzaron a descubrirse los colorantes sintéticos en Europa.

En el año 1856 se inició la era de los colorantes sintéticos, a partir del descubrimiento de William Henry Perkin (1838–1907), quién logró obtener el colorante púrpura por oxidación de la anilina con ácido crómico. El primer colorante obtenido fue el ácido pícrico, preparado por Peter Woulfe en 1771, mediante la acción del ácido nítrico sobre el índigo natural. En 1855 se encontró la forma técnica de prepararlo a partir del alquitrán de

hulla. A partir del alquitrán de hulla se preparó la urina, fabricado por Friedlich Ferdinand Runge, en el año 1834. Tres químicos desempeñaron un papel clave en el descubrimiento del índigo, dos universitarios, Baeyer y Carl Herman (1850-1893) y el químico industrial Caro, que colaboró con Baeyer a partir de 1876.

El colorante natural añil se comercializó hasta que en 1883 Adolfo Von Baeyer determinó la estructura química del índigo (Clark, 1993; Oberthür, 2004), el cual hizo su síntesis a partir de orto-nitro benzaldehído, acetona y una base, gracias a lo cual este gran químico ganó un premio Nobel en 1905. Después se desarrolló el primer proceso comercial de producción de índigo sintético con tolueno, desplazando casi totalmente la producción de índigo natural (Xia y Zenk, 1992; Clark, 1993), en la figura 2, se muestra la estructura del índigo carmín.

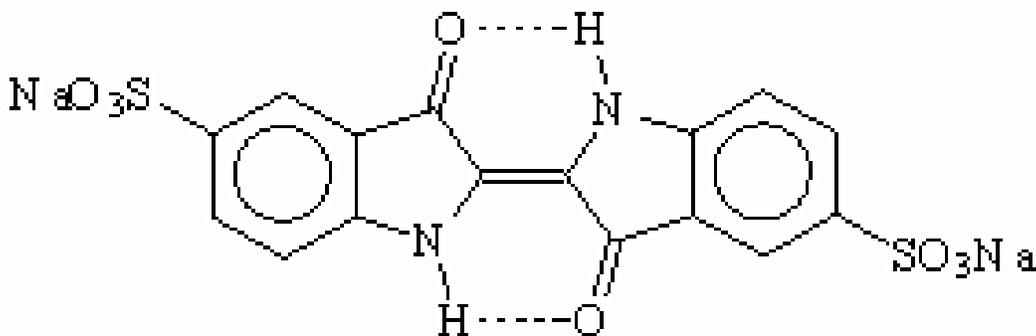


Figura 2. Estructura molecular del índigo carmín.

II. PROBLEMÁTICA Y JUSTIFICACIÓN

1. PROBLEMÁTICA

El proceso de elaboración de productos textiles consiste en un gran número de operaciones unitarias que utilizan diversas materias primas como algodón, lana, fibras sintéticas o mezclas de ellas. El impacto ambiental de sus efluentes líquidos es muy variado, por la gran variedad de materias primas, reactivos y de métodos de producción.

Aproximadamente del 10-15% de los colorantes son liberados en el medio ambiente durante su fabricación y su uso (Spadarry, 1994). La mayoría de estos colorantes son, ya sea tóxico para la flora y la fauna o mutágenos y carcinógenas (Nilsson, 1993), en consecuencia, representan un peligro potencial para la salud a todas las formas de vida (Sharma, 2000). La eliminación de este tipo de efluentes que contienen colorantes se basa principalmente en procedimientos físico-químicos (por ejemplo, la absorción, concentración, transformación química e incineración). Estos métodos son costosos y generan a veces peligrosos productos y por tanto, otras alternativas tales como la biodegradación atraen la atención (Shaul, 1991; Kandelbauer, 2004). Una estrategia potencialmente atractiva es la biorremediación, que se está convirtiendo en una cuestión importante en los países desarrollados y en desarrollo (Waffa, 2003), que tiene como objetivo ofrecer un tratamiento aceptable de bajo costo para solucionar este problema de los residuos en el medio ambiente.

Las principales clases de colorantes tienen estructuras indigoides, antraquinonas, y aromáticos azoicos. Los principales inconvenientes de esta clase de colorantes es que no es fácilmente degradado por bacterias aerobias, y con la acción de los anaerobios o bacterias reductoras microaeróbicas, pueden formar compuestos tóxicos y/o mutagénicos tales como las aminas aromáticas (Chung, 1992; Wong, 1996).

El colorante índigo es ampliamente utilizado para el teñido e impresión de proteínas y fibras de celulosa (Reife, 1995) La biodegradación del colorantes índigo ha sido llevada a cabo por una variedad de microorganismos, incluidos los alcalofílicos (Nakajima, 2005), bacterias termófilas (Nicholson, 2005), y bacterias anaeróbicas (Nicholson, 2004). La degradación enzimática de índigo carmín con lacasas de los hongos *Trametes hisuta* y *Sclerotium rolfsia* fue reportada por Campos (2001). La degradación del colorante añil de textiles por bacterias constituye una base para el desarrollo de alternativas sostenibles a los actuales métodos químicos (métodos utilizados para reducir el añil para teñir tela de jeans).

En general, las corrientes de agua de descarga provienen principalmente del desgomado (15 %), descruce y macerado (20 %) y del blanqueo, teñido y lavado (65 %). La cantidad de agua empleada en los procesos textiles varía en forma considerable dependiendo del proceso específico y del equipamiento de la planta. En promedio se han reportado entre 125 y 170 litros de agua por kilogramo de producto (USEPA, 1997).

Una fracción importante de los contaminantes liberados al ambiente en los efluentes de este giro industrial son los residuos de colorantes. Por lo regular los colorantes textiles tienen gran persistencia en el ambiente y los métodos de tratamiento clásicos no son útiles en su remoción debido a que oxidaciones o reducciones parciales pueden generar productos secundarios altamente tóxicos. Una gran proporción de los colorantes no son tóxicos a los organismos vivos. Sin embargo, la fuerte coloración que imparte a los cuerpos de descarga puede llegar a suprimir los procesos fotosintéticos en corrientes de agua, por lo que su presencia debe ser controlada.

En general, las moléculas de los colorantes utilizados en la actualidad son estructuras muy variadas y complejas. La mayoría son de origen sintético, muy solubles en agua, altamente resistentes a la acción de agentes químicos y poco biodegradables. Sus estructuras frecuentemente contienen grupos azo, antraquinona o ftalocianina (figura 3).

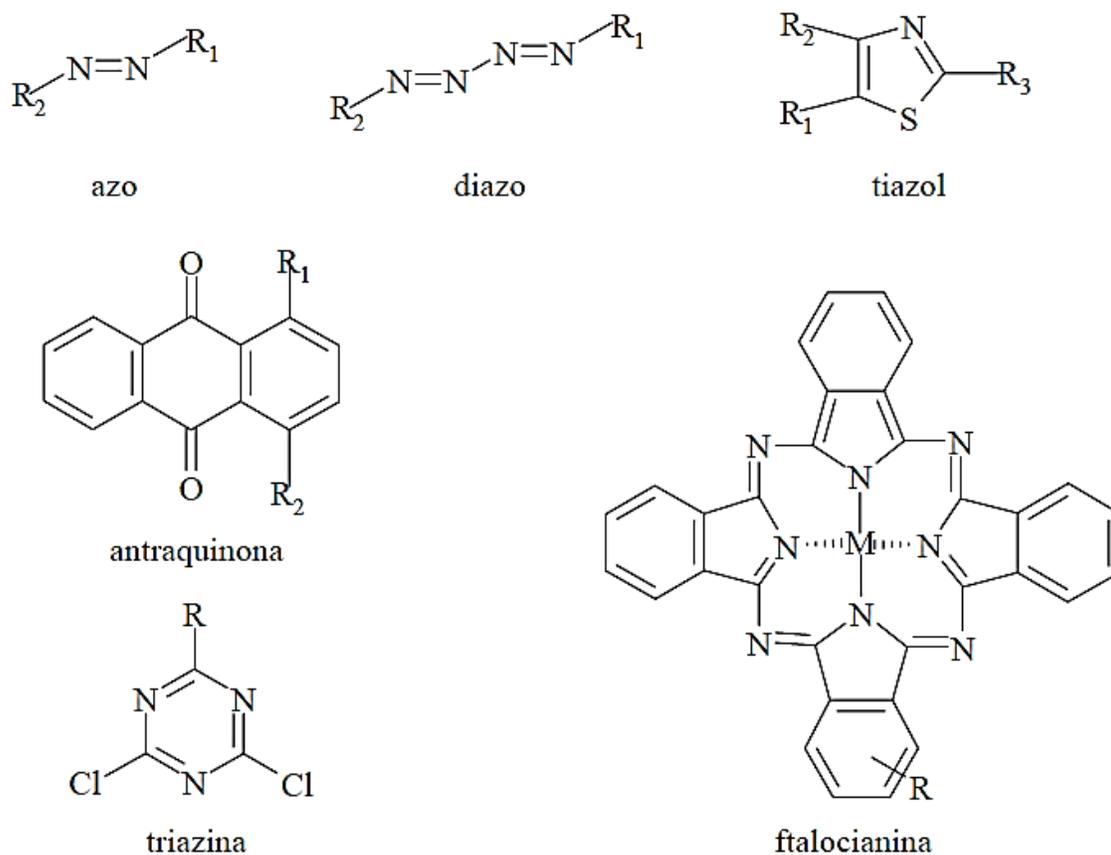


Figura 3. Estructuras químicas de diferentes de colorantes textiles.

Dadas sus características de solubilidad y estabilidad, los métodos tradicionales de floculación, sedimentación o adsorción no son útiles en la remoción de estos compuestos. Para la degradación de los colorantes se han utilizado hasta la fecha diferentes procesos avanzados de oxidación: O_3/UV , H_2O_2/UV y fotocátalisis heterogénea así como tratamientos combinados de fotocátalisis y oxidación electrolítica. En muchos de los casos, la aplicación de algunas de estas metodologías ha resultado en la exitosa disminución de la concentración de colorante en los efluentes tratados.

A pesar de los buenos resultados obtenidos al utilizar estas metodologías, se han determinado algunos inconvenientes en las mismas. Por ejemplo, el uso de partículas de semiconductor en suspensión, requiere de una etapa adicional de separación del catalizador, de igual forma la utilización de fuentes artificiales de radiación ultravioleta (UV) puede ser un obstáculo para el escalamiento de la tecnología ya que eleva los costos de cada tratamiento (Chacón, *et.al.*, 2002).

2. JUSTIFICACIÓN

Los tratamientos biológicos de los efluentes líquidos de la industria textil incluyen básicamente tratamientos aeróbicos y anaeróbicos que pueden ser precedidos por una o más etapas de tratamiento primario, como sedimentación, tamizado, coagulación, equalización, neutralización, o cualquier otro tratamiento fisicoquímico avanzado, como ultrafiltración o adsorción sobre carbón activado. La eficiencia del tratamiento biológico para la remoción de la DQO depende fuertemente de la relación DBO_5/DQO . El valor medio de esta razón en un efluente de la industria textil es de alrededor de 0.35, lo que hace difícil la eliminación total de la DQO. Es conveniente llevar esta razón a un valor no menor que 0.6 para lograr una biodegradabilidad aceptable (Athanasopoulos, 1991). En una revisión exhaustiva sobre la biodegradación de colorantes textiles, se demostró que la mayoría de los colorantes no muestran una biodegradación significativa en medios aeróbicos y que la desaparición del color del efluente se atribuye principalmente a la adsorción de las moléculas intactas de colorante en el lodo (Pagga y Brown, 1986). Shaul y colaboradores (1987) concluyeron que muchos de los productos de biodegradación de los colorantes azo pueden constituir una fuente de sustancias tóxicas a través de sus productos de degradación, tales como las aminas aromáticas. En consecuencia, el empleo de tecnologías avanzadas de pre- o post-tratamiento biológico puede constituir una alternativa viable para la remoción de los colorantes disueltos en un efluente textil.

Muchos de los compuestos azo y otros colorantes sintéticos no son susceptibles a tratamientos biológicos convencionales de aguas residuales (Kimura, 1980). Una transformación aeróbica de colorantes azo empieza con la fisión reductiva de los enlaces azo, resultando en la formación y acumulación de aminas aromáticas incoloras, las cuales pueden ser altamente tóxicas y cancerígenas (Bhunja, *et.al.*, 2000).

Actualmente algunos métodos disponibles como oxidación química, ósmosis inversa, absorción, etc., sufren desventajas tales como alto costo, alto contenido de sal en el efluente, problemas relacionados con la concentración de desechos, etc.

Específicamente las peroxidasas y lacasas/polifenoloxidasas de las plantas son consideradas como buenos candidatos para la decoloración de colorantes textiles, por ejemplo, se ha demostrado que la peroxidasa del rábano europeo (horseradish peroxidase) puede catalizar la formación de radicales libres seguida de polimerizaciones espontáneas de una variedad de compuestos aromáticos incluyendo al fenol, 2 y 4-clorofenoles y otros compuestos del fenol (Dec y Bollag, 1994), en la degradación y precipitación de colorantes azo de importancia industrial (Ulson de Souza y Forgiarini, 2007). Se ha demostrado (Ramya, *et.al.*, 2007) la formación de ácido antranílico e isatina, en la degradación del colorante índigo carmín, como muestra la figura 4.

Análisis de productos de la degradación del colorante índigo carmín usando Cromatografía Líquida de Masas

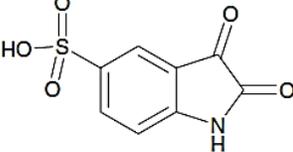
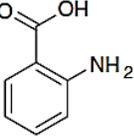
S. No	Colorante	λ_{max} (nm)	Productos de degradación primaria	Masa obtenida	Tiempo de retención (R_T)
1	Índigo Carmín	610 nm	Isatina 	243.8 m/z	1.4 min
			Ácido Antranílico 	181 m/z	1.2 min

Figura 4. Productos primarios en la degradación del colorante índigo carmín según Ramya (2007).

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

Si las peroxidasas de varias especies vegetales y algunas lacasas fúngicas tienen la capacidad de degradar colorantes textiles, entonces es posible que las peroxidasas y lacasas el tallo de brócoli (*Brassica oleracea* L.), cáscara de rábano (*Raphanus sativus* L.), cáscara de tomate verde (*Physalis ixocarpa* Brot.), espinaca (*Spinacia oleracea* L.), tallo de flor de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) y lirio acuático (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms), también produzcan la biodegradación del índigo carmín.

Si las peroxidasas y lacasas vegetales degradan al colorante índigo carmín del agua contaminada artificialmente, entonces podremos comprobar la posible remediación por medio de desechos vegetales para este tipo de aguas contaminadas, considerándola así una técnica alterna económica y práctica para la degradación de colorantes textiles en dichas aguas.

2. OBJETIVOS GENERALES

Estudiar la biodegradación del colorante textil índigo carmín por medio del uso de las enzimas peroxidasas y lacasas presentes en el tallo de brócoli, tallo de flor de calabaza, cáscara de rábano, cáscara de tomate verde, espinaca y lirio acuático.

3. OBJETIVOS PARTICULARES

- Extraer las enzimas peroxidasa y lacasa de cada uno de los seis tipos de vegetales a trabajar.
- Determinar la actividad peroxidasa y lacasa con los extractos vegetales.
- Realizar la fitorremediación de soluciones artificialmente contaminadas con diferentes concentraciones del colorante textil índigo carmín (500, 1000 y 2000 ppm) utilizando extracto diluido y extracto concentrado de cada vegetal.
- Realizar la cinética de la biodegradación del índigo carmín: a) el pH óptimo, b) Presentación del material vegetal en la que se favorece la biodegradación con bagazo y c) la concentración de peróxido de hidrógeno que favorece la biodegradación del índigo carmín.
- Identificar por cromatografía en capa fina (CCF) de los productos mayoritarios de la degradación del índigo carmín.

IV. MATERIAL Y METODOLOGÍA

1. TRABAJO DE CAMPO

1.1 Obtención del material biológico

Para la realización de este trabajo se utilizó el tallo de brócoli (*Brassica oleracea* L.), cáscara de rábano (*Raphanus sativus* L.), cáscara de tomate verde (*Physalis ixocarpa* Brot.), espinaca (*Spinacia oleracea* L.), tallo de flor de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) conseguidos de diferentes mercados en el Distrito Federal, procurando comprar el vegetal más fresco y evitando los vegetales en descomposición o putrefactos, se desconoce la preservación y procedencia exacta de dichos vegetales. El lirio acuático (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) fue recolectado del Parqué Ecológico de Xochimilco, ubicado al sur de la ciudad de México a 23 km. del centro de la Capital, entre Miramontes y Secretaría de Marina. 19°15'47"N 99°06'11"O.

2. TRABAJO DE LABORATORIO

2.1 Preparación del material vegetal

Se lavó la parte del vegetal a utilizar con agua destilada, para liberarlo de la mayor cantidad de residuos sobre su corteza, una vez limpio el vegetal se corta la parte del vegetal que se va a utilizar con una navaja limpia y se pesa (figura 5).



Figura 5. Vegetal lavado y cortado en trozos para preparar el extracto.

2.1.1 Preparación del extracto concentrado

Con un extractor de jugos, se tritura la parte del vegetal a utilizar, obteniendo el jugo del vegetal.

2.1.2 Preparación del extracto diluido

Se pesan 100 g del vegetal y se colocan en una licuadora añadiendo 100 ml de la solución problema de índigo carmín. Se tritura la mezcla (1:1) en la licuadora, obteniendo así de manera directa las muestras para biorremediación.

2.1.3 Preparación del extracto diluido directamente con la solución problema.

Se pesan 100 g del vegetal y se colocan en una licuadora añadiendo 100 ml de agua destilada. Se tritura la mezcla (1:1) en la licuadora y después la mezcla es filtrada con gasa para liberar el extracto de partículas grandes de vegetal.

2.1.4 Obtención de bagazo

El bagazo se obtiene de la preparación del extracto enzimático diluido, al filtrar (a) la mezcla las partículas que quedan en la gasa forman lo que es el bagazo vegetal (b), que se añade a las muestras de biorremediación (figura 6).



a)

b)

Figura 6. Obtención del extracto enzimático diluido (a) y el bagazo vegetal (b).

