



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**BIORREMEDIACIÓN DE AGUA CONTAMINADA CON
COLORANTE NEGRO DIRECTO-38**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

MARIO FRANCISCO SANTOYO DE LA CRUZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LEONORA SÁNCHEZ GARCÍA FIGUEROA

MÉXICO, D.F.

JUNIO DEL 2011.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dra. Leonora Sánchez García Figueroa.

VOCAL: M en C. Marisela Valdés Ruíz.

SECRETARIO: M en C. Raúl Arcos Ramos.

SUPLENTE: M en C. Manuel Feria Ortiz.

SUPLENTE: Biól. Maricela Arteaga Mejía.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y a su **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**, que me brindaron los conocimientos y valores tan valiosos para mi formación como profesionista y ser humano y por todos esos espacios tan emocionantes e interesantes que tiene la universidad de corazón gracias.

A mis sinodales: Dra. Leonora Sánchez García Figueroa, M en C. Marisela Valdés Ruíz, M en C. Manuel Feria Ortiz, Biól. Maricela Arteaga Mejía y M en C. Raúl Arcos Ramos. Por orientarme, asesorarme y aportar sus conocimientos en la realización de mi trabajo de tesis.

A mi directora de tesis Dra. Leonora Sánchez García Figueroa por brindarme sus conocimientos y su paciencia para lograr la culminación de mi trabajo.

DEDICATORIAS

A mis padres: Teresa de la Cruz Flores e Ignacio Santoyo Ibarra por su apoyo y amor sincero desde siempre así como por haberme inculcado valores muy importantes para ser una persona de bien y de éxito por todo eso y más gracias.

A mi familia: Mis hermanos Adriana, Gustavo y Alejandro por estar siempre pendiente de toda la familia y por ayudarme cuando lo necesito les agradezco, saben que cuentan siempre conmigo. A mi abuelito Luis C. A mis cuñadas Cristina y Olga y mi cuñado Alejo a mis sobrinos: Peter, Jony, Carito, Vale, Erick, Katy y Miguelito. A mis primos y tíos.

A mis amigos: Darío H †, Erick S, Chikis, Juan H, Enano, Chaparro, Juan P, Guísela, Saraí V, Rorris, Lalo, Martha, Yazmin, Alicia, Mike, Sergio, Águila, Dany, Loco, Sara L, Giovanni, León, Araceli, Erika, Mago, Arturo chilango, Mariano, David, Guru, Alejandra S, Isma, Sandra, Juan Proto, Rebeca, Misael, Marlen, Andrés, Evelin, Oso, Lety, Muñeca, Jesy, Joel, Laudet, Simancas, Mariana, Chino, Carlitos, Abigail. Y a todos aquellos que se me olvidan gracias por esos momentos tan especiales y llenos de diversión. Por su apoyo que me dieron, se los aprecio. Atte SO4.

ÍNDICE

RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. MARCO TEÓRICO	12
2.1. Colorantes azo.....	12
2.2. Industria textil.....	13
2.3. Negro directo -38.....	13
2.4. Aminas aromáticas de colorantes azo.....	15
2.5. Tecnologías para la decoloración de aguas de desecho.....	17
2.5.1. Métodos fisicoquímicos.....	17
2.5.2. Métodos químicos.....	17
2.5.3. Métodos físicos.....	17
2.5.4. Métodos biológicos.....	18
2.6. Biotecnología.....	19
2.7. Fitorremediación.....	20
2.8. Enzimas.....	21
2.9. Funciones y usos de las peroxidasas.....	23
2.10. Precipitación por peroxidasas.....	24

3. PROBLEMÁTICA	25
3.1. Problemática general.....	25
3.2. Problemas a causa de colorantes.....	27
4.- JUSTIFICACIÓN	29
5. HIPÓTESIS	29
6. OBJETIVOS	30
6.1. Objetivo general.....	30
6.2. Objetivos particulares.....	30
7. METODOLOGÍA	31
7.1. Equipo y material usados.....	31
7.2. Determinación de la actividad peroxidasa.....	31
7.3. Método para medir las concentraciones de ND-38.....	32
7.4. Preparación del material vegetal.....	33
7.5. Efecto de la concentración de ND-38 en el porcentaje de decoloración..	33
7.6. Efecto del pH 2, 4, 6, 8, 10 y 12 en la biorremediación.....	34
7.7. Efecto del peróxido de hidrógeno en la biorremediación.....	35
7.8. Espectros de UV visibles de los productos de la biorremediación.....	35
7.9. Diagramas de flujo de actividades.....	36
7.10. Cronograma de actividades.....	38

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
8.1. Actividad peroxidasa.....	39
8.2. Formas de preparación de los vegetales.....	40
8.2.1. Cinéticas de decoloración.....	41
8.3. Efecto de la concentración de ND-38 en el porcentaje de decoloración..	43
8.3.1. Cinéticas de decoloración.....	44
8.4. Efecto del peróxido de hidrógeno en la biorremediación.....	46
8.4.1. Cinéticas de decoloración.....	47
8.5. Efecto del pH en la biorremediación.....	49
8.5.1. Cinéticas de decoloración.....	50
8.6. Espectros de UV visible de los productos de la biorremediación.....	53
9. CONCLUSIONES	57
10. RECOMENDACIONES	58
11. BIBLIOGRAFÍA	59
12. ANEXO	65
12.1. Preparación de soluciones.....	65
12.2. Soluciones para la curva estándar.....	65
12.3. Soluciones amortiguadoras.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del ND-38.....	14
Figura 2. Negro directo 38 en polvo.....	15
Figura 3. Espectrofotómetro Genesys 10 UV-visible.....	32
Figura 4. Frascos con material vegetal y ND-38 en biorremediación.....	34
Figura 5. Fotografías de las coloraciones en cada valor de pH	52
Figura 6. Soluciones de los precipitados del ND-38.....	55