2.2 Preparación de la soluciones artificialmente contaminada a diferentes concentraciones

La preparación de la solución artificialmente contaminada (figura 7) se realizó a diferentes concentraciones (500,1000 y 2000 ppm), se realizaron los cálculos necesarios para pesar y aforar el polvo del colorante índigo carmín en agua destilada. En el caso de las soluciones de índigo carmín a diferentes pH, primero se prepararon las soluciones de diferente pH y después se leas agrego el carmín índigo para llegar a la concentración deseada (ver anexo).



Figura 7. Aforo de la solución de índigo carmín a 1000 ppm y su posterior almacenamiento.

2.3 Determinación de la Actividad Enzimática

Para medir la actividad peroxidasa y lacasa de los diferentes vegetales se utilizó el siguiente material y se realizó de la siguiente forma:

2.3.1 Actividad peroxidasa

Soluciones:

- Guayacol (o-metoxifenol) [1%] en alcohol
- Buffer de fosfato (pH 6.1)
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% [0.5%] en H_2O

Material:

- Espectrofotómetro GENESYS 10 UV de barrido

Procedimiento:

- A temperatura ambiente, se prepara en la celda una mezcla con 1 ml de buffer de fosfato pH 6, 200 µl de guayacol (1%), 200 µl de H₂O₂ (0.5%), 1 ml de agua destilada, se agita manualmente y después se lee en el espectrofotómetro GENESYS 10 UV de barrido (la absorbancia a 470 nm corresponderá al tiempo 0).
- Se adicionará la cantidad que sea necesaria de extracto enzimático (5, 10, 20, 50 o 100 µl) a medida que la reacción no ocurra tan rápida para que permita la toma de lectura de absorbancia cada 10 segundos durante 1 min.
- Las actividades enzimáticas se reportan como actividad específica (unidad/g).
- La actividad peroxidasa se calcula con la fórmula:

$$(\text{Abs } 2 - \text{Abs } 1) \times 2.85 / 5.2 \times 0.005 = \text{Actividad por Gramo de Planta}$$

Dónde:

- Abs 2= Absorbancia al minuto.
- Abs 1 = Absorbancia antes de añadir las enzimas.
- $5.2/\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ = Coeficiente de extinción del tetrámero del guayacol.
- 0.005 = Cantidad en µl del extracto enzimático podría ser 0.01, 0.02, 0.05 o 0.1 según la cantidad usada.

* La lectura del espectro debe estar entre 0.2 a 0.9 de valores de absorbancia.

2.3.2 Actividad lacasa**Soluciones:**

- ABTS mezclar 0.125 g de ABTS y aforar a 50 ml (*mantener en refrigeración*).
- Buffer acetatos (pH 5) mezclar 1.7 ml de ácido acético glacial con 9.57 g de acetato de sodio y aforar a 1 litro con agua destilada.

Material:

- Espectrofotómetro GENESYS 10 UV de barrido

Procedimiento:

- El blanco se prepara a 25°C, 2 ml de una mezcla conteniendo 0.2 ml. de un buffer de fosfato, 0.2 ml de ABTS 5 mM y el resto de agua para completar 2 ml. La muestra contiene 0.2 ml. de un buffer de fosfato, 0.2 ml de ABTS 5 mM y 0.2 ml de extracto enzimático, el resto de agua para completar 2 ml, se agita

en vortex, se lee en el espectrofotómetro GENESYS 10 UV de barrido a 414 nm cada 15 segundos durante 3 minutos (Fric, 1976).

- Graficar cambios de absorbancia contra tiempo (en minutos) y calcular la pendiente de la recta.
- La actividad enzimática se reporta como actividad específica (unidad/mg).
- La actividad será:

$$\text{Actividad lacasa} = \text{Pendiente} \times 10 / 36$$

Dónde:

- 36 = Coeficiente de extinción molar (mM/min).
- 10 = Factor de dilución del extracto enzimático.

* Nota si la reacción es muy rápida diluir el extracto enzimático 1:10 y proceder como se indicó pero ahora el factor de dilución será de 100.

2.4 Biorremediación

Las biorremediaciones fueron realizadas con diversas variables, el método para cada una de estas se describe en los siguientes puntos.

2.4.1 Extracto concentrado con diferentes concentraciones de índigo carmín

Las muestras se preparan en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, adicionando:

- 10 ml del extracto concentrado de cada vegetal.
- 10 ml de la solución problema de índigo carmín a 500 ppm (tallos, raíz y hoja de espinaca), 1000 (tallos de flor de calabaza, tallos de brócoli, cáscara de rábano, cáscara de melón, hoja de lirio acuático y hoja, raíz y tallos de espinaca) y 2000 ppm (tallos de brócoli, tallos de flor de calabaza, cáscara de rábano y cáscara de melón).

Para preparar la muestra control de cada experimento se tomó una alícuota de 10 ml de la solución principal de índigo carmín (500, 1000 y 2000 ppm) con 10 ml de agua destilada realizando el mismo tratamiento que al resto de las muestras.

Se prepara cada muestra por duplicado a excepción de las muestras control. Una vez preparadas las muestras y controles se colocan en un agitador rotativo modelo ST, agitando a 150 rpm.

2.4.2 Biorremediación con bagazo

El bagazo utilizado fue del tallo de flor de calabaza y del tallo de brócoli.

- Muestras con bagazo de tallo de flor de calabaza: Se pesan 10 g del bagazo vegetal (figura 8) y se depositan en un matraz erlenmeyer de 125 ml (figura 9), se agregan 10 ml de la solución de índigo carmín a 1000 ppm (3 muestras por vegetal).



Figura 8. Peso del Bagazo vegetal para las muestras de biodegradación.



Figura 9. Bagazo de los vegetales en matraz erlenmeyer de 125 ml para las muestras de biodegradación.

- Muestras con bagazo de tallo de brócoli: Se colocan 10 g de bagazo vegetal en un matraz erlenmeyer de 125 ml (figura 10), se agregan 10 ml de la solución de índigo carmín a 1000 ppm (3 muestras por vegetal).



Figura 10. Muestras preparadas para la biodegradación del bagazo de los vegetales tallo de flor de calabaza y tallo de brócoli junto a la muestra control.

Para preparar la muestra control de cada experimento se tomó una alícuota de 10 ml de la solución principal de índigo carmín (1000 ppm) y se le realizó el mismo tratamiento que al resto de las muestras.

2.4.3 Extracto concentrado y bagazo con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno

Para los extractos concentrados de tallo de brócoli y tallo de flor de calabaza las diferentes muestras se prepararon de la siguiente forma:

- Muestras con 5µl de H₂O₂ al 30%: Se depositan 10 ml de extracto vegetal (extracto concentrado) en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, se agregan 10 ml de la solución de índigo carmín a 1000 ppm después se adicionan 5µl de H₂O₂ al 30% (se preparan 2 muestras por vegetal).
- Muestras con 15µl de H₂O₂ al 30%: Se depositan 10 ml de extracto vegetal (extracto concentrado) en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, se agregan 10 ml de la solución de índigo carmín a 1000 ppm después se adicionan 15µl de H₂O₂ al 30% (se preparan 2 muestras por vegetal).
- Muestras con 30µl de H₂O₂ al 30%: Se depositan 10 ml de extracto vegetal (extracto concentrado) en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, se agregan 10 ml de la solución de índigo carmín a 1000 ppm después se adicionan 30µl de H₂O₂ al 30% (se preparan 2 muestras por vegetal).
- Muestras sin adición de H₂O₂: Se depositan 10 ml de extracto vegetal (extracto concentrado) en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, se agregan 10 ml de la solución de índigo carmín a 1000 ppm (se preparan 2 muestras por vegetal).

Preparación de la muestra control

- Muestras control con H₂O₂ al 30%: Se depositan 10 ml de la solución índigo carmín a 1000 ppm en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, se agregan 10 ml de agua destilada, se adicionan 5µl, 15µl y 30µl de H₂O₂ al 30% (un matraz Erlenmeyer por cada concentración) se prepara 1 muestra control por cada concentración diferente de H₂O₂.
- Muestra control sin H₂O₂ al 30%: Se depositan 10 ml de la solución índigo carmín a 1000 ppm en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, se agregan 10 ml de agua destilada (se prepara 1 muestra control).

Para los extractos concentrados de tallo de brócoli, tallo de flor de calabaza, cáscara de melón, cáscara de tomate verde y cáscara de rábano las diferentes muestras se prepararon de la siguiente forma:

Extracto concentrado

- Muestras con Peróxido de hidrógeno: Se depositan 10 ml de extracto concentrado en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, se agregan 10 ml de la solución de azul índigo carmín a 1000 ppm y se adicionan 75 µl de peróxido de hidrógeno al 0.5%.
- Muestras sin Peróxido de hidrógeno: Se depositan 10 ml de extracto concentrado en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, se agregan 10 ml de la solución de azul índigo carmín a 1000 ppm.

Bagazo

- Muestras con Peróxido de hidrógeno: Se depositan 10 g de bagazo en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, se agregan 10 ml de la solución de azul índigo carmín a 1000 ppm y se adicionan 75 µl de peróxido de hidrógeno al 0.5%.
- Muestras sin Peróxido de hidrógeno: Se depositan 10 g de bagazo en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, se agregan 10 ml de la solución de azul índigo carmín a 1000 ppm.

Todas las muestras se preparan por repetido y se colocaron en un agitador rotativo modelo ST a 150 rpm.

2.4.4 Extracto diluido y extracto diluido con la solución modelo de índigo carmín a diferentes concentraciones (monitoreo de pH)

Preparación de las muestras para el tallo de brócoli, cáscara de melón y cáscara de tomate verde a 500 ppm.

- Extracto diluido: Se pesan 60 g de material vegetal y se colocan dentro de la licuadora junto con 60 ml de agua destilada, se licua y el extracto es utilizado para poner las muestras. En un matraz Erlenmeyer de 125 ml se colocan 10 ml de la solución azul índigo carmín a 500 ppm y se añaden 10 ml de extracto vegetal, la muestra se colocan en el agitador rotativo modelo ST a 150 rpm.
- Extracto diluido con la solución modelo de índigo carmín: Se pesan 60 g de material vegetal y se colocan dentro de la licuadora, se añaden 60 ml de la solución azul índigo carmín y se licua durante 3 min. Se toma una alícuota de 20 ml para cada vegetal y se coloca en un matraz Erlenmeyer de 125 ml. Las muestras son colocadas en agitador rotativo modelo ST a 150 rpm.

Preparación de las muestras para el tallo de brócoli, tallo de flor de calabaza, cáscara de rábano y cáscara de tomate verde a 1000 ppm.

- El extracto de cada vegetal se obtuvo pesando 100 g de cada vegetal, se colocan en la licuadora y se añaden 100 ml de la solución del colorante índigo carmín a 1000 ppm, y después se licua.
- Una vez obtenido el extracto junto con la solución índigo carmín, las muestras se preparan tomando una alícuota de 10 ml del extracto licuado y se coloca en un matraz erlenmeyer, colocando dos muestras por vegetal.

Preparación de las muestras para el tallo de brócoli, tallo de flor de calabaza y cáscara de melón a 2000 ppm.

- Muestras con extracto líquido: Se depositan 20 ml de extracto líquido vegetal (extracto concentrado) en un matraz erlenmeyer de 125 ml, se agregan 20 ml de la solución de índigo carmín a 2000 ppm (2 muestras por vegetal).
- Muestras con extracto diluido en la solución índigo carmín: Se depositan 30 g de vegetal en la licuadora, se adicionan 30 ml de la solución índigo carmín a 2000 ppm, se licua todo junto y después se toma una alícuota de 20 ml y se coloca en un matraz erlenmeyer de 125 ml (2 muestras por vegetal).

Lectura del pH y temperatura

Antes de realizar la lectura de las muestras, se tomó el pH de cada muestra con un potenciómetro conductronic pH10 calibrado que nos da de igual modo la temperatura de la muestra.

2.4.5 Extracto concentrado con diferentes valores de pH

Para los extractos del tallo de brócoli y tallo de flor de calabaza, las muestras se prepararon de la siguiente forma para cada pH:

- En un matraz Erlenmeyer se colocan 10 ml de extracto vegetal, después se adicionan 10 ml de la solución índigo carmín 500 ppm con el pH a utilizar (ver anexo).
- Las muestras control se preparan poniendo 10 ml de la solución índigo carmín de cada pH en un matraz erlenmeyer de 125 ml.

La lectura del pH se realiza cada que se toma lectura de biodegradación, para realizar las lecturas de pH en las diferentes muestras se utilizó un potenciómetro conductronic pH10 calibrado.

2.5 Lectura de las muestras de biorremediación

Para realizar las lecturas se tomó una alícuota de 0.5 ml de cada muestra y el control, se centrifuga 15 min a 3500 rpm, después se toma una alícuota de 20 μ l de la muestra centrifugada, depositándola en una celda y completando el volumen a 2ml con agua destilada, la toma de lecturas se realizaron en los tiempos 0, 3.5, 7, 30 y 48 h, en algunas pruebas solo se tomaron los tiempos 24, 48 y 72 h y 24 y 48 h según sea el caso de cada experimento, a una longitud de onda de 610 nm (Sandoval-Salas, *et. al.*, 2006) para cuantificar la concentración de índigo carmín en base a una curva estándar.

2.6 Búsqueda de ácido antranílico

Proceso de extracción a la mejor biorremediación.

- Pasadas las 48 h y realizadas las lecturas de la biorremediación, se elige la muestra con mejores resultados para aplicarle el tratamiento.
- Se toma una alícuota de 10 ml de la muestra y se extrae con 3 ml de éter.
- El sobrenadante se seca con sulfato de sodio anhidro, después la muestra es filtrada para remover algún residuo de sulfato de sodio anhidro, almacenando la muestra extraída en un vaso de precipitados de 50 ml.
- El éter se deja evaporar por 24 h colocando la muestra en refrigeración y una vez evaporado el polvo que quede en el vaso de precipitado se diluye con unas gotas de éter para aplicar la cromatografía.

Aplicación de cromatografía en capa fina de los compuestos resultantes de la extracción.

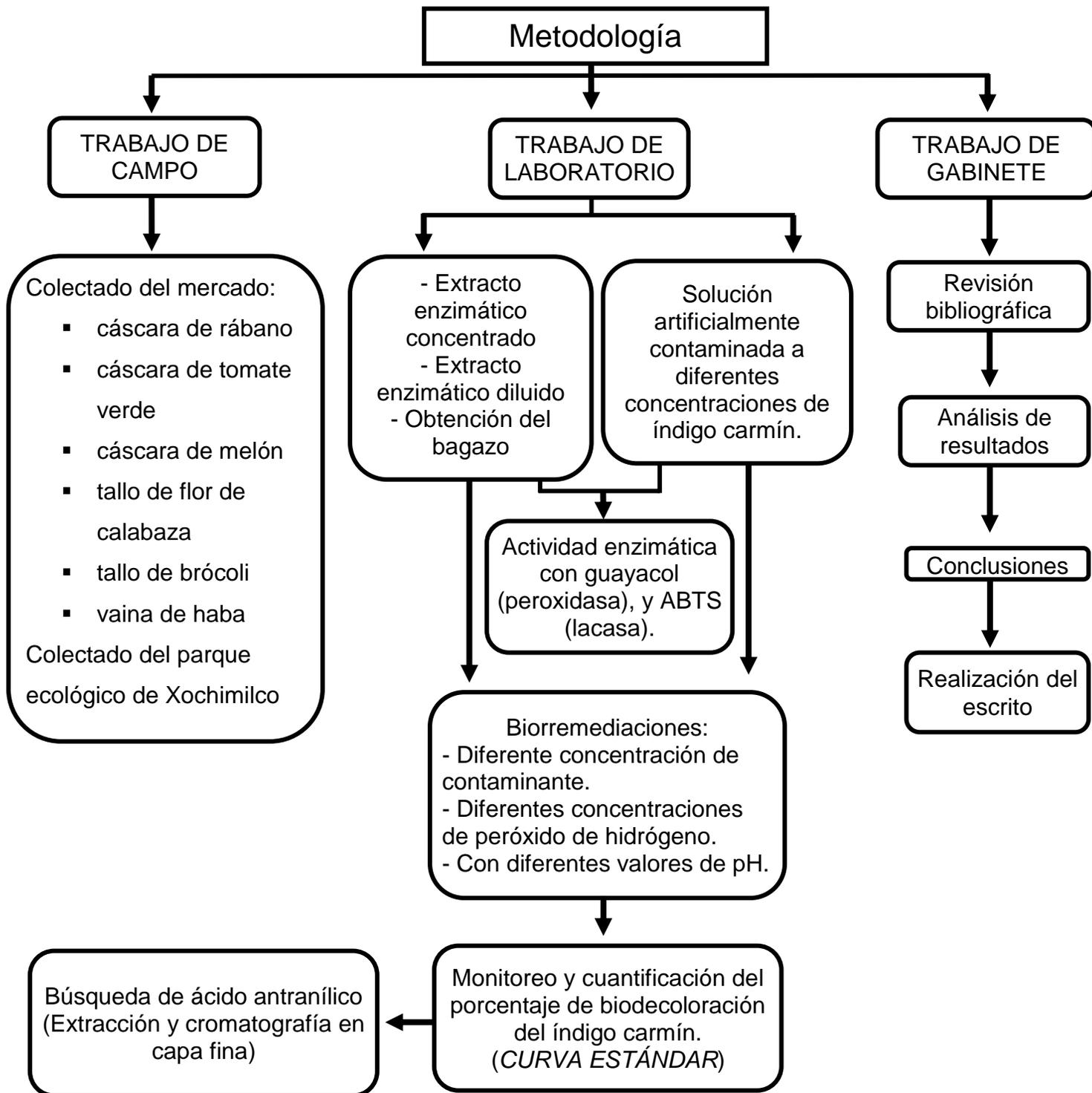
- Se prepara la placa de cromatografía de 10X15 cm.
- La aplicación de las muestras se realiza con la ayuda de capilares modificados.
- Las muestras son diluidas en éter nuevamente para su aplicación, el control en la placa de cromatografía es el ácido antranílico.
- La placa de cromatografía es corrida con acetato de etilo.
- La placa es revelada por una lámpara de cromatografía (UVP, MODELO UVLS-28, ENTELA) en el modo de longitud larga, de rayos ultravioleta.

Se realiza una segunda cromatografía con el sobrante de las muestras extraídas con éter, corriendo y revelando de la misma manera que las muestras anteriores. El control en esta placa cromatográfica será la muestra con la solución modelo de índigo carmín.

3. TRABAJO DE GABINETE

Todas las biorremediaciones se realizaron por duplicado. Se realizó un promedio con los datos obtenidos tanto para la actividad enzimática como para la biorremediación. Finalmente con ayuda del programa Excel de Office se realizaron las gráficas de cinética de biodegradación con los datos que se obtuvieron, la concentración final de las biodegradaciones se calcularon en ppm con la ayuda de una curva estándar del colorante índigo carmín y fueron convertidas en porcentaje (%) de colorante degradado para una manipulación más práctica de los resultados como los reporta Ajibola (2005).

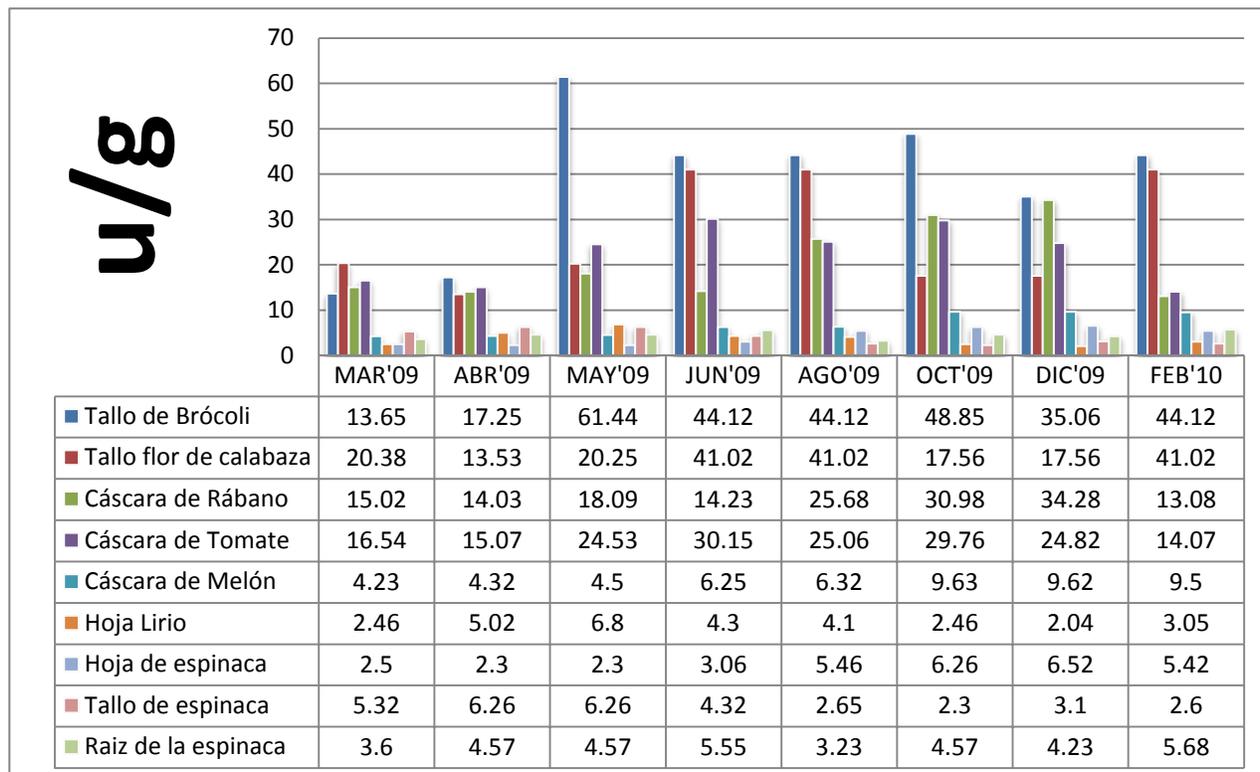
4. DIAGRAMA DE FLUJO GENERAL



V. RESULTADOS

1. Determinación de la actividad enzimática

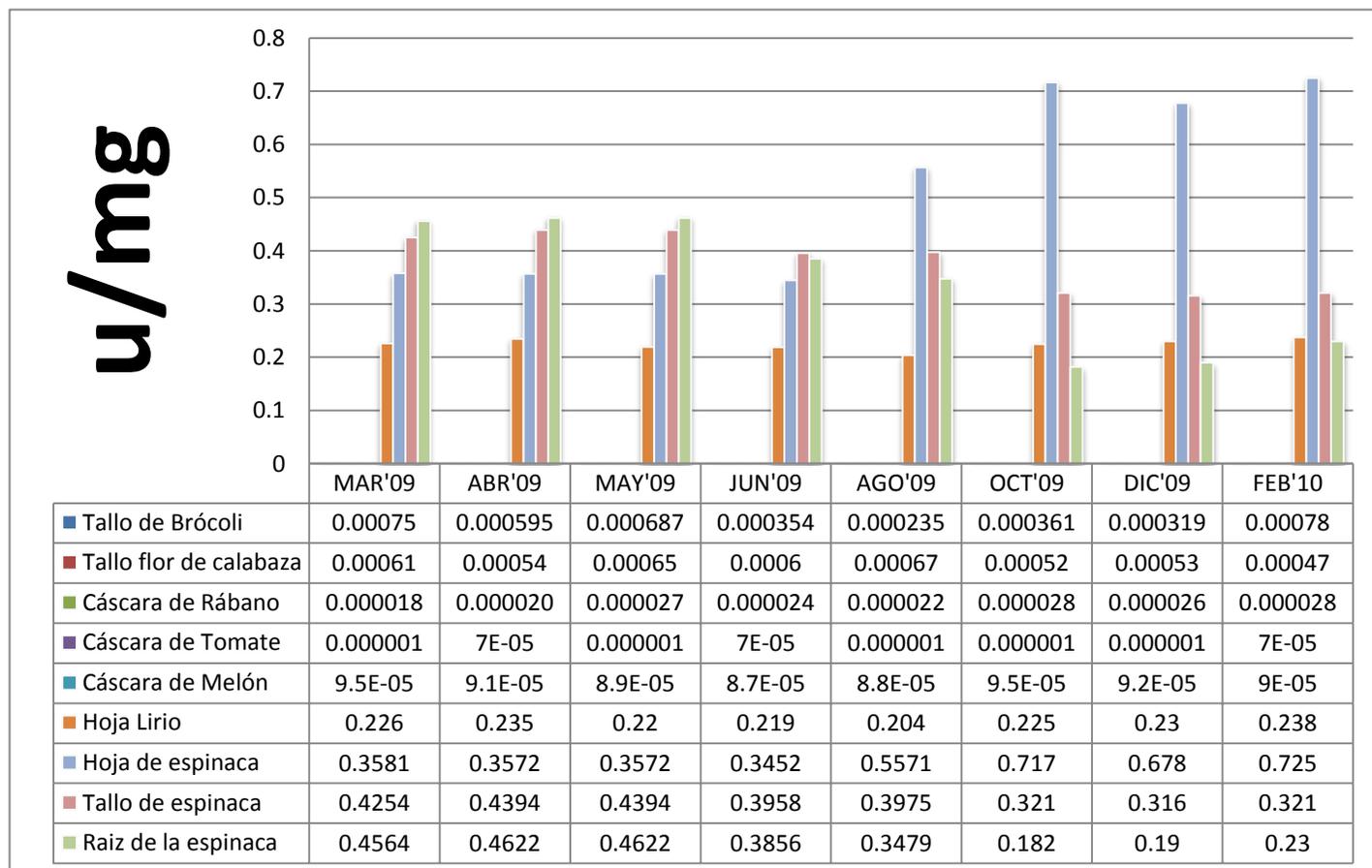
1.1. Actividad peroxidasa



Gráfica 1. Actividad enzimática de la peroxidasa de los extractos vegetales en los meses de mar-jun., ago., oct., dic 2009 y feb. 2010. La actividad de la enzima se presenta en u/g

En la gráfica 1 se presenta la actividad enzimática de la peroxidasa de los extractos vegetales, en el mes de mayo el brócoli presenta la actividad más alta de todos los extractos con 60 u/g, el mes de marzo y abril se presentaron las actividades más bajas, ningún extracto rebaso las 20 u/g, en el mes de agosto cuatro extractos presentan buena actividad de 25 a 45 u/g, y en el resto de los meses los extractos que presentan mejor actividad son el tallo de brócoli, tallo de flor de calabaza, cáscara de rábano y cáscara de tomate verde.

1.2. Actividad lacasa

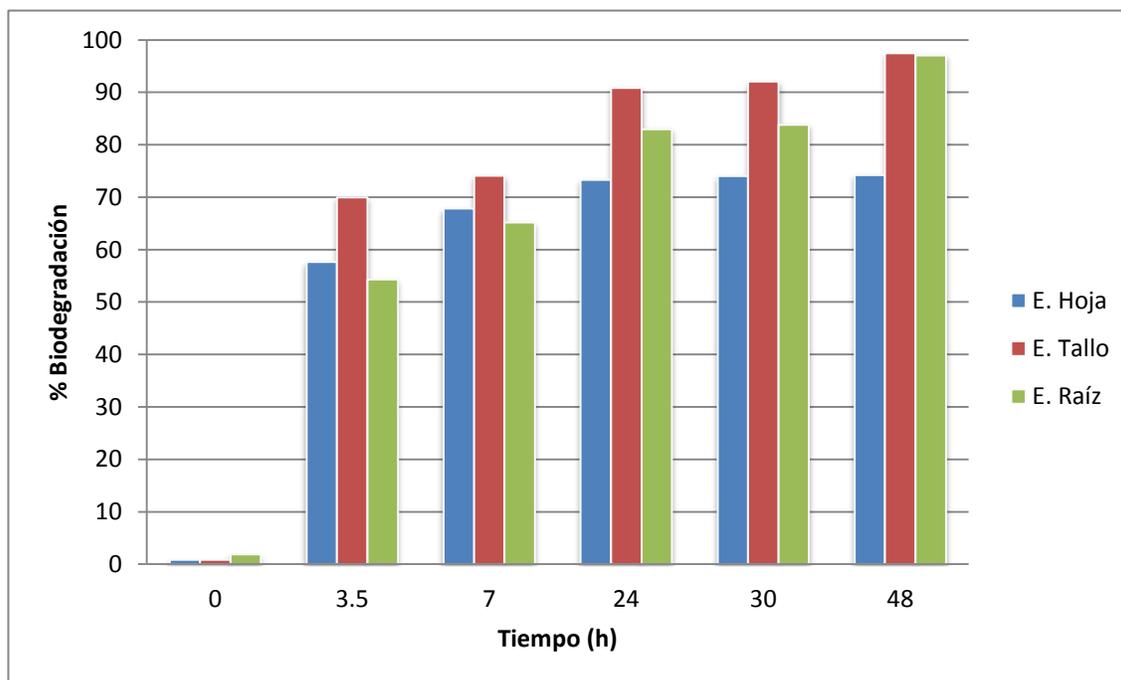


Gráfica 2. Actividad enzimática de la lacasa de los extractos vegetales en los meses de mar-jun., ago., oct., dic 2009 y feb. 2010. La actividad de la enzima se presenta en u/mg

En la gráfica 2 se presenta la actividad enzimática de lacasa de los extractos vegetales, el vegetal con mejor actividad fue la hoja de espinaca con 0.725 u/mg en el mes de febrero, comparándola con la actividad de 0.5 u/mg de una lacasa comercial (EC.1.10.3.2) producida por fermentación sumergida de un *Aspergillus* genéticamente modificado (Solís y col.,2007) la actividad es alta, el tallo la hoja y la raíz de la espinaca presentaron las mejores actividades de lacasa en la gran mayoría de los meses, excepto en octubre, diciembre y febrero en el que la actividad de la raíz de espinaca se ve superada por la actividad lacasa de la hoja de lirio, se puede observar que la actividad del tallo y la raíz de espinaca disminuye de marzo del 2009 a febrero del 2010, en contraste con la hoja de espinaca que va de menos a más.

La actividad lacasa fue muy baja en general, en la mayoría de los extractos, llegando a ser casi nula en el tallo de brócoli, tallo de flor de calabaza, cáscara de rábano, cáscara de tomate verde y cáscara de melón.

2. Extracto concentrado con diferentes concentraciones de índigo carmín

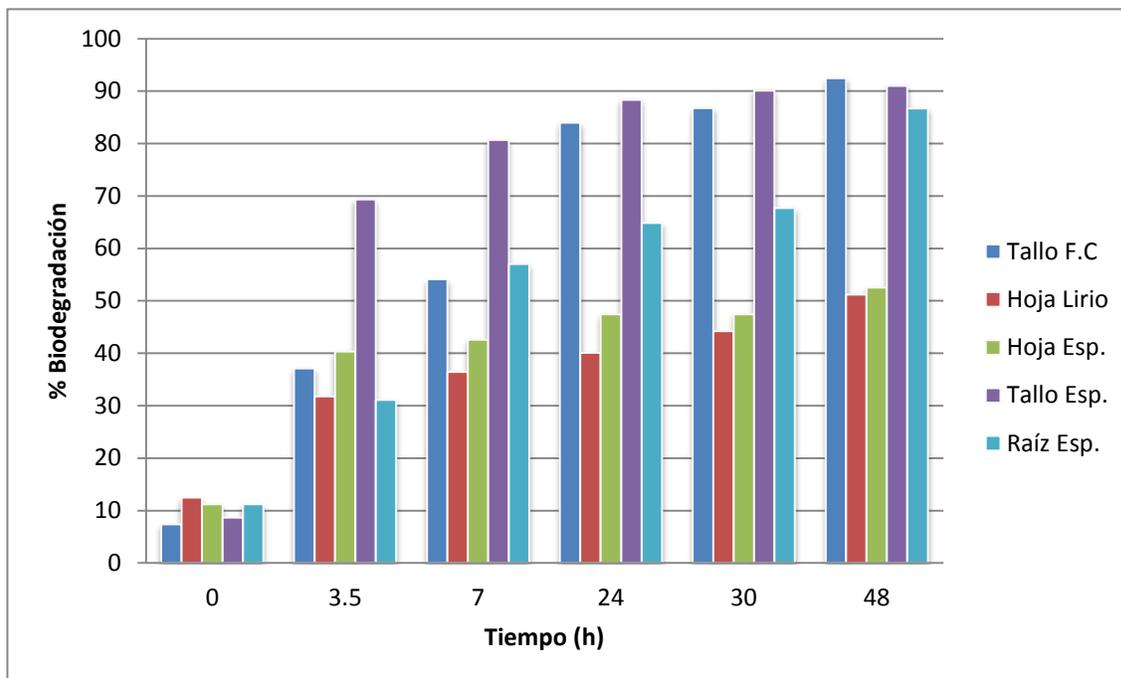


Gráfica 3. Porcentaje de biodegradación del índigo carmín a 500 ppm iniciales con extracto concentrado de la hoja, tallo y raíz de la espinaca en 48 h.

En la gráfica 3 observamos la biodegradación del índigo carmín con 500 ppm de concentración por parte del tallo, la raíz y la hoja de espinaca en un lapso de 48 h.

El tallo de la espinaca tuvo un porcentaje de biodegradación del colorante índigo carmín de 98.5% en 48 h, siendo la parte de la espinaca que mejor resultado tuvo, seguido de la raíz de la espinaca que llegó a presentar un 98% de biodegradación en igual tiempo.

El tallo de la espinaca también presenta el tiempo más rápido de biodegradación ya que a las 3.5 h presenta una biodegradación de 70% mismo que apenas si rebasa la hoja de la espinaca pero en 48 h.



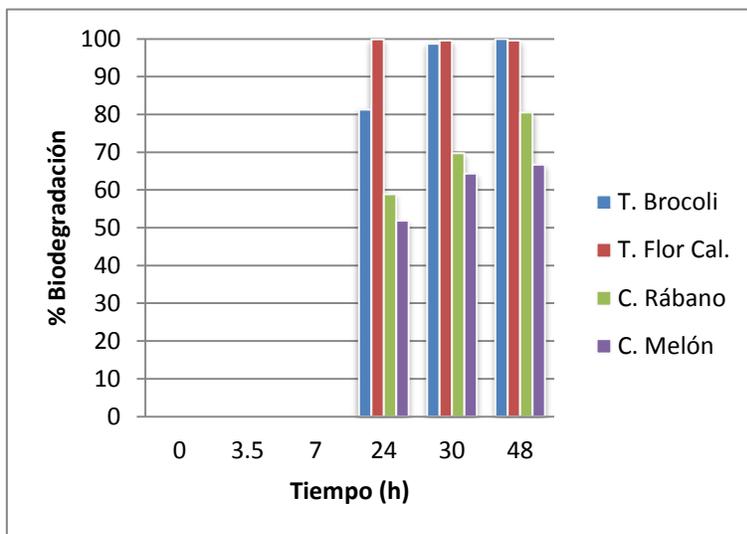
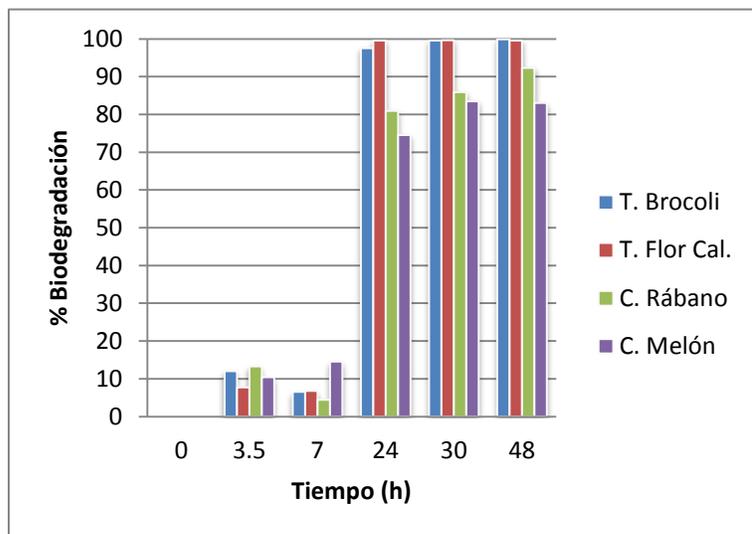
Gráfica 4. Porcentaje de biodegradación del índigo carmín a 1000 ppm iniciales con extracto concentrado durante 48 h.