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Porcentajes de decoloración de las preparaciones usadas.....	40
Gráfica 2. Cinética de decoloración de las preparaciones usadas con TB.....	41
Gráfica 3. Cinética de decoloración de las preparaciones usadas con CM.....	42
Gráfica 4. Cinética de decoloración de las preparaciones usadas con TFC.....	42
Gráfica 5. Porcentajes de decoloración de las concentraciones ND-38 con TB, CM y TFC.	43
Gráfica 6. Cinética de decoloración de las concentraciones usadas con TB.....	44
Gráfica 7. Cinética de decoloración de las concentraciones usadas con CM.....	45
Gráfica 8. Cinética de decoloración de las concentraciones usadas con TFC.....	45
Gráfica 9. Porcentaje de decoloración de las concentraciones de H ₂ O ₂ usadas con TB, CM y TFC.....	46
Gráfica 10. Cinética de decoloración de las concentraciones de H ₂ O ₂ usadas con TB.....	47
Gráfica 11. Cinética de decoloración de las concentraciones de H ₂ O ₂ usadas con CM.....	48
Gráfica 12. Cinética de decoloración de las concentraciones de H ₂ O ₂ usadas con TFC.....	48
Gráfica 13. Porcentajes de decoloración de los valores de pH usados con TB, CM y TFC..	49
Gráfica 14. Cinética de decoloración de los valores de pH usados con TB.....	50
Gráfica 15. Cinética de decoloración de los valores de pH usados con CM.....	51
Gráfica 16. Cinética de decoloración de los valores de pH usados con TFC.....	51
Gráfica 17. Espectro del visible de los botones resultantes de la centrifugación del agua tratada con TB, CM y TFC en jugo.....	54

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Propiedades del colorante ND-38.....	14
Cuadro 2. Arilaminas prohibidas en los colorantes azo.....	16
Cuadro 3. Industrias y sus contaminantes.....	26
Cuadro 4. Actividad peroxidasa de los vegetales empleados.....	39
Cuadro 5. Comparación entre diferentes métodos de remediación de ND-38.....	56
Cuadro 6. Soluciones que se utilizaron de ND-38 en la curva estándar.....	65
Cuadro 7. Soluciones amortiguadoras utilizadas.....	66

RESUMEN

Los mantos freáticos de todo el mundo continuamente se ven afectados por las descargas de contaminantes principalmente las de la industria textil que arroja a los efluentes grandes cantidades de colorantes de desecho lo que provoca un severo problema de contaminación ambiental que puede tener consecuencias graves en los seres vivos ya que la mayoría de los colorantes desechados son de tipo azo que son cancerígenos y mutágenos. Se llevó a cabo la biorremediación del agua con colorante negro directo 38 (ND-38) con partes de vegetales como: tallo de brócoli (TB), cáscara de melón (CM) y tallo de flor de calabaza (TFC), para saber de que manera funcionan mejor las peroxidasas vegetales se realizó: 1) preparación en jugo, 2) preparación en licuado 3) preparación en secciones y 4) preparación en bagazo. Se midió en el espectrofotómetro la actividad peroxidasa de las especies usadas con guayacol. Se prepararon soluciones de colorante a 250, 500, 1000 y 1500 ppm para saber en cuál de ellas el proceso de biorremediación es más eficiente. Se realizó el experimento del efecto del H_2O_2 en la biorremediación con concentraciones de 0.58, 1.17, 1.76, 2.35, 2.93, 20.51, 38.23, 58.6, 87.9 mM de H_2O_2 al (30%) para saber cuál concentración es más eficiente en el proceso de biorremediación. Se realizó la biodecoloración a varios valores de pH usando soluciones amortiguadoras con colorante ND-38, para saber cuál valor de pH funciona de mejor manera en el proceso de biorremediación. Finalmente se realizó la comparación de los espectros de UV visible de los productos de la biorremediación y el ND-38 puro para saber si ocurrió algún cambio en la estructura molecular del ND-38. Los resultados encontrados fueron que la preparación en jugo es la mejor obtuvo con el TB 98% de decoloración, con CM 94% de decoloración y con TFC 92% de decoloración. A 1500 ppm en 72 horas se logra un 97.25% de decoloración con TB, 95.89% de decoloración con CM y 96.18% con TFC. La adición de 2.93 mM de H_2O_2 funciona de manera mejor con TB obtiene 100% de decoloración, 93.32% de decoloración con CM y 100% de decoloración con TFC, la adición de peróxido de hidrógeno al agua tratada no incrementó el porcentaje de decoloración de forma notable. Los valores de pH que mejor biodecoloraron fueron pH 6 con 90 a 93% de decoloración y pH 8 con 91 a 94% de decoloración. Se encontró que el tallo de brócoli es el que más actividad peroxidasa tiene. En todas las experimentaciones de biorremediación las peroxidasas mostraron un efecto de precipitación.

1. INTRODUCCIÓN

Debido al acelerado crecimiento poblacional se requieren más productos y servicios que contaminan las aguas, los suelos y la atmósfera, por lo que el problema de la contaminación es una preocupación mundial hoy en día. La industria textil es una de las más contaminantes del mundo y arroja varios compuestos químicos a los mantos freáticos entre ellos se incluye a los colorantes tipo azo, los cuales son potencialmente cancerígenos y mutágenos. Desde el año 1989, la industria textil fue catalogada entre las diez principales actividades generadoras de desechos tóxicos líquidos la mayoría de los cuales tienen como receptor final el medio acuífero. Dichos desechos tienen gran variabilidad de componentes y carga contaminante. Son fuertemente coloridos, deficientes en nutrientes y con una baja presencia de microorganismos (Yonni *et al*, 2008). La industria textil consume grandes cantidades de agua durante el teñido y tiene una eficiencia de 60 y 90 % de teñido a las fibras textiles el resto es desechado. Se estima que se comercializan más de 100,000 tipos de colorantes y se producen más de 7×10^5 ton de colorantes anualmente en el mundo y de un 10 a 15 % de estos colorantes se descargan al ambiente (Sugano *et al*, 2006).

El ND-38 es un colorante azo, cuando se degrada se forman aminas aromáticas como benzidina, 4-aminobifenil y 2-naftilamina, que han sido clasificadas como cancerígenas en el humano por contacto directo y por el ambiente (Gnanamani *et al*, 2004).

Se entiende a la biotecnología como un conjunto de innovaciones tecnológicas basadas en la aplicación de procesos biológicos para obtener bienes y servicios para el desarrollo de actividades científicas de investigación, utilizada también para la limpieza del medio ambiente. Como parte de la biotecnología existe la biorremediación, la cual es una técnica que emplea procesos biológicos que puede utilizarse como auxiliar en la descontaminación, emplea procesos naturales para eliminar las sustancias químicas perjudiciales para el ambiente (Luna *et al*, 2005). Una de las soluciones planteadas es el uso de la biorremediación que eliminan contaminantes eficientemente y sean amigables con el ambiente y además que sean económicamente redituables como la fitorremediación, la cual se fundamenta en el uso de vegetales o parte de ellos para eliminar contaminantes del agua y del suelo (Macek *et al*, 2000).

La fitorremediación ha tenido ganancias enormes en los últimos años. Además de su economía favorable las principales ventajas de fitorremediación en la comparación con métodos clásicos de descontaminación pueden ser resumidas de la siguiente manera: no es perjudicial al ambiente, tiene una alta aceptación pública, evita hacer

construcciones o inversiones en aparatos costosos, tiene la flexibilidad para tratar una gama diversa de materiales peligrosos, el costo es mucho más bajo, se puede utilizar en operaciones de limpieza de escala mucho más grande que no es posible por otros métodos (Macek *et al*, 2000).

En los últimos años se ha investigado el uso de vegetales para emplear sus enzimas peroxidadas que son capaces de eliminar moléculas contaminantes como fenoles y colorantes del agua. Una solución alternativa a este problema es la biorremediación mediante la utilización de enzimas peroxidadas. Las peroxidadas son catalizadores versátiles con aplicaciones variadas en procesos industriales. Las enzimas oxidoreductoras como las peroxidadas eliminan los contaminantes aromáticos y fenólicos de agua contaminada. En vista de que son consideradas efectivas remediadoras se han propuesto para la biorremediación pero la falta de una actividad enzimática elevada en materia biológica y el costo elevado de purificación limita estos proyectos; por lo que se ha dado a la tarea de buscar materias biológicas altas en enzimas peroxidadas (Suhail *et al* 2005).

Este trabajo tiene como objetivo estudiar la capacidad de las peroxidadas de TB, CM y TFC de eliminar al colorante negro directo 38 presente en agua. Se evaluaron parámetros como formas de preparación del material vegetal; la concentración de colorante óptima para su eliminación; concentración óptima del peróxido de hidrógeno y valor de pH más adecuado para la fitorremediación.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. COLORANTES AZO

El primer descubridor de la síntesis de colorantes fue William H Perkin en 1856 y desde allí se han venido desarrollando nuevas metodologías para su obtención (Carias *et al*, 2007), los colorantes azo han sido la clase química más grande de tintes que se ha utilizado con frecuencia para teñir textiles e impresión de papel (Zhang *et al*, 2010) además se utilizan en la fabricación de alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos (Mustafa y Esponza, 2009).

Existen diferentes clases químicas de colorantes que se emplean en la industria que son: los tipo azo, los derivados de la antraquinona, los indigoides, los derivados de trifenilmetilo y de la ftalocianina (Oliveira *et al*, 2007).

Los colorantes azoicos forman parte de una familia de sustancias químicas orgánicas caracterizadas por la presencia de un grupo que contiene nitrógeno unido a anillos aromáticos. Los colorantes azoicos constituyen el grupo más extenso y menos costoso, de todos los colorantes orgánicos disponibles en el mercado. La estructura química de este tipo de colorantes, se caracteriza por la presencia del grupo azo $-N=N-$ como cromóforo, asociados a grupos auxocromo de tipo amino o hidroxilo. La fabricación de los colorantes azo tiene lugar mediante la reacción de diazoación que ocurre entre una arilamina primaria con ácido nitroso, con la producción de la sal de diazonio. El ácido nitroso se obtiene por disolución de nitrito sódico en agua y posterior adición de ácido clorhídrico. La sal de diazonio obtenida se hace reaccionar con una amina aromática o un compuesto alcohólico, con objeto de formar el colorante. Esta reacción denominada de “acoplamiento” o “copulación”, se realiza en medio ácido en el caso de las aminas y en medio básico en el caso de alcoholes (Platzek *et al*, 1999). En el cuadro 2 se indican algunas propiedades del ND-38.