En la gráfica 4 se puede observar el porcentaje de biodegradación de las diferentes muestras en un plazo de 48 h, el mayor porcentaje de biodegradación lo obtuvo el tallo de flor de calabaza con un 92% en 48 h, seguido del tallo de la espinaca con un 90% de biodegradación y la raíz de espinaca con un 86% en 48 h.

La hoja de lirio y la hoja de la espinaca fueron los vegetales con menor porcentaje de biodegradación llegando a presentar tan solo un 50% y 52% respectivamente en el plazo de 48h.

El tallo de espinaca presentó una biodegradación más rápida a corto plazo ya que tan solo en 3.5 h ya presentaba un 70% de biodegradación mientras que los demás vegetales se mantenían por debajo del 40%, incluyendo el tallo de flor de calabaza que presentó mayor actividad peroxidasa.

La mayor actividad registrada para la enzima peroxidasa, la obtuvo la flor de calabaza y la mayor actividad para la enzima de la lacasa la presentó la hoja de espinaca.



Gráfica 5. Porcentaje de biodegradación del índigo carmín a 1000 ppm iniciales con el extracto concentrado.

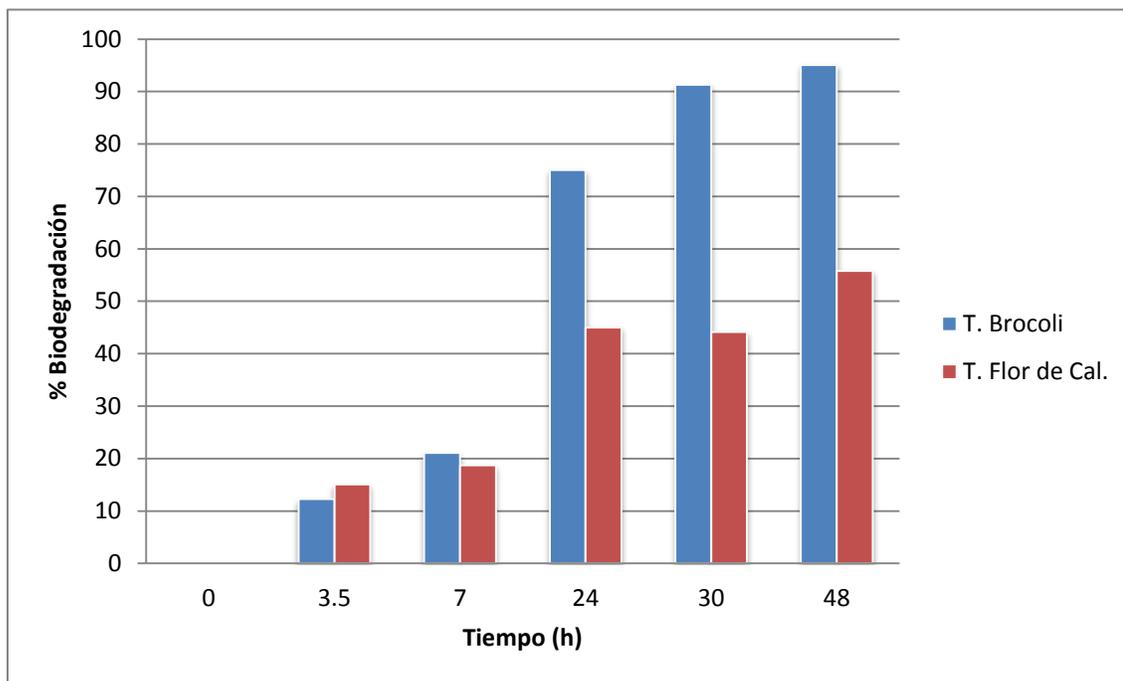
Gráfica 6. Porcentaje de biodegradación del índigo carmín a 2000 ppm iniciales con el extracto concentrado.

El gráfica 5 tenemos los resultados del porcentaje de biodegradación con una concentración inicial de índigo carmín de 1000 ppm y en la gráfica 6 la concentración del índigo carmín es de 2000 ppm.

Podemos observar que en la gráfica 6 no existe una biodegradación en las primeras 7 h a diferencia de la gráfica 5 en la que se puede percibir una degradación a las 3.5 y 7 h, sin embargo a las 24 h podemos observar que la biodegradación en ambas gráficas es muy similar, sobre todo en el tallo de flor de calabaza, mientras que en los demás vegetales hay poca diferencia, teniendo un porcentaje menor los de la gráfica 6.

El extracto del vegetal que resultó como mejor biodegradador fue el tallo de flor de calabaza, llegando a un 100% de biodegradación a las 24 h en ambas concentraciones tanto en la de 1000 ppm y 2000 ppm, el tallo de brócoli tuvo un rendimiento similar pero llegando al 100% en ambas concentraciones a partir de las 30 h.

3. Biorremediación con bagazo



Gráfica 7. Porcentaje de biodegradación del índigo carmín a 1000 ppm iniciales con el bagazo de los vegetales.

En la gráfica 7 tenemos los resultados del porcentaje de biodegradación con bagazo a una concentración inicial de índigo carmín de 1000 ppm.

El bagazo del tallo de brócoli resulta mejor que el bagazo de flor de calabaza en este experimento, ya que como se muestra en la gráfica 7 sus porcentajes de biodegradación son mayores y de mejor tiempo, a las 24 h ya presenta un 75% de biodegradación y en 48 h tiene su mayor biodegradación con un 95% en comparación con el tallo de flor de calabaza con un 55% de biodegradación a las 48 h.

En la figura 11 se puede observar cómo quedan las muestras sometidas a la biodegradación con el bagazo vegetal después del tratamiento de 48 h, se puede observar que la muestra toma un color rojizo. En la figura 12 se observa el proceso de tinción rojiza de las muestras, unas aún permanecen con el color del índigo carmín mientras las muestras de brócoli al ser las que más rápidamente biodegradaron empiezan a tomar el color rojizo.

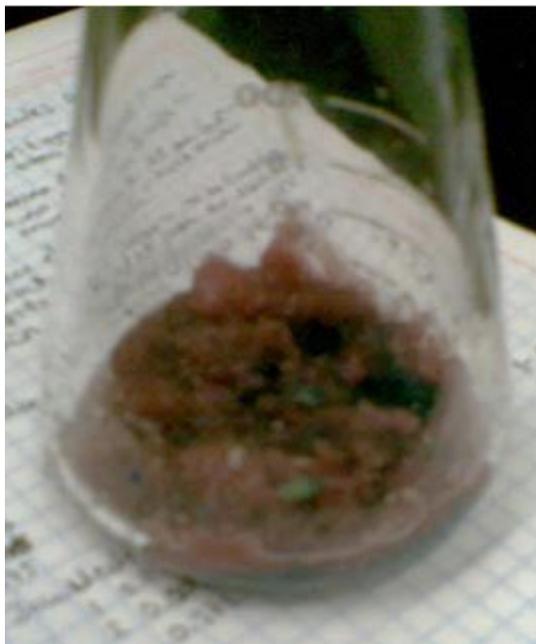


Figura 11. Muestra del bagazo de brócoli con una tinción rojiza.



Figura 12. Muestras en proceso de biodegradación.

En la figura 13 se muestran las celdas para leer en el espectrofotómetro GENESYS 10 UV de barrido después del tratamiento de biodegradación a la solución de índigo carmín.

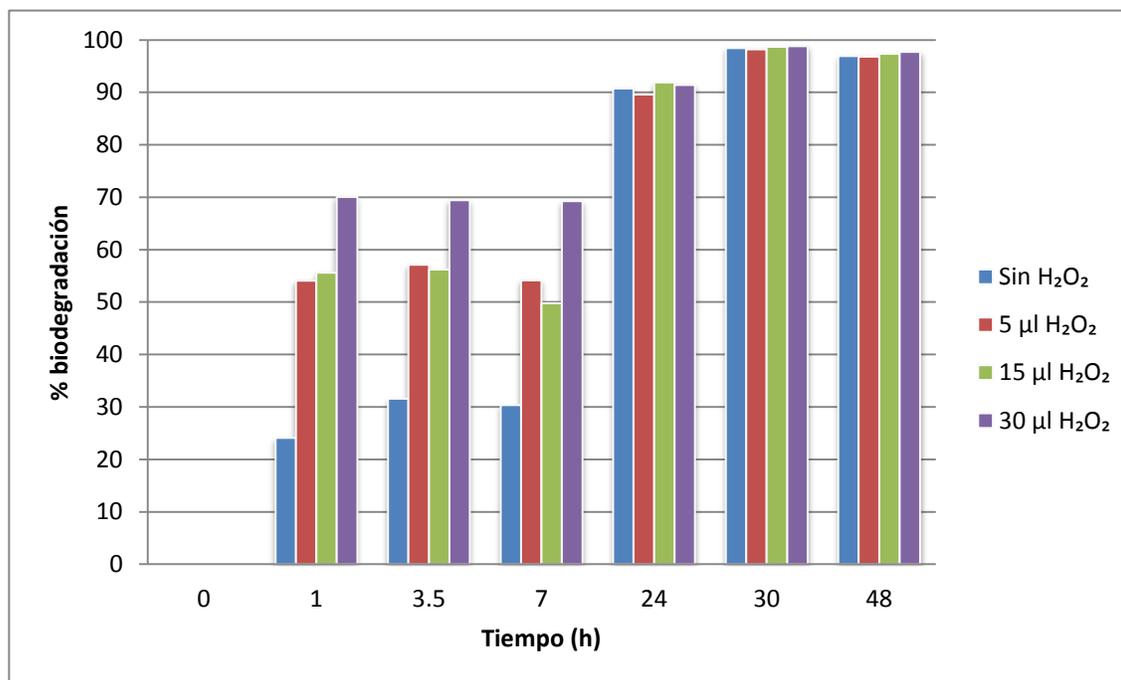


Muestras control

Muestras Bagazo de Brocoli

Figura 13. Muestras del bagazo de brócoli y de la muestra control después de 24 h de biodegradación.

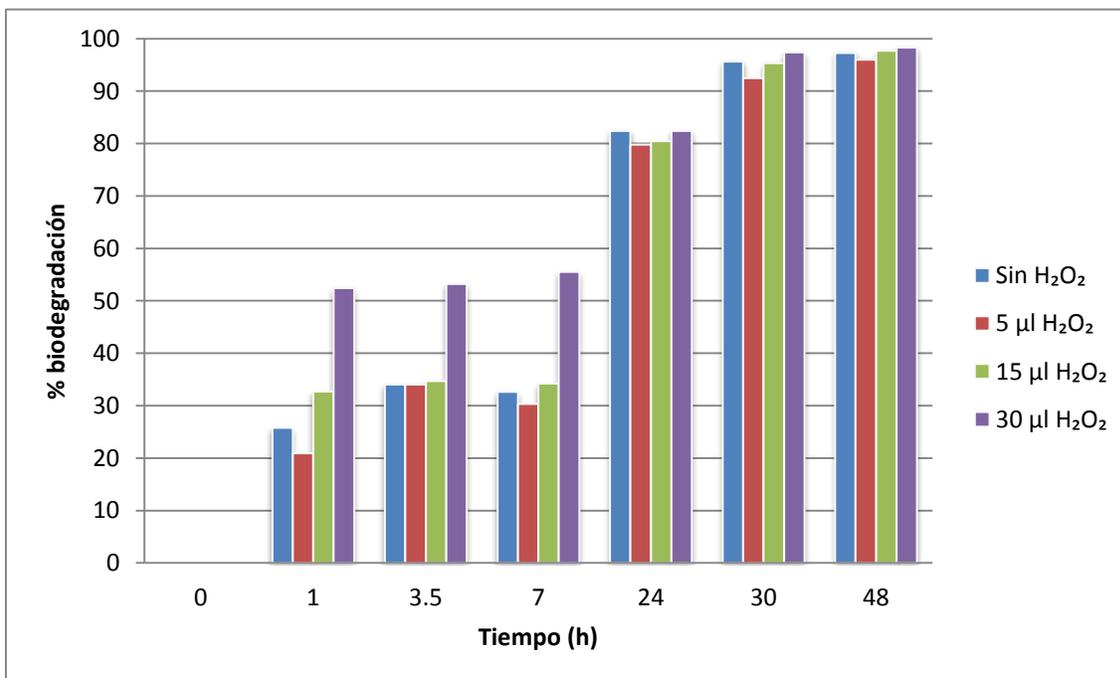
4. Extracto concentrado y bagazo con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno



Gráfica 8. Porcentaje de biodegradación del índigo carmín a 1000 ppm iniciales con extracto concentrado de tallo de flor de calabaza, con 5 µl, 15 µl y 30 µl de H₂O₂ al 30% y sin H₂O₂.

En la gráfica 8 se presentan los resultados de la biodegradación del extracto concentrado del tallo de flor de calabaza con la adición de las diferentes concentraciones de H₂O₂ al 30% y las muestra sin la adición de H₂O₂. Se puede observar de manera muy clara en la gráfica que las muestras que contienen H₂O₂ al 30% biodegradan el índigo carmín de una manera más rápida. Las muestras que contienen 5 y 15 µl de H₂O₂ al 30% presentan un 50% de biodegradación a las 7 h, mientras que la muestra que contiene 30 µl de H₂O₂ al 30% llega a tener un 70% de biodegradación en tan solo 7 h, en comparación con la muestra a la que no se le añadió el H₂O₂ al 30% solo presenta un 30% de biodegradación.

A las 24 h las muestras tanto con H₂O₂ al 30% y sin H₂O₂ al 30% llegan a nivelarse presentando todas las muestras en general un 90% de biodegradación y a las 48 h todas llegan su máximo punto de biodegradación presentando un 98% de biodegradación para las 4 muestras.

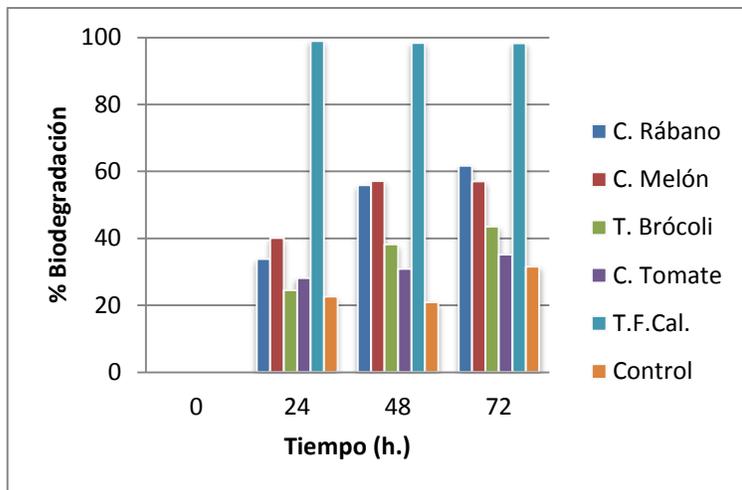


Gráfica 9. Porcentaje de biodegradación del índigo carmín a 1000 ppm iniciales con extracto concentrado de tallo de brócoli, con 5µl, 15µl y 30µl de H₂O₂ al 30% y sin H₂O₂.

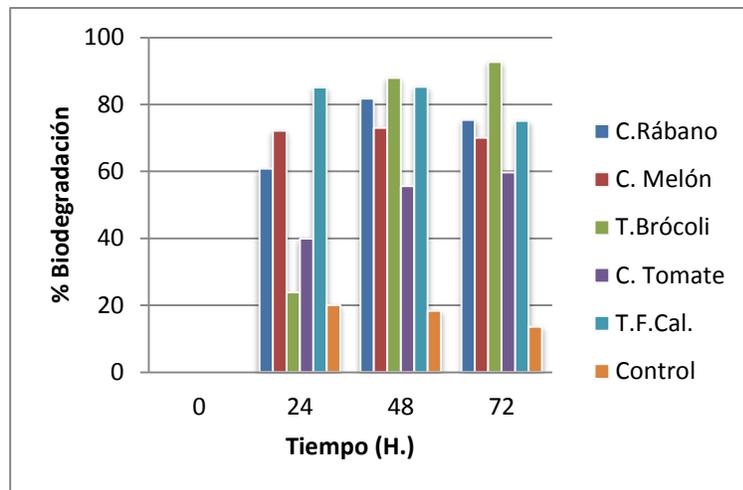
La gráfica 9 muestra los resultados de las muestras con extracto concentrado de tallo de brócoli con la adición de 5µl, 15µl y 30µl de H₂O₂ al 30% y la muestra sin H₂O₂. El patrón de estos resultados es muy similar al que se observa en los resultados de la gráfica 8 con el extracto de la flor de calabaza, ya que las muestras a las que se les añadió el H₂O₂ al 30% presentan una biodecoloración más rápida, sobre todo es más marcado en la muestra a la que se añadieron 30 µl de H₂O₂ al 30% presentando en solo 7 h una biodegradación de 55%.

A diferencia de los resultados de la gráfica 8 el extracto concentrado de tallo de brócoli presenta apenas un 80% de biodegradación en 24 h por parte de sus muestras con y sin H₂O₂ al 30%, la biodegradación es más lenta con este extracto de tallo de brócoli, sin embargo a las 48 h las cuatro muestras presentan un 98% de biodegradación del índigo carmín en solución, teniendo casi la misma efectividad de biodegradación pero más lento en tiempo.

Las biodegradaciones de las gráficas 10, 11, 12 y 13 se llevaron a cabo con extracto concentrado y bagazo vegetal, añadiendo peróxido de hidrógeno en las muestras de las gráficas 10 y 11.



Gráfica 10. Porcentaje de biodegradación con extracto concentrado y H_2O_2 .



Gráfica 11. Porcentaje de biodegradación con bagazo vegetal y H_2O_2 .