Los colorantes azo se clasifican en directos, son llamados así por su afinidad a las fibras celulósicas, a las que tiñen directamente ya que se forma un enlace químico entre los grupos terminales $-NH_2$ y $-COOH$ de la cadena del polipéptido y el colorante o entre este y los grupos funcionales de las cadenas laterales de los aminoácidos que componen la proteína. La presencia de uno o más grupos azo en la estructura del colorante da origen a la coloración. Estos colorantes se usan frecuentemente para el teñido de productos de gran volumen de ventas como son los jeans (Tuesta *et al*, 2005 y Pavia *et*

al, 1978). Debido a su uso los colorantes azo son los más importantes se clasifican por su solubilidad, en solubles e insolubles (Platzek *et al*, 1999).

2.2. INDUSTRIA TEXTIL

Desde el año 1989, la industria textil fue catalogada entre las diez principales actividades generadoras de desechos tóxicos líquidos la mayoría de los cuales tienen como receptor final el medio acuífero. Dichos desechos tienen gran variabilidad de componentes y carga contaminante. Son fuertemente coloridos, deficientes en nutrientes y con una baja presencia de microorganismos (Yonni *et al*, 2008).

La industria textil consume grandes cantidades de agua durante el teñido y tiene una eficiencia de 60 y 90 % de teñido a las fibras textiles el resto es desechado. (Rodríguez 2009). Se estima que se comercializan más de 100,000 tipos de colorantes y se producen más de 7×10^5 ton de colorantes anualmente en el mundo y de un 10 a 15 % de estos colorantes se descargan al ambiente (Sugano *et al*, 2006).

La remoción de colorantes es uno de los principales objetivos del tratamiento de aguas hoy en día. Como la industria textil representa un importante sector económico a nivel mundial, aunado a la demanda de productos textiles, ha aumentado la producción de colorantes (Pasukphun *et al*, 2006) y se han incrementado los volúmenes de descargas de aguas coloridas, por lo que este es uno de los principales problemas de contaminación en el mundo (Morales y Melgoza, 2009). Se han implementado tratamientos tanto fisicoquímicos como biológicos para eliminarlos del ambiente (Ortega, 2008).

2.3. NEGRO DIRECTO-38 (ND-38)

El ND-38 es un colorante azo su estructura química se muestra en la figura 1, cuando se degrada se forman aminas aromáticas como benzidina, 4-aminobifenil y 2-naftilamina, que han sido clasificadas por la Agencia Internacional para la Investigación en el Cáncer (IARC) como cancerígenas en el humano por contacto directo y por el ambiente (Gnanamani *et al*, 2004).

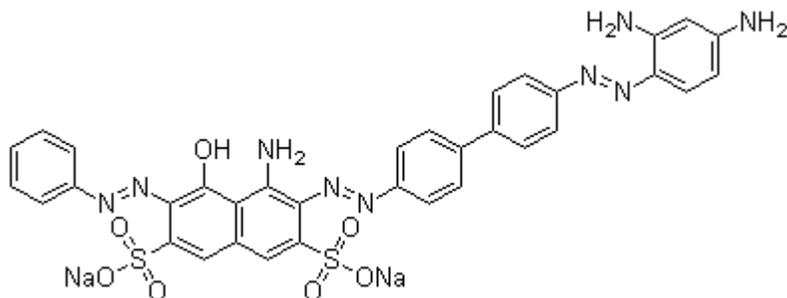


Figura 1. Estructura química del ND-38 (Yonni *et al*, 2008).

PROPIEDADES DEL COLORANTE NEGRO DIRECTO-38	
Color	Negro
Estado físico	Polvo
Índice industrial numérico del colorante	30235
Peso molecular	781.78
Fórmula molecular	C₃₄H₂₅N₉O₇S₂ 2Na
Solubilidad en agua	Soluble
Solubilidad en solventes orgánicos	Moderadamente soluble en etanol, mono etil éter y etilen glicol.
Solubilidad en otros solventes	Insoluble en otros solventes orgánicos.
Usos	Usado en industria de colorantes textiles, materiales de celulosa, papel y plástico.

Cuadro 1. Propiedades más importantes del colorante ND38 (Gnanamani *et al*, 2004).



Figura 2. Negro directo 38 en polvo.

2.4. AMINAS AROMATICAS DE COLORANTES AZO

Se ha reportado que algunos de estos colorantes y los subproductos que se derivan de su aplicación son mutágenos. (Tuesta *et al*, 2005). En Alemania, si los productos textiles contienen aminas aromáticas no pueden ser vendidos según las regulaciones de las leyes alemanas (Platzek *et al*, 1999).

Se ha estudiado la liberación de aminas de los productos de consumo como ropa y calzado. Ya que es necesario asegurarse de que nuestra ropa, calzado y otras prendas de uso personales estén libres de las aminas cancerígenas. Aunque, la molécula del ND-38 es biológicamente inactiva los microorganismos en la piel o en el ambiente como bacterias puede degradar los enlaces azo y luego liberarlos al cuerpo (Gnanamani *et al*, 2004).

Experimentos con ratones expuestos a colorantes muy directamente muestran desarrollo de cáncer en vesícula, hepatocarcinoma y anomalías nucleares en células epiteliales e intestinales (Gnanamani *et al*, 2004). La bencidina es un potente cancerígeno de vesícula y se ha identificado en gran variedad de sustancias como son los colorantes azo, aflatoxinas e hidrocarburos y que están presentes en productos de consumo humano (Ames y Kanmen 1975).

En los procesos de síntesis de colorantes azo se usan sustancias de tipo aromático como aminas que provocan daño severo a la reproducción de animales y humanos y son

cancerígenas principalmente de hígado y piel (Tahir *et al*, 2009). Los colorantes azo incluso después de degradados a aminas aromáticas ya sin color pueden ser mutagénicos y cancerígenos por lo que todavía pueden provocar problemas de salud (Davies *et al*, 2009).

La norma internacional sugiere que los colorantes que puedan liberar una o más de las arilaminas listadas (cuadro 3), en concentración superiores a 30 ppm en los artículos acabados, no podrán utilizarse en artículos textiles y de cuero que puedan entrar en contacto directo y prolongado con la piel humana o la cavidad bucal, tales como: prendas de vestir, ropa de cama, toallas, postizos, pelucas, sombreros, pañales y otros artículos sanitarios, sacos de dormir, calzado, guantes, correas de reloj, bolsos, monederos, billeteras, carteras, fundas para sillas, ugetes de tejido o cuero y juguetes revestidos de tejido o cuero, hilo y tejidos destinados al consumidor final (Aitex, 2003).

ARILAMINAS PROHIBIDAS	
4-aminodifenil	3,3'-dimetoxi bencidina
bencidina	3,3'-dimetil-4,4'-diamino difenil metano p-cresidina
4-cloro-o-toluidina	4,4'-metil-bis-(2-cloranilina)
2-naftilamina	4,4'-oxidianilina
2-amino-4-nitro tolueno	4,4'-tiodianilina o toluidina
p-cloro anilina	2,4-diaminotolueno
2,4-diamino anisol	2,4-diaminotolueno
4,4'-diamino difenil metano	2,4-diaminotolueno
3,3'-dicloro bencidina	2,4-diaminotolueno

Cuadro 2. Arilaminas prohibidas en los colorantes azo en concentraciones superiores a 30 ppm (Aitex, 2003).

2.5. TECNOLOGÍA PARA LA DECOLORACIÓN DE AGUA DE DESECHO DE LA INDUSTRIA TEXTIL

2.5.1. MÉTODOS FISICOQUÍMICO, COAGULACIÓN Y FLOCULACIÓN

Los tratamientos fisicoquímicos como coagulación y floculación son técnicas convenientes para reducir la fuerza del contaminante de agua, especialmente las partículas coloidales y materia orgánica presente. Las partículas coloidales encontradas en el agua contaminada tienen carga negativa. En estos procesos se le añaden a los contaminantes sales de hierro y aluminio para desestabilizar a los coloides que posteriormente se aglomeran en partículas pequeñas. La eficacia de este proceso dependerá del agente que se coagula, la dosis, el pH, la concentración y la naturaleza de los compuestos orgánicos presentes en el agua (Braz *et al*, 2010). Estos métodos pueden eliminar colorantes de 40-50%, pero son muy costosos (Mustafa y Esponza, 2009).

2.5.2. MÉTODOS QUÍMICOS OXIDACIÓN CON OZONO Y CON PERÓXIDO.

El ozono se utiliza para el tratamiento de agua contaminada con sustancias peligrosas como pesticidas, fármacos, compuestos aromáticos, halógenos orgánicos, colorantes textiles y muchas otras sustancias. La ozonación se emplea para oxidar fuertemente a los contaminantes y así llegar a la mineralización estos tratamientos son costosos y difíciles de llevar a cabo (Gómez *et al*, 2010).

La oxidación por peróxido de hidrógeno es otra forma de tratamiento de agua contaminada con compuestos orgánicos, produce radicales hidroxilo que atacan los compuestos orgánicos y ha mostrado ser un método efectivo, sin embargo depende del tipo y concentración del contaminante que se desea eliminar (Mohey *et al*, 2003).

2.5.3. MÉTODOS FÍSICOS FILTRACIÓN Y ADSORCIÓN

La filtración es un proceso de separación de compuestos que es aplicada actualmente en la purificación de agua contaminada, es fácil de llevar a cabo no es perjudicial al ambiente. Este proceso requiere membranas, se utiliza presión para eliminar los contaminantes del agua, sin embargo en el caso de algunos colorantes puede no ser adecuado el método ya que se pueden presentar moléculas pequeñas que no son filtradas otra desventaja que presenta es la contaminación rápida de la membrana utilizada. Otra forma de filtración es la nanofiltración en membranas poliméricas permeables se utilizan capas porosas polisulfonadas y membranas, un tipo de membrana utilizada es TFC (Thin-Film Composite). Las membranas son optimizadas

para aumentar su resistencia. La eficacia de este método depende de la concentración del reactivo y del tipo de membrana. Este tipo de método ha mostrado ser aplicable al tratamiento de efluentes textiles sin embargo está en proceso la investigación para saber la eficacia real de este método (Lau e Ismail, 2010 y Poźniak *et al*, 2008).