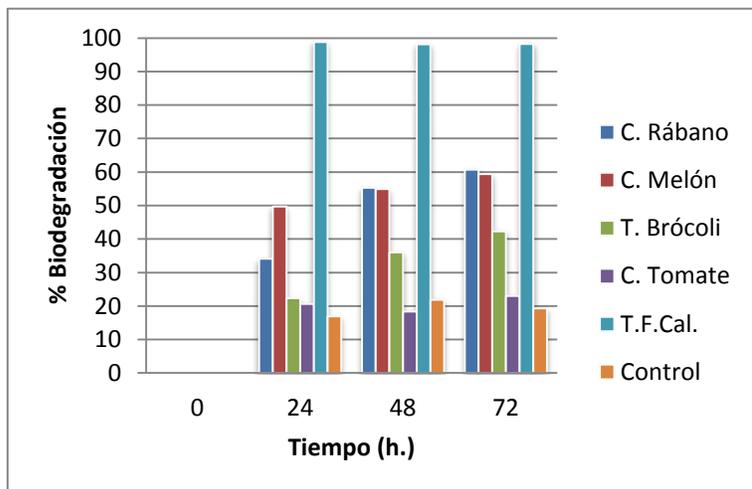
En la gráfica 10 tenemos los resultados del porcentaje de biodegradación con extracto concentrado y en la gráfica 11 las muestras con bagazo vegetal, ambas con peróxido de hidrógeno, obtenidos en un lapso de 72 h. en muestras con una concentración inicial de 1000 ppm de colorante índigo carmín. En las dos gráficas se comparan los resultados con un control que consiste en una solución de colorante y peróxido de hidrógeno.

De manera general podemos observar que la biodegradación con el bagazo vegetal resulta más efectiva que la del extracto concentrado.

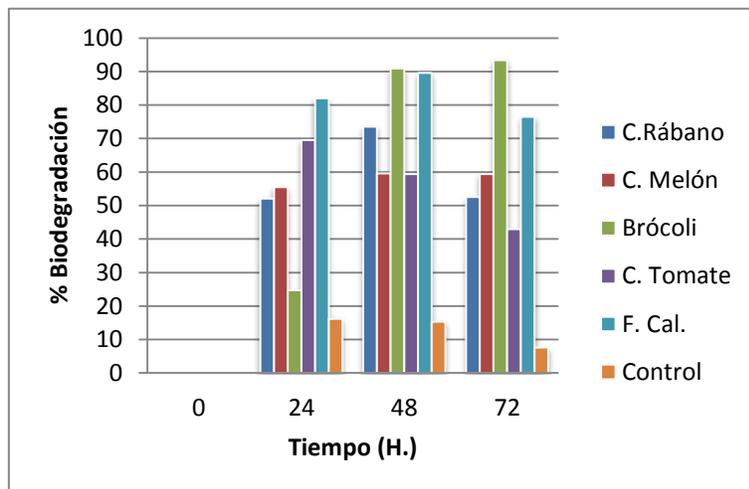
La cáscara de rábano, la cáscara de melón, el tallo de brócoli y la cáscara de tomate verde presentan un mejor desempeño con el bagazo vegetal, contrario a el tallo de flor de calabaza el cuál presenta una mejor biodegradación como extracto concentrado obteniendo un 98% de biodegradación en las primeras 24 h de tratamiento, llegando a ser entre las dos pruebas el mejor porcentaje y tiempo de biodegradación. El tallo de flor de calabaza aparece como el vegetal más regular para la biodegradación ya que llegó a presentar un 98% de biodecoloración en forma de extracto concentrado y en forma de bagazo un 85% a las 24 h.

En la gráfica 11 el bagazo del tallo de brócoli tiene mejor desempeño, como los demás vegetales a excepción del tallo de flor de calabaza y resulta como el vegetal más efectivo para la biodegradación llegando a 92% en 72 h, en contraste con un 43% obtenido en la

forma de extracto en el mismo lapso de tiempo. Este mismo patrón lo presentan los demás vegetales (cáscara de rábano, cáscara de melón y cáscara de tomate verde).



Gráfica 12. Porcentaje de biodegradación con extracto vegetal sin H₂O₂.

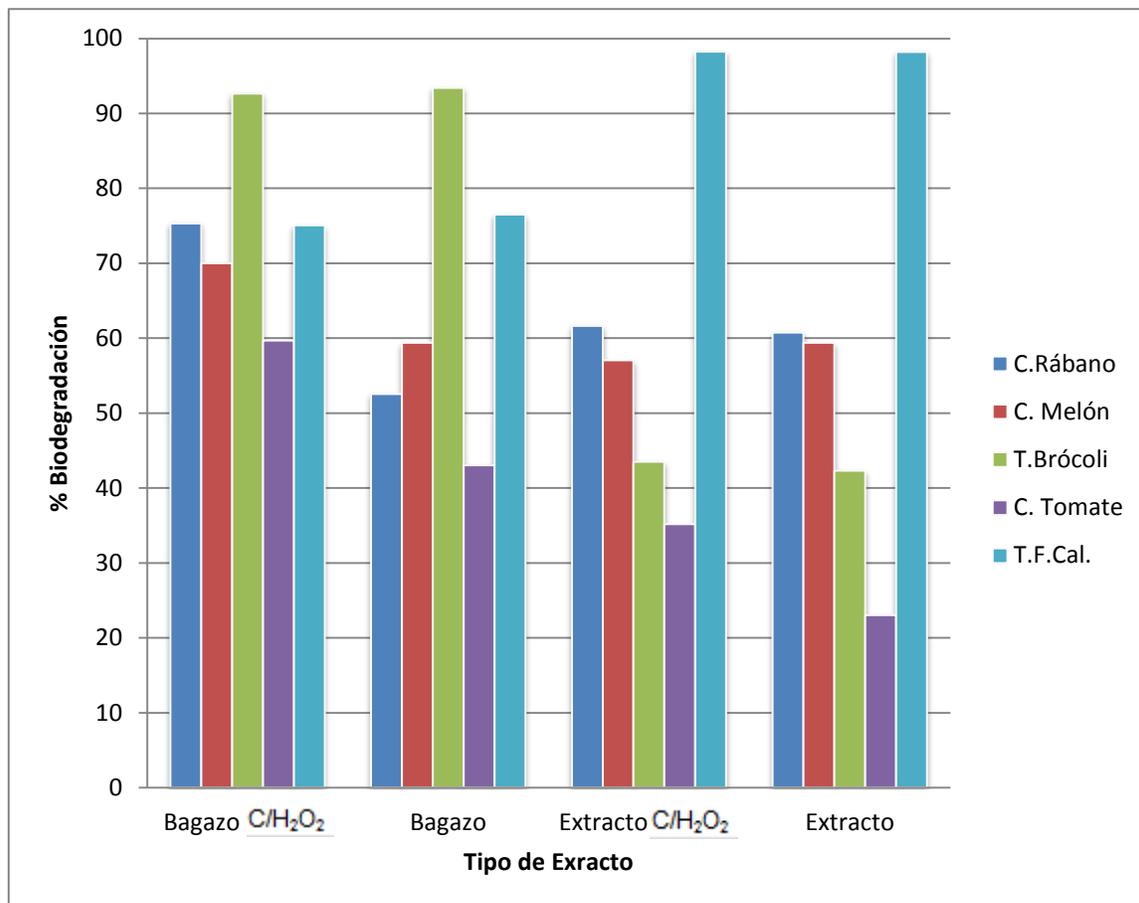


Gráfica 13. Porcentaje de biodegradación con bagazo vegetal sin H₂O₂.

De igual modo que en nuestros resultados anteriores en la gráfica 12 tenemos los resultados del porcentaje de biodegradación con extracto concentrado y en la gráfica 13 los de bagazo vegetal, en este caso a las muestras no se le añadió peróxido de hidrógeno, los resultados también fueron obtenidos en un lapso de 72 h con una concentración inicial de 1000 ppm de colorante índigo carmín.

Se puede observar un comportamiento muy similar en los resultados obtenidos en las gráficas anteriores, con el mismo patrón de mejor efectividad en la degradación con el uso del bagazo vegetal, de igual modo el vegetal con una biodegradación más consistente en ambos procedimientos fue el tallo de flor de calabaza a las 72 h sin mostrar alguna diferencia importante en cuanto al efecto de adición de H₂O₂ 75 µl de H₂O₂ al 0.5 %.

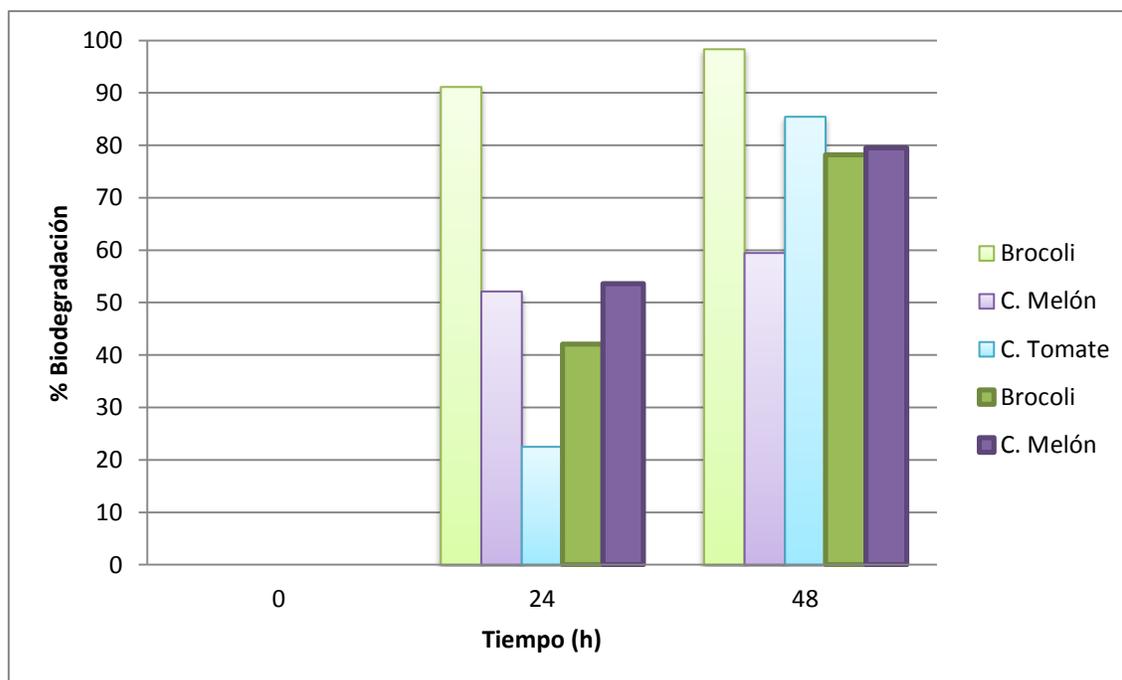
No todos los vegetales se comportan como las flor de calabaza la cual no muestra diferencia en porcentaje de decoloración con y sin peróxido, debido a que los demás vegetales muestran una diferencia en la biodegradación con la adición del peróxido de hidrógeno de manera que el efecto positivo del peróxido de hidrógeno sobre las enzimas peroxidadas se hace notar en todos los vegetales excepto en el tallo de flor de calabaza, como un ejemplo en particular la cáscara de rábano presenta 75% de biodegradación en las muestras de bagazo con H₂O₂ a las 72 h, mientras que sin H₂O₂ en el mismo lapso de tiempo llegó a tener solo un 52% de biodegradación.



Gráfica 14. Comparación del porcentaje de biodegradación entre muestras con y sin peróxido de hidrógeno de bagazo y extracto concentrado.

En la gráfica 14 se sintetiza la comparación entre el trabajo del extracto concentrado y bagazo vegetal que fue utilizado para las biodegradaciones, así como la comparación de muestras con peróxido de hidrógeno y sin peróxido de hidrógeno. En esta gráfica se confirma el mejor funcionamiento del bagazo vegetal sobre el extracto vegetal en la mayoría de los vegetales utilizados exceptuando el tallo de flor de calabaza, y de manera no tan marcada, pero con una diferencia significativa. También observamos en general la mejora de biodegradación en las muestras a las que se les añadió peróxido de hidrógeno.

5. Extracto diluido y extracto diluido directamente con la solución problema a diferentes concentraciones (monitoreo de pH).



Gráfica 15. Porcentaje de biodegradación a 500 ppm con el uso de extracto diluido y con extracto diluido directamente con la solución problema en cada uno de los vegetales.

La gráfica 15 nos muestra la biodegradación de índigo carmín a 500 ppm con los diferentes extractos preparados en un plazo de 24 h, siendo las muestras de color claro las del extracto diluido. La preparación de las muestras con el extracto de la cáscara de tomate verde diluyéndolo directamente con la solución problema, se dificultó, haciendo que estas no arrojaran resultado alguno.

La muestra del extracto diluido de la cáscara de tomate verde llegó a tener un 85% de decoloración en 48 h, la cáscara de melón logró un mejor porcentaje de biodegradación con su extracto directo que con el extracto diluido, llegando a presentar un 80% en extracto directo contra un 50% de biodegradación para su extracto diluido.

El tallo de brócoli fue el vegetal que alcanzó un mayor porcentaje de biorremediación con el extracto diluido, llegando a presentar un 90% de biodegradación en 24 h y 80% de biodegradación con el extracto diluido directamente con la solución problema en el mismo lapso de tiempo.

En la figura 14 se observan las muestras con extracto diluido después 48 h, comparándolas con la muestra control se pudo observar una gran biodegradación por parte del extracto vegetal de las muestras, la muestra con el extracto diluido del brócoli es la más clara comprobándose los resultados de la gráfica 15.



Figura 14. Muestras con extracto diluido de la cáscara de tomate verde, cáscara de melón y tallo de brócoli después de 48 h de biodegradación comparadas con la muestra control de índigo carmín.

En la figura 15 observamos las muestras del extracto diluido directamente con la solución problema de la cáscara de melón y el tallo de brócoli junto con la muestra control de índigo carmín. La muestra de cáscara de tomate verde no pudo ser preparada debido a que la cáscara de tomate verde fue muy difícil de manipularse. Se puede observar que después de 48 h hay biodegradación de índigo carmín por parte de las peroxidasas y lacasa que se encuentran en los extractos de la cáscara de melón y el tallo de brócoli.

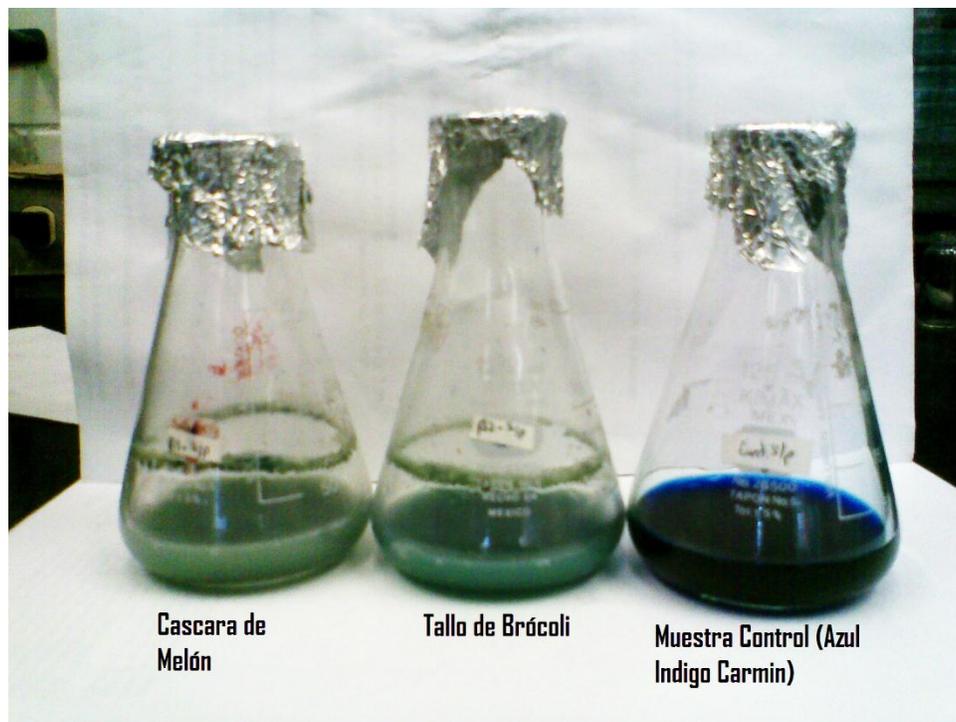
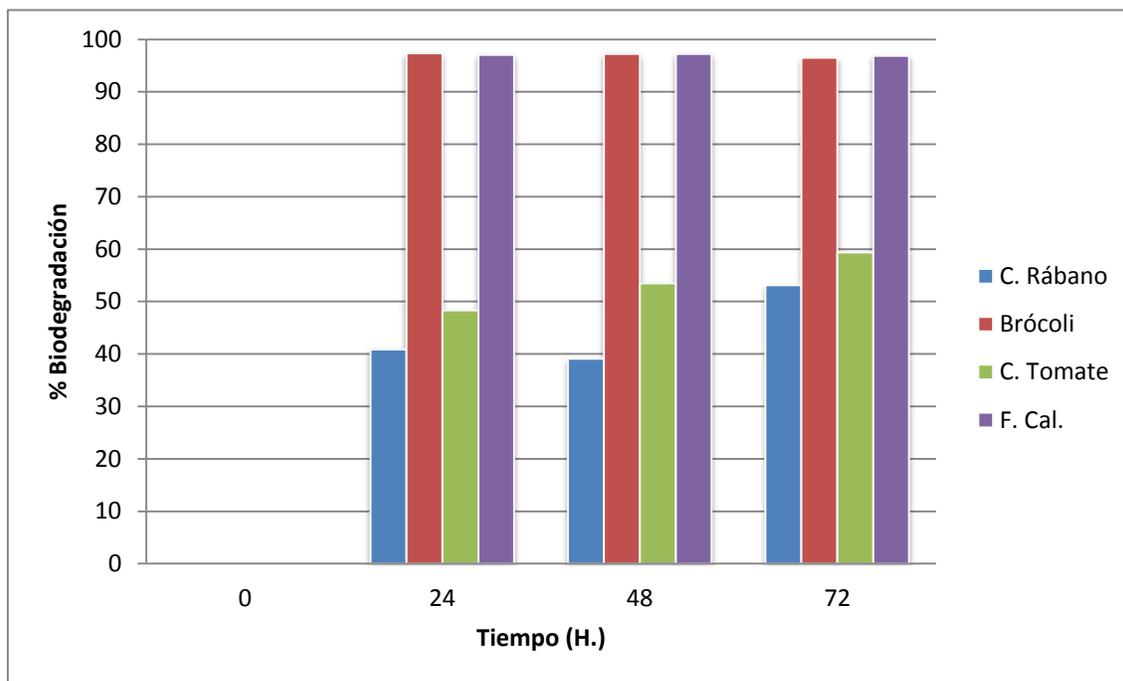
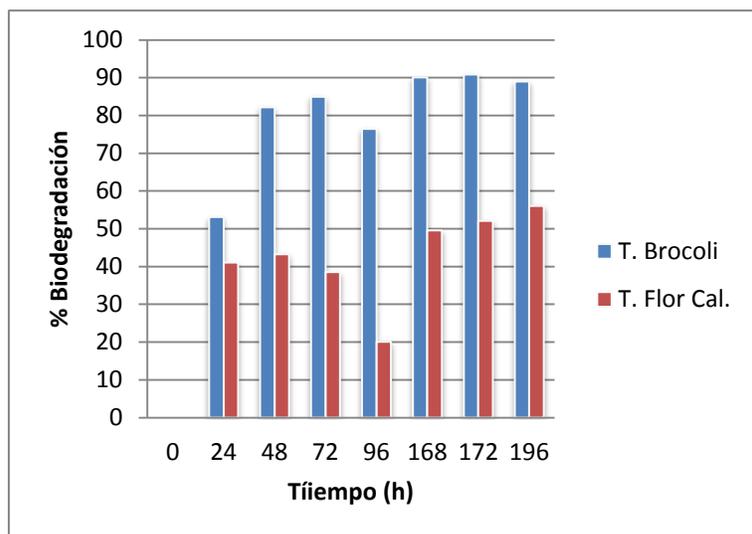


Figura 15. Muestras con extracto diluido directamente con la solución problema de la cáscara de melón y tallo de brócoli después de 48 h de biodegradación comparadas con la muestra control.