La adsorción es un proceso de separación de componentes de una fase líquida a una fase sólida; el proceso de adsorción ocurre en dos capas de interface: la superficie del adsorbente y el espacio de adsorción, varios factores intervienen para que se lleve con éxito la adsorción como la química de la superficie, la naturaleza del adsorbente, el efecto de los iones, el tamaño de la partícula, el pH, la temperatura, tiempo de contacto. Sus ventajas son el costo bajo, el diseño sencillo, el manejo fácil del fango. Entre varios métodos químicos y físicos la adsorción ha mostrado ser mejor técnica para el tratamiento de agua con colorante (El Qada *et al*, 2008). Sin embargo los métodos de adsorción como carbón activado es considerado costoso para muchos países debido al uso de material no renovable en los últimos años se ha investigado el uso de material renovable que sea barato como chabacano, fibra de yute, madera, bambú entre otros (Tan *et al*, 2008).

2.5.4. MÉTODOS BIOLÓGICOS BACTERIAS Y HONGOS

Los métodos anaerobios son utilizados actualmente para la remoción de colorantes azo, que están en forma reducida se decoloran actuando como aceptores de electrones para la cadena microbiana de transporte de electrones (Oneil *et al*, 2000). El uso de reactores en condiciones anaerobias con cultivos bacterianos en la decoloración de colorantes azo han resultado efectivos (Pasukphun *et al*, 2006). Los métodos microbianos pueden ser sumamente útiles y potencialmente ventajosos para el tratamiento de compuestos tóxicos debido a su eficacia, su amigabilidad ambiental y la poca energía requerida así como un menor uso de sustancias químicas (Venkata *et al*, 2004). La mayoría de los colorantes azo son fácilmente decolorados por rompimiento de sus enlaces en ambientes anaerobios (Rodríguez *et al*, 2005).

También se han hecho pruebas de decoloración con hongos de putrefacción y han demostrado eliminar colorantes azo, antraquinona, heterocíclicos, colorantes de trifenilmetano y poliméricos (Davies *et al*, 2005). Los hongos de putrefacción son capaces de degradar lignina (un polímero heterogéneo polifenólico) y compuestos aromáticos dentro de sustratos lignocelulósicos. Estos hongos crecen en la madera con humedad tienen apariencia blanca, los más usados son *Basidiomycetos* y *Ascomycetos* (Pointing, 2001).

Los colorantes azo son resistentes a la biodegradación aerobia en plantas de tratamiento convencionales, sin embargo bajo condiciones anaerobias sufren fisión reductiva produciendo aminas aromáticas incoloras, que generalmente requieren condiciones aerobias para su biodegradación. Los procesos anaerobios y aerobios son complementarios, de forma independiente ninguno es suficiente para eliminar la toxicidad de las aguas residuales textiles (Morales y Melgoza, 2009).

En la actualidad hay muchas técnicas diferentes para la descontaminación de aguas coloridas como las físicas, químicas y biológicas y cada una tiene sus propias limitaciones técnicas y económicas. La mayoría de los métodos de eliminación fisicoquímicos de colorantes son caros y se complica más su remediación por componentes que tienen resistencia pero la alternativa son los métodos biológicos que presentan una manera relativamente económica, sencilla, uso reducido de energía, menor tiempo y benéficos con el medio ambiente para eliminar colorantes del agua (Davies *et al*, 2005).

A veces los métodos químicos pueden ser perjudiciales para el ambiente debido al uso de materiales químicos que son muy contaminantes por lo que conlleva a una contaminación secundaria; por lo tanto la solución pueden ser los métodos de biorremediación ya que son una tecnología ambientalmente amistosa y bien vista por la población (Sukumar *et al*, 2009).

2.6. BIOTECNOLOGÍA

Se entiende a la biotecnología como un conjunto de innovaciones tecnológicas basadas en la aplicación de procesos biológicos para obtener bienes y servicios para el desarrollo de actividades científicas de investigación, utilizada también para la limpieza del medio ambiente. Como parte de la biotecnología existe la biorremediación, la cual es una técnica que emplea procesos biológicos que puede utilizarse como auxiliar en la descontaminación, emplea procesos naturales para eliminar las sustancias químicas perjudiciales para el ambiente (Luna *et al*, 2005). Este "uso" intencionado recibió entonces el nombre de biorremediación ("bioremediation"). Las primeras patentes, fundamentalmente para remediación de vertidos de gasolina, aparecen en los años 70. En los años 80 se generalizó el uso del aire y peróxidos para suministrar oxígeno a las zonas contaminadas mejorando la eficiencia de los procesos degradativos. Durante los años 90 el desarrollo de las técnicas de "air sparging" (burbujeo de oxígeno) hizo posible la biorremediación en zonas por debajo del nivel freático. Al mismo tiempo, la implementación en la práctica de aproximaciones experimentales en el laboratorio

permitió el tratamiento de hidrocarburos clorados, los primeros intentos con metales pesados, el trabajo en ambientes anaerobios, etc (Rodríguez *et al*, 2002).

La biodegradación es el término general utilizado para toda la descompostura biológica de compuestos químicos completa que con lleva a una mineralización o parte de ella.

Biotransformaciones es un término que lleva a la conversión de una molécula en un producto menos tóxico.

Bioprecipitación es el proceso en que metales, aminas aromáticas, fenoles, hidroxilos y más compuestos químicos son quitados de soluciones acuosas (Whiteley y Lee, 2006).

2.7. FITORREMIEDIACIÓN

A mediados del siglo XX se desarrollaron las primeras investigaciones encaminadas a estudiar el potencial de las plantas para biodegradar contaminantes (Zobell, 1946).

Una serie de descubrimientos científicos con un enfoque interdisciplinario de investigación ha permitido el desarrollo de una prometedora tecnología ambiental que se llama fitorremediación (Raskin *et al*, 1997). La fitorremediación se define como el uso de plantas verdes o partes de ellas para eliminar o contener contaminantes del ambiente. Es importante notar que esto incluye el uso de vegetación para el tratamiento de agua, de los sedimentos, del suelo y del aire (Macek *et al*, 2000).

El costo de la fitorremediación ha sido estimado en \$25-\$100 USD por tonelada de tratamiento de tierra y \$0.60-\$6.00 USD por 1000 galones para el tratamiento de corrientes acuosas de desecho. En ambos casos se espera bajen más sus costos. Esto representa menos de la mitad del precio que se invertiría para cualquier otra tecnología efectiva (Macek *et al*, 2000).

La fitorremediación es importante para el tratamiento de agua colorida ya que las plantas tienen enzimas peroxidadas que se activan en presencia de colorantes azo, estas que han sido confirmadas por ensayos *in vitro*. Se ha observado que las peroxidadas de *Phragmites* pueden descomponer los enlaces azo y degradarlos a productos secundarios como aminas aromáticas (Davies *et al*, 2009).

Otro ejemplo de fitorremediación es el cattail, una planta acuática de China que ha sido utilizada extensamente en pantanos artificialmente construidos para la eliminación y mineralización de fenoles, de fósforo y metales pesados. Sin embargo la biomasa del cattail puede ser fuente potencial de contaminación como el Jacinto de agua si no es

manejado apropiadamente. La raíz de cattail tiene una estructura porosa y un área grande, que quizás sean utilizados como adsorbentes para tratar colorantes de desecho (Hu *et al*, 2010).

Se han hecho más estudios de degradación de contaminantes con bacterias y hongos que con especies vegetales. Sin embargo poco científicos han puesto atención al potencial que ofrecen las plantas que también pueden degradar los contaminantes (Kagalkar *et al*, 2009). La ventaja de la fitorremediación es su bajo costo ya que puede utilizar vegetales baratos y abundantes con respecto a métodos físicos y químicos, es más fácil de manejar y no requiere de cuidados especiales como el caso de bacterias y hongos (Kagalkar *et al*, 2009).

La fitorremediación ha tenido ganancias enormes en los últimos años. Además de su economía favorable las principales ventajas de fitorremediación en la comparación con métodos clásicos de descontaminación pueden ser resumidas de la siguiente manera: no es perjudicial al ambiente, tiene una alta aceptación pública, evita hacer construcciones o inversiones en aparatos costosos, tiene la flexibilidad para tratar una gama diversa de materiales peligrosos, el costo es mucho más bajo, se puede utilizar en operaciones de limpieza de escala mucho más grande que no es posible por otros métodos. Las desventajas de fitorremediación son: su uso está limitado por las condiciones climáticas y geológicas del sitio como son la temperatura, la altitud, el tipo suelo y la accesibilidad para el equipo agrícola. Los contaminantes almacenados en los vegetales pueden ser soltados otra vez al ambiente. La toxicidad de algunos contaminantes puede ser limitante para la fitorremediación. Puede tomar más tiempo que otras tecnologías. Un mejor conocimiento de las plantas proporcionara una base para la modificación genética para lograr un mejor desempeño (Macek *et al*, 2000).

2.8. ENZIMAS

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas, siempre que sea termodinámicamente posible. En estas reacciones, las enzimas actúan sobre unas moléculas denominadas sustratos, las cuales se convierten en moléculas diferentes denominadas productos. Casi todos los procesos en las células necesitan enzimas para que ocurran a unas tasas significativas. A las reacciones mediadas por enzimas se las denomina reacciones enzimáticas. Como todos los catalizadores, las enzimas funcionan disminuyendo la energía de activación de una reacción, de forma que se acelera sustancialmente la tasa de reacción, consiguen acelerar el proceso incluso millones de veces. Una reacción que se produce bajo el control de una enzima o de un

catalizador en general alcanza el equilibrio mucho más rápido que la correspondiente reacción no catalizada. Al igual que ocurre con otros catalizadores, las enzimas no son consumidas por las reacciones que catalizan, ni alteran su equilibrio químico. Sin embargo, las enzimas difieren de otros catalizadores por ser más específicas (Smith, 1997).

Las enzimas son agrupadas por la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímicos en seis clases funcionales: oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, isomerasas, liasas y ligasas, asignando cada enzima un número de cuatro cifras. El primer describe la clase de enzima, el segundo el enlace, el tercero a una subclase o el grupo funcional y el cuarto a la molécula verdadera. Ejemplo E.C. 2.7.1.1 denota la clase 2 (una transferasa), subclase 7 (transferencia de fosfato), sub-clase 1 (función de alcohol como aceptor de fosfato). El último dígito 1 denota a la enzima hexocinasa (Murray *et al*, 1992 y Whiteley y Lee, 2006).

La mayoría de las enzimas tienen una temperatura óptima, que puede ser relacionada al tipo de organismo de que la enzima fue aislada. Algunos organismos crecen bien cerca de temperaturas ambiente y otras enzimas son más activas en una temperatura alrededor de 30–40 °C (Whiteley y Lee, 2006).