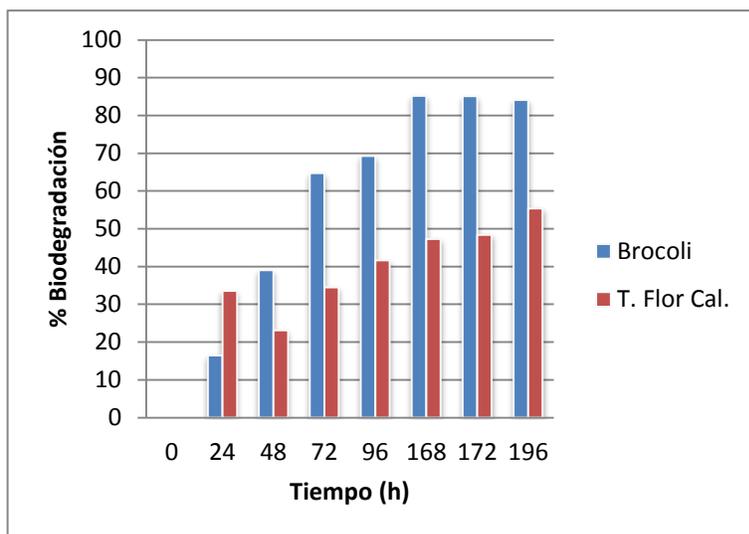


Gráfica 16. Porcentaje de biodegradación del índigo carmín a 1000 ppm iniciales con extracto diluido directamente con la solución problema durante 72 h.

En la gráfica 16 observamos la biodegradación con extracto diluido directamente con la solución problema con 1000 ppm de concentración en un lapso de 72 h, se puede notar de inmediato cuales son los vegetales que obtuvieron un mejor tiempo y porcentaje de biodegradación, el tallo de brócoli y el tallo de flor de calabaza. Ambos vegetales han venido presentando resultados similares y favorables para la biodegradación del azul índigo carmín. En este experimento llegaron a biodegradar un 97% de la solución de índigo carmín en tan solo 24 h, en comparación con la cáscara de rábano y la cáscara de tomate verde que tan solo llegan a presentar 50% y 60% de biodegradación respectivamente en un lapso de 72 h.

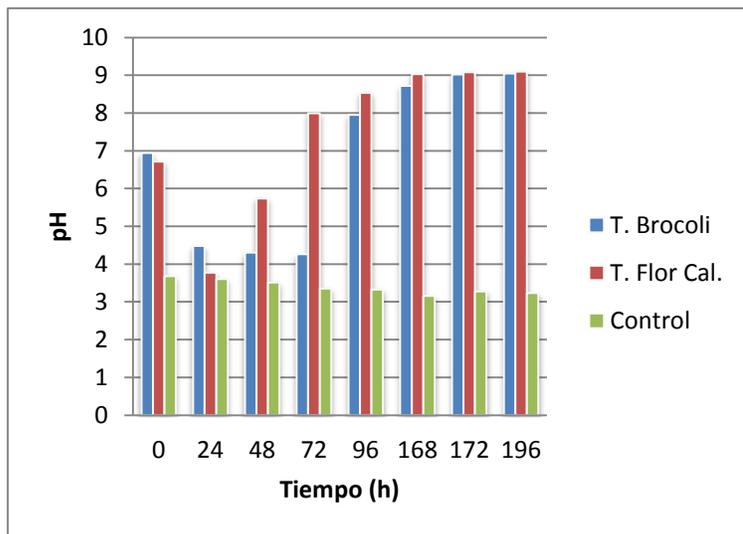


Gráfica 17. Porcentaje de biodegradación con el extracto diluido de cada vegetal en 196 h.

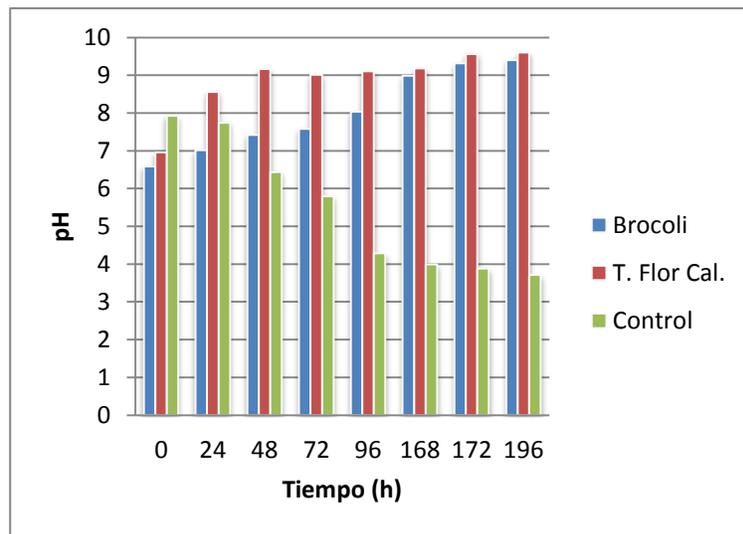


Gráfica 18. Porcentaje de biodegradación con el extracto diluido directamente con la solución problema de cada vegetal en 196 h.

El gráfica 17 tenemos los resultados del porcentaje de biodegradación con extracto diluido y en la gráfica 18 los de extracto diluido directamente con la solución problema. El tallo de brócoli muestra una mejor biodegradación en su extracto líquido con un 90% de biodegradación a las 196 h en una solución de 2000 ppm de índigo carmín, una gran diferencia que se puede observar es el tiempo de biodegradación ya que a las 24 h el tallo de brócoli presenta un 53% de biodegradación mientras que en la gráfica 2 apenas presenta un 16% de biodegradación en el mismo tiempo. El tallo de flor de calabaza presenta un ligera diferencia entre su extracto líquido y el extracto que se diluyó directamente con la solución problema, en la gráfica 17 presenta su mejor porcentaje de biodegradación llegando a 56% a las 196 h mientras que en la gráfica 18 tiene un 55% en el mismo tiempo, la velocidad de biodegradación es muy similar también en el tallo de flor de calabaza.



Gráfica 19. Comportamiento del pH en las muestras con extracto diluido.



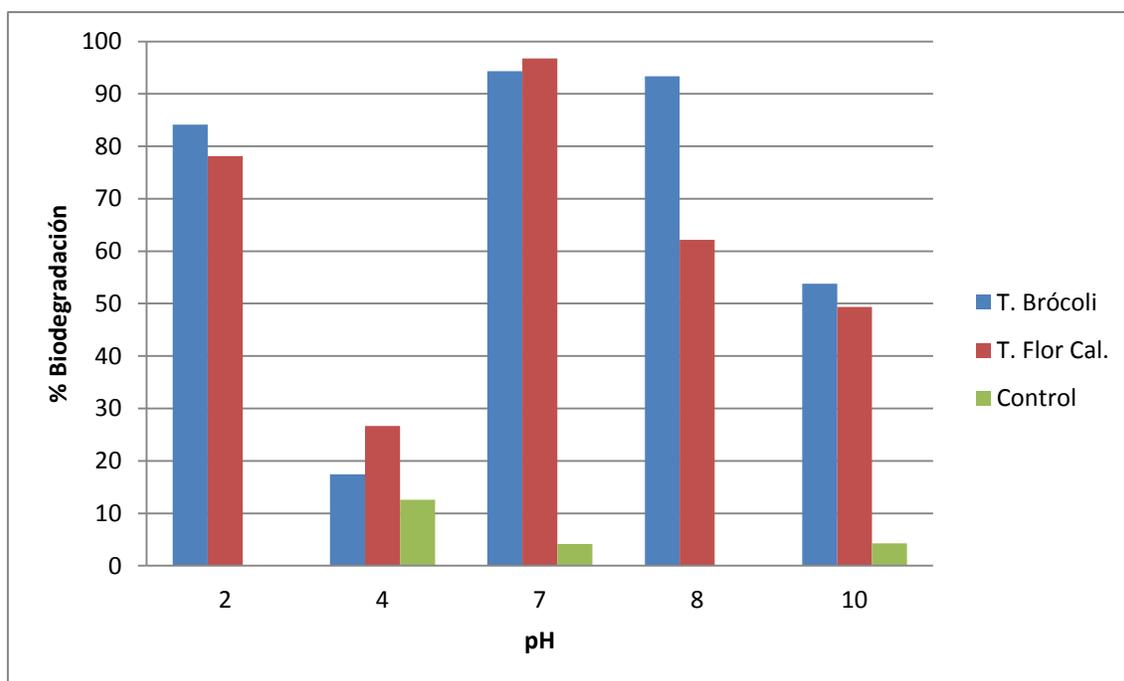
Gráfica 20. Comportamiento del pH en las muestras con extracto diluido directamente con la solución problema.

El comportamiento del pH en las muestras tiene un patrón similar en ambas gráficas ya que las muestras de biodegradación tienden a tener un pH básico mientras que las muestras control tienden a tener un pH ácido, en las muestras de la gráfica 19 el pH de la muestra control empieza ácido y se mantiene ácido hasta llegar a presentar un pH de 3 a las 196 h, en la gráfica 20 el pH de las muestras tanto las de biodegradación como la muestra control empiezan con un pH más básico, en la gráfica 20 se puede observar como la muestra control tiende a tener un pH más ácido, presentando un pH de 3.5 a las 196 h, las muestras del extracto diluido (gráfica 19) empiezan más ácidas, terminando en un pH básico de 9 tanto el tallo de brócoli como el tallo de flor de calabaza, en las muestras de extracto diluido directamente con la solución problema empiezan más básicas manteniéndose de ese modo hasta presentar un pH de 9.5 en las muestras del tallo de brócoli y flor de calabaza.

Se trabajó a temperatura ambiente y las muestras presentaron una temperatura.

6. Extracto concentrado con diferentes valores de pH

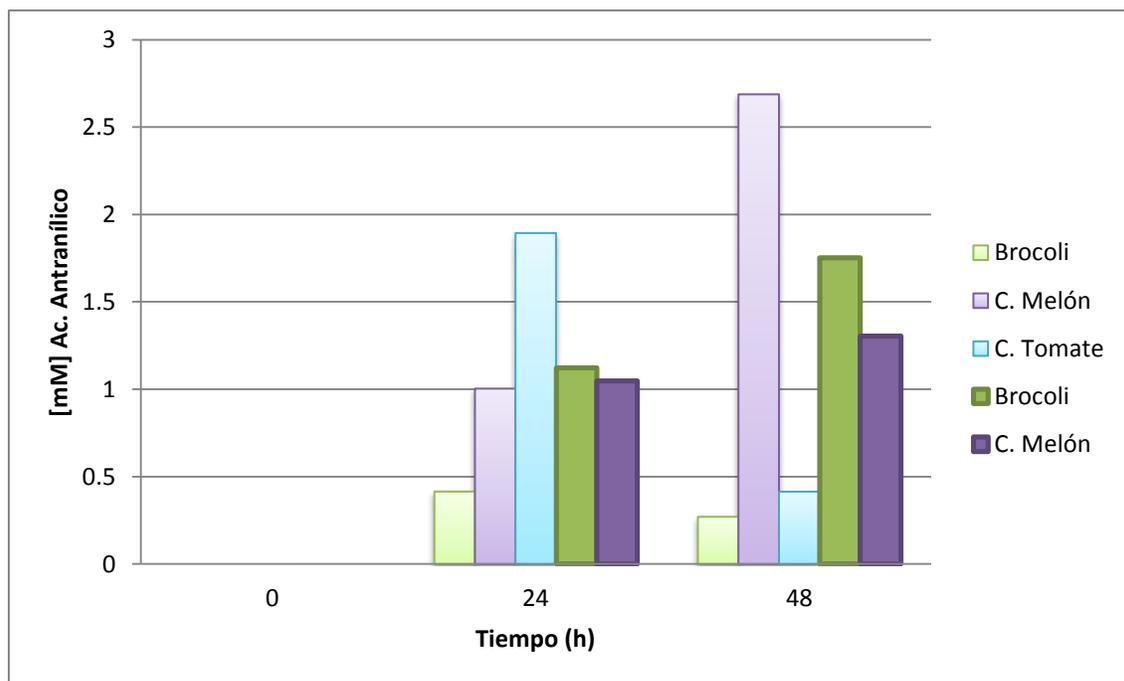
En la gráfica 21 se muestran los resultados de la biodegradación del índigo carmín a 500 ppm con diferentes pH (2, 4, 7, 8 y 10) después de 4 h de tratamiento, para los vegetales tallo de brócoli y tallo de flor de calabaza. Se puede observar que existe un patrón similar en ambos vegetales, dando como resultado al pH 7 en ambos vegetales como el más adecuado para obtener mejores valores de biodegradación con estos vegetales.



Gráfica 21. Porcentaje de biodegradación del índigo carmín a 500 ppm iniciales con extracto concentrado del tallo brócoli y tallo de flor de calabaza a diferentes pH en un plazo de 4h.

En el caso de las muestras del tallo de brócoli la muestra con pH 8 llega a presentar un 94% de biodegradación muy cerca al porcentaje presentado en el pH 7 con 96% de biodegradación, en la parte ácida de los pH el mejor porcentaje de biodegradación lo presenta el pH 2 con un 87% de biodegradación. Para las muestras del tallo de flor de calabaza se puede observar también que el pH 7 presenta un 96% de biodegradación mientras que en el pH 2 llega a tener un 83% de biodegradación, se puede observar de manera general que los pH básicos son más adecuados para el trabajo de biodegradación del índigo carmín por parte de las peroxidasas y lacasas ya que el pH 8 y 10 presentan entre 60% y 90% de biodegradación mientras que el pH 4 no rebasa el 25% de biodegradación en ninguno de los dos vegetales utilizados.

7. Búsqueda de ácido antranílico



Gráfica 22. Cantidad detectada de ácido antranílico en las muestras después de 24 y 48 h de biodegradación (las barras de color claro pertenecen a las muestras con extracto diluido).

En la gráfica 22 aparece la cantidad de ácido antranílico que se detectó a lo largo de la biodegradación del índigo carmín del experimento de la gráfica 15. El vegetal que más concentración de ácido antranílico presentó fue la cáscara de melón en forma de extracto diluido con 2.6 mM, seguido por la cáscara de tomate verde con 1.8 mM de ácido antranílico a las 24 h que posteriormente esta concentración disminuyó hasta 0.41 mM a las 48 h, esta disminución se atribuye a que el ácido antranílico empieza a reaccionar con otras sustancias que hay en la muestra reduciendo así su concentración. Finalmente en las muestras del tallo de brócoli del extracto diluido directamente con la solución problema se detectó mayor concentración de ácido antranílico con 1.75 mM en un lapso de 48h, en sus muestras de extracto diluido se detectó apenas 0.41 mM en 24 h y 0.27 en 48 h, como se mencionó antes el ácido antranílico puede estar reaccionando con algunos de los compuestos que hay en las muestras y debido a que el tallo de brócoli fue el vegetal con mayor biodegradación (gráfica 15) del índigo carmín en menos tiempo, el ácido antranílico que se formó reaccionó de manera más rápida disminuyendo de esa manera su concentración al término del experimento.

La búsqueda de ácido antranílico también se realizó por medio de placas cromatográficas con las muestras de los resultados de la gráfica 4, la extracción se aplicó a las muestras de biorremediación y a los controles que solo contienen el extracto de cada vegetal para cerciorarnos de que en el extracto no se forme un producto con las características parecidas al ácido antranílico. En la figura 16 observamos las diferentes muestras corridas con acetato de etilo reveladas con una lámpara de luz ultravioleta y en la figura 17 se muestra la placa cromatográfica sin ningún revelador, el orden de las muestras en las figuras 16 y 17 es el siguiente:

- 1) Ácido antranílico para la figura 16 e índigo carmín en figura 17.
- 2) Biorremediación con extracto concentrado del tallo de flor de calabaza.
- 3) Extracto concentrado del tallo de flor de calabaza.
- 4) Biorremediación con extracto concentrado del tallo de espinaca.
- 5) Extracto concentrado del tallo de espinaca.
- 6) Biorremediación con extracto concentrado de la hoja de espinaca.
- 7) Extracto concentrado de la hoja de espinaca.

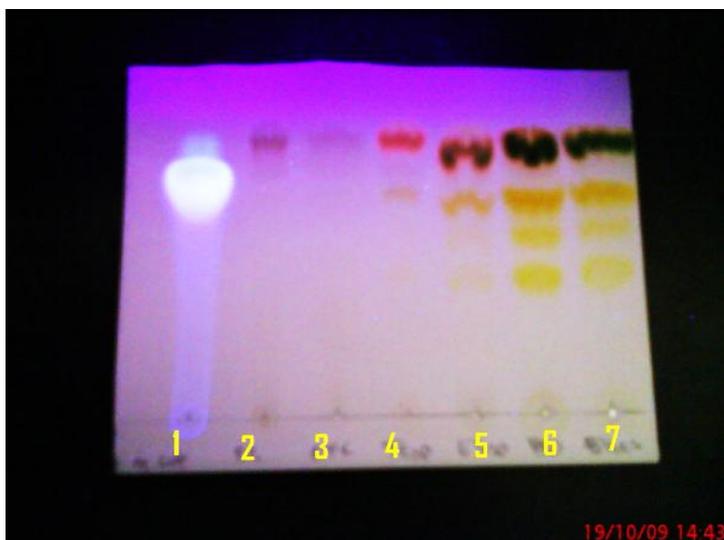


Fig. 16. Cromatografía de las muestras extraídas con éter, reveladas con la lámpara de cromatografía en el modo de longitud larga.

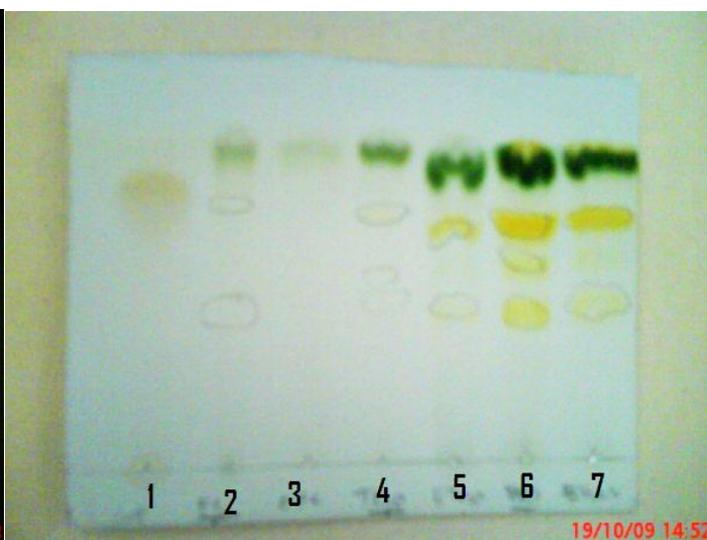


Fig. 17. Cromatografía de las muestras extraídas con éter, sin revelar.

En la figura 16 se puede observar un punto luminiscente a 3.5 cm de distancia del punto de aplicación, que es el ácido antranílico, también podemos observar que el extracto del vegetal no presenta un producto con las características parecidas la ácido antranílico que nos pueda llevar a alguna confusión. En la figura 17 se puede observar de la formación de 4 compuestos distintos en las muestras 5, 6 y 7.

Figura 18. Cromatografía de las muestras (gráfica 4) sin aplicarles el tratamiento de extracción, corridas con acetato de etilo. En esta cromatografía la referencia fue el índigo carmín. En esta cromatografía se puede observar que el carril uno donde se aplicó índigo carmín aparece un punto luminiscente indicando la presencia de ácido antranílico ya que corre a la misma distancia (3.5 cm). Se puede confirmar que el colorante índigo carmín da como resultado en su degradación al ácido antranílico.

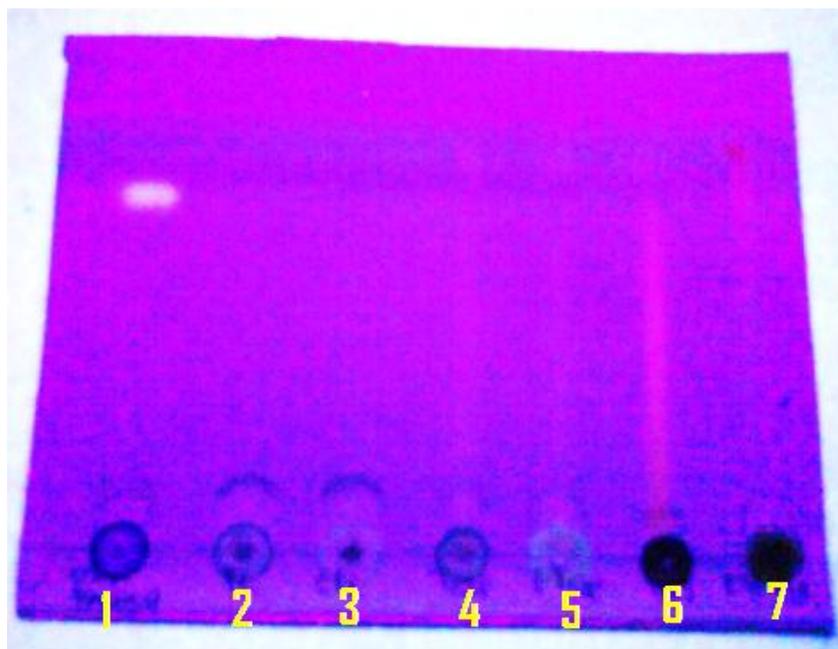


Fig. 18. Cromatografía aplicada a las muestras sin tratamiento de extracción.

La degradación del colorante índigo carmín se produjo al dejar la muestra control de índigo carmín a 1000 ppm, en un lapso de 48 h. La aplicación para la placa cromatográfica se realiza de manera directa sin darle un tratamiento a dicha muestra.

El ácido antranílico se obtuvo de una solución de ácido antranílico, y se aplicó de manera directa a la placa de cromatografía.

La cromatografía en capa fina se aplicó a la muestra del extracto diluido del tallo de brócoli por que fue el vegetal con mejor biodegradación del índigo carmín en los resultados de la gráfica 15, como el extracto no estaba concentrado la biorremediación es más lenta, esto provoca que los productos que se forman de la biodegradación del índigo carmín se formen más lento, dándonos tiempo de aplicarle a la muestra el tratamiento para identificar el ácido antranílico que se forme, antes de que este empiece a reaccionar con otros compuestos de la muestra y desaparezca.

En la figura 19 aparece la cromatografía corrida con acetato de etilo, se puede observar que la muestra extraída del tallo de brócoli brilla de un modo menos intenso que la del ácido antranílico, se puede observar la presencia de ácido antranílico en la muestra mediante esta cromatografía.



Figura 19. Cromatografía en placa fina del ácido antranílico (1) y el extracto diluido del tallo de brócoli (2), corrida con acetato de etilo.

VI. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Actividad enzimática

Los vegetales que presentaron mayor actividad enzimática peroxidasa resultaron ser los más eficientes para la biodegradación, se mostró que un vegetal con buena actividad enzimática peroxidasa (arriba de 35 u/g) tiene buenos resultados de biodegradación.

Por otra parte los vegetales que presentaron mejor actividad enzimática lacasa no fueron los mejores biodegradadores, en este caso podemos afirmar que la actividad enzimática lacasa de dichos extractos no está directamente relacionada con la biodegradación del colorante, como ha ocurrido en otros experimentos (Wong y Yu, 1999).

Extracto concentrado con diferentes concentraciones de índigo carmín

Las biorremediaciones que se realizaron con solo el extracto concentrado de los vegetales resultaron muy eficientes, la variación de las concentraciones del índigo carmín (500, 100 y 200 ppm) no resultaron ser un factor que determine la velocidad o reactividad de biodegradación de los extractos, ya que todos los extractos presentan una buena biodegradación después de 7 h.

En todas las pruebas realizadas a partir de las 24 h la mayoría de los extractos ya ha tenido su mejor porcentaje de biodegradación, entre 90 y 95%, quizá el tiempo de biodegradación con esta metodología es un poco extenso, en comparación con métodos químicos como ozono, ozono combinado con radiación UV, peróxido de hidrógeno/UV y fotocatalisis heterogénea (2 a 6 horas) (Mansilla, *et. al.*, 2005) pero la aplicación y obtención de las enzimas es mucho más económico en términos costo-beneficio (Matías, *et. al.*, 2002).

Biorremediación con bagazo

El bagazo de los vegetales utilizados demostró tener un funcionamiento parecido al extracto concentrado de los vegetales, se logra la biodegradación del índigo carmín (1000 ppm) pero de un modo más lento, se demostró que tanto la parte sólida como la líquida, contienen enzimas (lacasa y peroxidasa) que pueden trabajar para la biodegradación del colorante índigo carmín.

En este método se aprovecha el desecho sólido del vegetal, del cual, se realizó la extracción de las enzimas solubles por medio de su extracto, lo que nos permite utilizar buena parte del vegetal.

Extracto concentrado y bagazo con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno

La adición de peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones, en muestras con extracto concentrado demostró que la biodegradación puede acelerarse, activando las enzimas (peroxidasas) presentes en el extracto concentrado y el bagazo.

El método que arrojó mejores resultados al agregar el peróxido de hidrógeno, entre el extracto concentrado y el bagazo vegetal, fueron las muestras de bagazo, ya que biodegradaron con mayor velocidad y obtuvieron mejor porcentaje en biodegradación en un tiempo de 72 h.

Se realizaron pruebas sin peróxido de hidrógeno tanto a las muestras con bagazo vegetal como a las de extracto concentrado, los resultados fueron muy parecidos en ambos casos, sin embargo se notó un aumento en la velocidad de biodegradación del índigo carmín en las muestras que contenían peróxido de hidrógeno.

Extracto diluido y extracto diluido directamente con la solución problema a diferentes concentraciones (monitoreo de pH)

Los métodos para diluir el extracto y preparar las muestras diluyendo directamente la solución modelo en el vegetal para realizar el extracto resultó ser negativo para la biodegradación, ya que el tiempo de biodegradación se alarga y no se alcanzan porcentajes de biodegradación elevados como con el bagazo y el extracto concentrado.

En estas biorremediaciones se monitoreó el pH de las muestras, se trabajó a temperatura ambiente, después de la biodegradación las muestras tienden a tener un pH básico por lo cual se decidió realizar las biorremediaciones con diferentes pH e investigar cual es el mejor valor para las biodegradaciones, con extractos concentrados.

Extracto concentrado con diferentes valores de pH

Las muestras trabajadas con diferentes valores de pH demostraron que un pH neutro (7) es el más adecuado para este tipo de biodegradaciones, el pH 8 también resultó ser un valor favorable para la biodegradación y en tercer lugar el pH 2 presenta un buen porcentaje de biodegradación después de 4 h. Podríamos decir que existe una ausencia de actividad lacasa en los extractos utilizados en este método, ya que diversos autores (Amézquita, M. *et. al.*, 2009; Khammuang, *et. al.*, 2008) manejan que el pH óptimo para la enzima lacasa es en un rango de 3-5, concluyendo que los valores de pH antes mencionados pueden aplicarse para las enzimas peroxidasas presentes en los extractos.

Búsqueda de ácido antranílico

Se ha comprobado experimentalmente (Ramya, *et. al.*, 2007) que la descomposición del índigo carmín da como resultado ácido antranílico e isatina, se realizó la cuantificación del ácido antranílico en las diferentes muestras del experimento de la gráfica 15 y se encontró que la concentración aumentaba conforme la biodegradación del colorante era mayor, concluyendo que si hay formación de ácido antranílico al biodegradarse el índigo carmín.

La búsqueda de ácido antranílico, después de un tratamiento de biodegradación del índigo carmín se realizó mediante la aplicación de una cromatografía en capa fina, la primera prueba fue realizada con una solución control que contenía solo índigo carmín, dándonos resultados positivos decidimos aplicarla a la solución de una de las mejores biodegradaciones para su análisis, la mejor biodegradación fue elegida con los siguientes parámetros:

- Haber presentado un porcentaje de biodegradación de 95 a 100 % en menos de 30 h.
- La muestra debe tener una apariencia totalmente decolorada.
- Muestra sin peróxido de hidrógeno ni solución buffer.
- Muestra con una solución de índigo carmín con una concentración no menor a 100 ppm.

El resultado fue similar a la placa tomada a una solución patrón de índigo carmín, teniendo los mismos resultados podemos concluir que existe la formación del ácido antranílico al biodegradarse la solución índigo carmín, confirmando los resultados de Ramya y colaboradores (2007).

VII. CONCLUSIONES

Se comprobó la biodegradación del colorante textil índigo carmín con el uso de diferentes formas de extractos vegetales que contienen enzimas peroxidasa y lacasa en sus tejidos.

El tallo, la raíz, hoja de espinaca y la hoja de lirio acuático fueron los vegetales que presentaron mejor actividad lacasa y el tallo de brócoli y el tallo de flor de calabaza fueron los vegetales con mejores registros de actividad peroxidasa.

Se demostró que los vegetales utilizados en las biorremediaciones presentaron actividad peroxidasa notable, pero la mayoría presentó una actividad lacasa muy baja o casi nula.

Las diferentes concentraciones (500, 1000 y 2000 ppm) de la solución problema utilizadas en las biorremediaciones fueron biodegradadas en mayor o menor tiempo, sin que alguna de estas concentraciones inhiba las enzimas presentes en el extracto vegetal.

La adición de peróxido de hidrógeno a las biorremediaciones, aumento la velocidad de biodegradación del colorante índigo carmín, este fenómeno se pudo notar más favorable para el bagazo de los diferentes vegetales ya que obtuvo mejor tiempo y porcentaje de biodegradación que con extracto concentrado a excepción del tallo de flor de calabaza.

El extracto concentrado es el mejor método para realizar las biodegradaciones ya que aparte de ser más fácil de obtener presenta los mejores tiempos de biodegradación.

En la biorremediación con el extracto diluido directamente con la solución problema, se observó una absorción del colorante por parte del tejido vegetal del extracto.

El pH 7 es el más adecuado para realizar las biorremediaciones para el extracto concentrado del tallo de flor de calabaza y el extracto concentrado del tallo de brócoli.

La presencia de ácido antranílico como indicativo de la biodegradación del colorante índigo carmín pudo corroborarse por cromatografía en capa fina.

VIII. RECOMENDACIONES

- Estudiar la absorción del colorante por parte del bagazo vegetal.
- Manejar un rango más amplio de concentraciones de peróxido de hidrógeno mayores a las que se aplicaron en este estudio.
- Estudiar si los productos finales de las diferentes biorremediaciones son nocivos para la salud e investigar qué proceso se puede aplicar para su neutralización y manejo adecuado de estas sustancias.
- Repetir el experimento con un mayor rango de pH básicos y ácidos.
- Realizar el análisis de los productos (ácido antranílico) por medio de HPLC, e identificar en que tiempo hay una mayor producción de estos en las biodegradaciones.
- Medir la actividad enzimática tanto peroxidasa como lacasa de las diferentes partes de cada vegetal (tallo, raíz y hojas).
- Estandarizar las características de los vegetales a utilizar, conocer su procedencia y condiciones físicas del vegetal.
- En las biorremediaciones con bagazo vegetal proponer que hacer con el bagazo utilizado después de la degradación e investigar si no es un desecho peligroso.

BIBLIOGRAFÍA

- Abalulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K.H., Cavaco-Paulo, A. y Gubitz, G.M. 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3357-3362.
- Aguedach A. 2005. Photocatalytic degradation of azo-dyes reactive black 5 and reactive yellow 145 in water over a newly deposited titanium dioxide. *Applied Catalysis B: Environmental.* 57; 55-62.
- Ajibola, V.O., Oniye, S.J., Odeh, C.E., Olugbodi, T. y Umeh, U.G. 2005. Biodegradation of indigo containing textile effluent using some strains of bacteria. *Journal of Applied Sciences* 5 (5): 853-855.
- Akhtar, S. y Husain, Q. 2006 Potential applications of immobilized bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase in the removal of phenols from polluted water. *Chemosphere* 65:1228-1235
- Amézquita, M., Ángulo, A., Pastrana, L., Carranza, J. y Ampudia, P. 2009. La aplicación de la enzima laccasa para la eliminación del colorante índigo carmín de las aguas residuales de Morelos. ITESM Campus Cuernavaca.
- Athanasopoulos, N. 1991. *Biological Degradation of Waste*. Cap. 18. A.M. Martin Editor, Elsevier Applied Science, Essex.
- Bauer, C.G., Kühn, A., Gajovic, N., Skorobogatko, O., Holt, P.J., Bruce, N.C., Makower, A., Lowe, C.R. y Scheller, F.W. 1999. New enzyme sensor for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase. *Fresenius J. Anal. Chem.* 364:179-183.
- Bayramoglu, G, y Arica, M. Y. 2008 Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: horseradish peroxidase immobilized on magnetic bead. *Doi: 10.1016/j.jhazmat 2007.12.008*.
- Bhunia , A., Durani, S. y Wangikar , P. P. 2000. Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. Department of Science & Technology. Government of India.
- Bourbonnais Rober y G. Paice Michael, 1990, Oxidation of non-phenolic substrate an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS LETTERS*; Volume 267; number 1, 99-102.
- Buchanan, I. D. y Nicell, J. A. 1997. Model development for horseradish peroxidases catalyzed removal of aqueous phenol. *Biotechnology and bioengineering* 54 (3):251-261.
- Campos, R., Kandelbauer, A., Robra, K.H., Cacaco, A.P. y Gubitz, G.M. 2001. Indigo degradation with purified laccases from *Trametes Hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. *J. Biotech.* 89:131-139.
- Casa, R., D'Annibale, A., Pieruccetti, F., Stazi, S.R., Giovannozzi Sermanni, G., Lo Cascio, B. 2003. Reduction of phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere*, 50: 959-966.

- Chacón, J. M., Leal, Ma. T., Sánchez, M. y Bandala, E. R. 2002. Tratamiento de agua residual proveniente de la industria Textil mediante fotocatalisis solar. Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental Cancún, México, 27 al 31 de octubre.
- Cheng, J.; Ming, S.; Zuo, P. 2006 Horseradish peroxidase immobilized on aluminium-pillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater. *Water Research* 40:283-290
- Chung, K.T. y Cerniglia, C.E. 1992. Mutagenicity of azo dyes:Structure activity relationship. *Mutat Res* 277:201–220.
- Clark, R.J.H., Cooksey, M.A.M., Daniels y R. Withnall. 1993. Indigo, Woad and Tyrian Purple: important vat dyes from antiquity to the present. *Endeavour* 17(4): 191-199.
- Comber, R.D., Haveland-Smith, R.B. (1982). A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours ant other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. *Mutation Res.* 98, 101-248.
- Cooper, VA. y Nicell, JA. 1996. Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. *Water Research* 30: 954-964.
- Dec, J. y Bollag, J-M. 1994. Use of plant material for the decontamination of water polluted with phenols. *Biotechnology and Bioengineering* 44: 1132-1139.
- Doménech, X. 2001. Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes. Eliminación de contaminantes por fotocatalisis heterogénea. La Plata: Red CYTED VII-G., p.14.
- Duran N. y Esposito, E. 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Enviromental* 28:83-99
- Fernández, A.; Peteira, B.; González, M.C.; Llanes, L.Y. 2003. Actividad peroxidasa, polifenoloxidasa, fenilalanina Amonio liasa y glucanasa en somaclones y mutantes de Arroz. *Revista Protección Vegetal* 18 (3): 183-188.
- Forgacs, Esther., Cserháti, Tibor y Oros, Gyula. 2004. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. 30: 953– 971.
- Fric, F. 1976. Oxidative enzymes. In: *Physiological Plant Pathology*. Encyclop. of Plant Pathology, New Series. Edited by Heitefuss, R. y P.H. Williams, 4:617-627.
- Gaspar T.; Penel C.; Thorpe T.; Greppin H. 1982. En: Plant Peroxidases 1970-1980. J. Lobarzewski, H. Greppin, C. Penel y T. Gaspar (Eds). *University of Geneva, Switzerland* 90-91pp.
- Ghioureliotis, M. y Nicell, J.A. 1999. Assesment of soluble products of peroxidase-catalyzed polymerization of aqueous phenol. *Enzyme and Microbial Technology* 25:185-193
- Giraldo, L. F. 2003. Fotocatalisis con TiO₂ de los colorantes azul de metileno y naranja reactivo 84 utilizando colector solar. Medellín, 2003; 208 p. Tesis de maestría (Ingeniería Ambiental). Universidad de Antioquía. Facultad de ingeniería.
- González, P. S.; Capozucca, C. E.; Tigier, H. A.; Murad, S. R.; Agostini, E. 2006 Phytoremediation of phenol from wastewater, by peroxidases of tomato hairy root cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 39:647-653pp

- Govere, E.M.; Tonegawa, M.; Bruss, M.A.; Wheeler, E.F.; Kephart, K.B.; Voigt, J.W.; Dec, J. 2007. Using minced horseradish roots and peroxides for the deodorization of swine manure: a pilot scale study. *Bioresource Technology* 98: 1191-1198
- Grambow H. 1986. En: Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. H. Greppin, C. Penel y T. Gaspar (Eds.). University of Geneva, Switzerland, 31-41.
- Harkin, J.M. y Obst, J.R. 1973. Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidasa in fungi. *Experientia*, 29:381-387.
- Hatakka, A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol, Rev.* 13:125-135.
- Higuichi, T. 1990. Lignin biochemistry biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24:23-63.
- Hünig, S., Balli, H., Conrad, H. y Schott, A. 1964. Ber zweistufige redoxsysteme polarographie von 2,2'-Azinen aromatischer, Heterocyclen. *Liebiss Ann. Chem.* 676:52-65.
- Johannes, C., y Majcherczyk, A. 2000. Natural mediators in the oxidations of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediators systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:524-528.
- Karam J.; Nicell, J.A. 1997 Potential applications of enzymes in waste treatment, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 69:141
- Khammuang, S. y Sarnthima, R. 2008. Laccase isozymes of *Pleurotus sajor-caju* culture on husk and bran of black sticky rice and their potential on indigo carmine decolourisation. *African Journal of Biotechnology.* 7(20):3731-3736.
- Kimura, M. 1980. Prospects for the treatment and recycle of dyeing wastewater. *J Soc Figer Sci Technol Jpn*, 36:69-73.
- Kobayashi S.; Uyama H.; Kimura S. 2001 Enzimatic Polymerization. *Chemical. Review.* 101-3793-3818.
- Laguna, J. 1996 Bioquímica. *Facultad de Medicina, UNAM, Mexico D.F., Fournier S.A.* 2ª ed.
- Lai, Y. C, y Lin, S. C. 2005 Application of immobilized horseradish peroxidase for the removal of p-clorophenol from aqueous solution. *Process Biochemical* 40:1167-1174
- Leonowicz, A., Cho, N.S., Luterek, J., Wikolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D. y Rogalski, J. 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiol.* 41:185-207.
- Li K., Helm R., Eriksson K. (1998). Mechanistic studies of the oxidation of a non-phenolic lignin model compound by the laccase/lhidroxibenzotriazole redox system. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 27, 239-243.
- Mansilla, H. 2001. Tratamiento de residuos líquidos de la industria de celulosa y textil. Eliminación de contaminantes por fotocátalisis heterogénea. La Plata: Red CYTED VII G., p.60-84.
- Mansilla, H. D., Lizma, C., Gutarra, A. y Rodríguez, J., 2005. Tratamiento de residuos líquidos, de la industria de celulosa y textil. Instituto de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería (Perú), y el International Science Programs de la Universidad de Uppsala de Suecia. 13:285-294.

- Matías, C. J., Teresa, L. M., Sánchez, M. y Bandala, E. R., 2002. Tratamiento de agua residual proveniente de la industria textil mediante fotocátalisis solar. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. XXVIII Congreso Internacional de ingeniería sanitaria y ambiental.
- Mayer, A.M. 1987. Polyphenol oxidases in plants recent progress. *Phytochemistry*, 26:11-20.
- Mayer, A.M. y Staples, R.C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60:551-565.
- McCutcheon, S. C., Susarla, S. y Medina, V. F. 2002. Phytoremediation: An ecological solution to organic Chemicals contamination. *Ecological Engineering*, 18: 647-658.
- Mendez C., A., Zayas P., M. T., Geissler, G. y Villegas R., Ma. L. O. 2003. Depuración de aguas contaminadas con colorantes textiles por floculación química. *Tecnología y Biotecnología ambiental*.
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Gorbacheva, M.A., Shleev, S.V. y Yaropolov, A.I. 2007. "Blue" Laccases. *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 72, No. 10, pp 1136-1150.
- Nakajima, K., Hirota, K., Nodasaka, Y. y Yumoto, I. 2005. *Alkalibacterium iburiense* sp.nov., an obligate alkaliphile that reduces an indigo dye. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:1525-1530.
- Nicell, J.A. y Wright H. 1997. A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide. *Enzyme Microb Technol* 20:302-310.
- Nicholson, S.K. y John, P. 2004. Bacterial indigo reduction. *Biocat. Biotransfor.* 22:397-400.
- Nicholson, S.K. y John, P. 2005. The mechanism of bacterial indigo reduction. *App. Micro. Cell Physiol.* 68:117-123.
- Nilsson, R., Nordlinder R. y Wass, U. 1993. Asthma, Rhinitis and Dermatitis in workers exposed to reactive dyes. *Br. J. Ind. Med* 50:65-70.
- Noonan, J. E., Meggos, H, (1980). Synthetic food colours, en *CRC Handbook of Food Additives*, 2a Ed. Vol II (Furia, T.E., Ed.), 339-383 CRC Press.
- Oberthür, C., Schneider, B., Graf, H. y Hamburguer, M. 2004. The elusive indigo precursors in woad (*Isatis tinctoria* L.) Identification of the major indigo precursor, Isatan A, and a structure revision of Isatan B. *Chemistry & Biodiversity* 1(1):174-182.
- Pagga, N. y Brown, D. 1986. *Chemosphere*. 15;479.
- Pérez, E.; Rodríguez, Y.; Hernández, M.A.; Noval, B.M. 2004. Dinámica de inducción de algunos sistemas de defensa en la interacción HMA-tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) var Amalia. II. Inducción y expresión de peroxidasa y polifenoloxidasas en raíces de tomate. *Cultivos tropicales* 25 (2): 45-52
- Perinat, M. 1997. Tecnología de la confección textil. EDYM, España, 2007.
- Pickard, M.A., Roman, R., Tinoco, R. y Vazquez-Duhalt, R. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by White rot fungi and oxidation by *Corioloropsis gallica* UAMH8260 laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3805-3809.
- Project: Profile of the textile Industry, <http://www.cluin.org/download/toolkit/textilsn.pdf>.
- Ramya, M., Anusha, B. y Kalavathy, S. 2007. Decolorization and biodegradation of indigo carmine by a textile soil isolate *Paenibacillus larvae*. *Biodegradation*. 19:283-291.

- Raskin, I., Smith, R. D. y Salt, D. E. 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology*, 8:221-226.
- Reife, A., Freeman, H.S. y Freeman, H.C. 1995. Environmental chemistry of dyes and pigments. 1st edn, Wiley Interscience, USA.
- Reinhammar, B., y Malstrom, B.G. 1981. "Blue" copper-containing oxidases *In* T. G. Spiro (ed.), Copper proteins (metal ions in biology), John Wiley, New York, N.Y., p 109-149.
- Reuvini R.; Shimoni M.; Karachi Z.; Kuc J. 1992. *Phytopatology* 82: 749-753.
- Sandoval-Salas, F.; Gschaedler-Mathis, A.; Vilarem, G. y Méndez-Carretero, C. 2006. Effect of harvest time on dye production in *indigofera suffruticosa* Mill. *Agrociencia*. p 585-591.
- Santos de Araujo, B.; Dec, J.; Bollag, J. M.; Pletsch, M. 2006 Uptake and transformation of phenol and chlorophenols by hairy root cultures of Daucus carota, Ipomoea batatas and Solanum aviculare. *Chemosphere* 63:642-651
- Sharma, M.K. y Sobti, R.C. 2000. Rec effect of certain textile dyes in *Bacillus subtilis*. *Mutat Res* 465:27-38.
- Shaul, G.M., Dempsey, C.R., Dostal, K.A. y Lieberman, R.J. 1987. *Proc. 41st Industrial Waste Conference*, Purdue University, Ann Arbor Sci. Publishers, Ann Arbor.
- Shaul, G.M., Holdsworth, T.J., Dempsey, C.R. y Dostall, K.A. 1991. Fate of water-soluble azodyes in activated sludge process. *Chemosphere* 22:107-119.
- Singh, N.; Melo, J.S.; Eapen, S.; D'Souza, S.F. 2006 Phenol removal using Brassica juncea hairy roots: role of inherent peroxidase and H₂O₂, *Journal Biotechnology* 123:43-49
- Solís, O. M., Bárzana, E., García, G.M. y Viniegra, G.G. (2007). El ABTS●+ agente oxidante de diversos compuestos químicos y su mecanismo de reciclado entre la lacasa y el sustrato. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 003, 275-281.
- Spadarry, J.T., Isebell L. y Renganathan, V. 1994. Hydroxyl radical mediated degradation of azo dyes: evidence for benzene generation. *Environ Sci Technol* 28:1389-1393.
- Tarragó, J. R.; Faloci, M. M.; Luna, C. V.; Sansberro, P. A.; Mroginski, L. A. 2003 Determinación de enzimas peroxidadas en tejidos caulinares de Ilex dumosa R. e Ilex paraguariensis St. Hil. *Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas* Resumen: A-042
- Tatsumi, K.; Ichikawa, H.; Wada, K. 1994. Dephenolization from aqueous solution by treatment with peroxidase and a coagulant. *Water Science and Technology* 30: 79-86
- Tatsumi, K.; Wada, K.; Ichikawa, H. 1996. Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase. *Biotechnology and bioengineering* 51:126-130
- Terrón, M.C., López-Fernández, M., Carbajo, J.M., Junca, H., Téllez, A., Yagüe, S., Arana-Cuenca, A., González, T. y González, A. E. 2004. Tannic acid interferes with the commonly used laccase-detection assay based on ABTS as the substrate. *Biochimie*, 86:519-522.
- Thurston, C.F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140:19-26.

- Ullah, M.A., Bedford, C.T. y Evans, C.S. 2000. Reactions of pentachlorophenol with laccase from *Cariolus versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53:230-234.
- Ulson de Souza, S. M. A. G., Forgiarini, E. y Ulson de Souza, A. A. 2007. Toxicity for textile dyes and degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *Journal of Hazardous Materials.* 147:1073-1078.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1997) Office of compilance Sector Notebook,
- Waffa, M.; Rahim, A. E. y Moawood, H. 2003. Enhancing bioremoval of textile dyes by eight fungal strains from media supplemented with gelatine waste and Sucrose. *J Basic Microbiology* 43:367–375.
- Warushi, H., Valli, K. y Gold, M.H. 1992. Manganese (II) oxidation by ,amganese peroxidasa from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: kinetic mechanism and role of chelators. *J. Biol. Chem.* 267:23688-23695.
- Wolfenden, B.S. y Willson, R.L. 1982. Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *J. Chem. Soc. Perkin Trans II*, 1982:805-812.
- Wong, P.K. y Yuen, P.Y. 1996. Decolorization and biodegradation of Methyl red by *Klebsiella pneumonia* RS-13. *Water Res.* 30:1736–1744.
- Wong, Y. y Yu, J., 1999. Laccase-Catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Elsevier Science.* 33(16): 3512-3520.
- Wright, H. y Nicell, J. A. 1999. Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols. *Bioresource Technology* 70:69-79
- Xia, Z., y Zenk, M. 1992. Biosynthesis of indigo precursors in higher plants. *Phytochemistry* 31(8): 2695-2697.
- Zhang, J.; Ye, P.; Chen, S.; Wang, W. 2007. Removal of pentachlorophenol by immobilized horseradish peroxidase. *International Biodeteriorogy and Biodegradation* 59:307-314.

ANEXO

Preparación de las soluciones índigo carmín de 2000 ppm.

Para obtener una solución de índigo carmín con una concentración de 2000 ppm se diluyen 0.20 g en 100 ml de agua destilada.

Preparación de las soluciones índigo carmín de 1000 ppm.

Para obtener una solución de índigo carmín con una concentración de 1000 ppm se diluyen 0.10 g en 100 ml de agua destilada.

Preparación de la solución de índigo carmín a 500 ppm

Se pesan 0.05 g de colorante azul índigo carmín y se diluyen en 100 ml de agua destilada.

Preparación de las soluciones buffer a diferentes pH

Buffer pH 2: Diluir 50 ml de la solución A y 10.6 ml de la solución B.

- Solución A (0.2 M): diluir 14.9 g de KCl (cloruro de sodio) en un litro de agua destilada.
- Solución B (0.2 M): diluir 16.8 ml de HCl (ácido clorhídrico) en un litro de agua destilada.

Buffer pH 4: Diluir 2.45 g de NaAc·3H₂O (acetato de sodio·3H₂O) y 41 ml de HA⁻c (ácido acético glacial) 2M ≈ 11.5% en un litro de agua destilada.

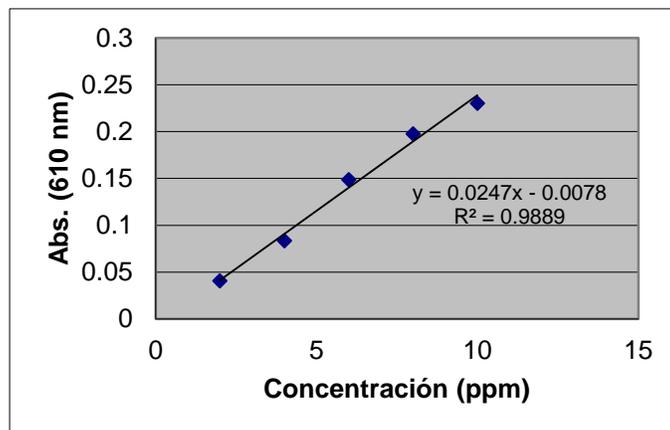
Buffer pH 7: Diluir 8.66 g Na₂HPO₄ (fosfato de sodio) y 5.30 g KH₂PO₄ (fosfato de potasio) en un litro de agua destilada.

Buffer a pH 8: Diluir 13.42 g Na₂HPO₄ (fosfato de sodio) y 0.072 g KH₂PO₄ (fosfato de potasio) en un litro de agua destilada.

Buffer pH 10: Diluir 3.5 g de NH₄Cl (cloruro de amonio) y 32.5 ml de NH₃ 25 % (amoníaco) en 50 ml de agua destilada.

Curva Estándar Índigo Carmín

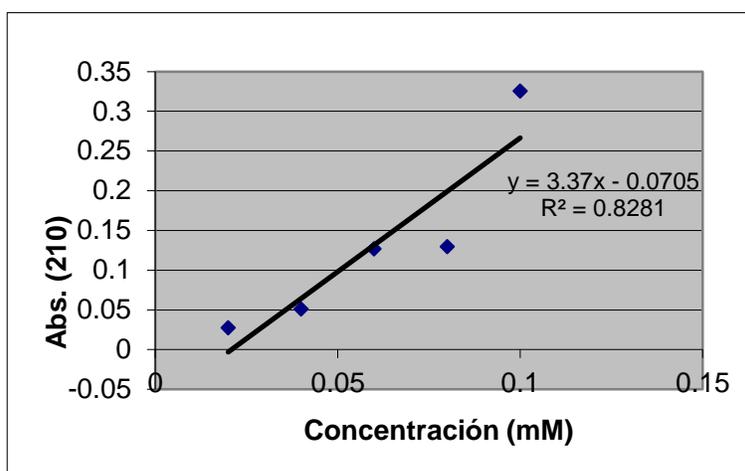
Curva estándar azul índigo carmín (Gráfica 1): Se preparan 5 soluciones de diferente concentración (2, 4, 6, 8 y 10 ppm) y se toma su absorbancia a 610 nm con el espectrofotómetro. (3 veces por cada concentración). Se gráfica concentración contra absorbancia, para obtener la fórmula de la pendiente y poder calcular las concentraciones con respecto a la lecturas de las diferentes muestras (gráfica 23).



Gráfica 23. Curva estándar para la cuantificación del Índigo Carmín

Curva Estándar de ácido antranílico

Curva estándar ácido antranílico: Se preparan 5 soluciones de diferente concentración (0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.10 ppm) y se toma su absorbancia a 210 nm con el espectrofotómetro (3 veces por cada concentración). Se calcula la pendiente y se obtiene la ecuación para el cálculo de las concentraciones en las diferentes lecturas obtenidas (Gráfica 24).



Gráfica 24. Curva estándar para la cuantificación del ácido antranílico

Extracción de compuestos en las muestras de decoloración

A las 48 horas de reacción se preparará cromatografía en capa fina (con cromatofolios de silica gel de 5 cm de alto) contra ácido antranílico, usando como eluyente acetato de etilo, el índigo no corre y el ácido antranílico tiene un r_f de 0.8.