Hoy en día, muchas enzimas son utilizadas por una gran diversidad de tipos de industrias y esto no es ajeno a la industria textil. Tradicionalmente, se han utilizado enzimas en el proceso de limpieza de las fibras. Ahora, las enzimas como las proteasas, lipasas, celulasas y enzimas oxidativas, se utilizan en el bioprocesamiento de fibras naturales, mientras que las peroxidasas son fundamentales en el tratamiento de efluentes derivados de esos procesos. Las enzimas aplicadas en la industria textil deben producirse a bajo costo, ser estables en las condiciones de pH y temperatura en que se realizan los tratamientos textiles, de uso y manipulación segura (Dec y Bollag, 1994).

Actualmente los investigadores están enfocando su atención para estudiar los comportamientos enzimáticos como una potencial y alternativa viable a métodos convencionales, debido a su naturaleza catalizadora y pueden actuar sobre una gran gama de sustancias aromáticas en un tiempo corto. Las enzimas peroxidasas pueden actuar sobre contaminantes recalcitrantes pueden eliminarlos por precipitación o transformación a otro producto (inocuo) y también pueden cambiar las características de un desecho para que sea más fácil de tratar por otros métodos. La acción catalítica de las enzimas es muy eficiente y selectiva comparada con catalizadores químicos debido a tasas más altas de reacción. Pueden catalizar reacciones en temperatura relativamente

bajas y en valores de pH variados. Las enzimas han tenido mucha atención y han sido pagadas en uso de biocatalizadores en varios campos de la biotecnología, su participación ha sido favorable para resolver problemas ambientales por lo que están mejorando día con día (Venkata *et al*, 2004).

2.9. FUNCIONES Y USOS DE LAS PEROXIDASAS

Según el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular se clasifican así: EC (Comisión de enzimas); EC1 (oxidoreductasas); EC 1.11 (tiene como aceptor al peróxido); EC 1.11.1 (pertenece al grupo de las peroxidasas); EC 1.11.1.7 (la enzima que lleva por nombre peroxidasa) (Smith, 1997).

Las peroxidasas están situadas principalmente en la pared celular y las vacuolas produciendo suberina y lignina que sirve para la protección de los tejidos vegetales. Las plantas utilizan las peroxidasas para los mecanismos de defensa como el estrés participa también en la barrera de los radicales de oxígeno evitando la exposición a materiales sulfurosos y metales pesados. (Davies *et al*, 2005). Las enzimas peroxidasas se encuentran tanto en organismos procariontes como en eucariontes a menudo son consideradas como enzimas antioxidantes, protegiendo células de la influencia destructiva de H₂O₂ (Chen y Schopfer, 1999). Las peroxidasas participan en muchos procesos fisiológicos y de desarrollo los más importantes puede ser la germinación y el alargamiento de la célula pero también paradójicamente con reacciones que restringen el crecimiento (Passardi *et al*, 2004).

Una solución alternativa a este problema es la biorremediación mediante la utilización de enzimas peroxidasas (Ortega, 2008). Las peroxidasas son catalizadores versátiles con aplicaciones variadas en procesos industriales (Rukhsana y Husain, 2009).

Las enzimas oxidoreductoras como las peroxidasas eliminan los contaminantes aromáticos y fenólicos de agua contaminada. En vista de que son consideradas efectivas remediadoras se han propuesto para la biorremediación pero la falta de una actividad enzimática elevada en materia biológica y el costo elevado de purificación limita estos proyectos; por lo que se ha dado a la tarea de buscar materias biológicas altas en enzimas peroxidasa (Suhail *et al*, 2005).

Las enzimas biocatalizan oxidativamente el acoplamiento orto oxidativo de fenoles que son contaminantes, seguidos de la precipitación de los polímeros formados en la fase acuosa. Las aguas residuales de las industrias, que se han tratado han tenido éxito utilizando rábano picante, papa y rábano blanco (Dec y Bollag, 1994).

Las peroxidasas (E.C. 1.11.1.7) son capaces de catalizar la oxidación de compuestos fenólicos y azo en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), generando radicales libres que reaccionan entre sí para formar polímeros fenólicos. Estos son insolubles y fácilmente eliminables por floculación y sedimentación. Las peroxidasas de rábano picante (HRP) en presencia de agua oxigenada forman un sistema enzimático que puede hacer biotransformaciones de las moléculas orgánicas como fenoles, aminas, diaminas, hidrocarburos aromáticos, policíclicos (Stibovora *et al*, 1998). Las peroxidasas de HRP (*Armoracia rusticana L.*) y frijol de soya (SBP) (*Glycine max.*) han sido las más estudiadas a este respecto con altos porcentajes de eliminación de compuestos fenólicos (Ortega, 2008).

Las peroxidasas son oxidoreductasas producidas por numerosos microorganismos y plantas reaccionando algunas mejor con el peróxido de hidrógeno. Pueden reaccionar oxidativamente con compuestos aromáticos. Las peroxidasas de rábano picante son conocidas por eliminar fenol y colorantes azo han demostrado una eficiente degradación y precipitación. Las peroxidasas pueden utilizar como sustrato a los grupos aromáticos de los colorantes azo (Mohsina y Khalil, 2009).

Pocos tejidos de plantas han sido probados como fuentes de peroxidasas. Como las peroxidasas de rábano picante (HRP) es la enzima más estudiada para biorremediación y ha sido utilizado principalmente para el tratamiento de fenoles y clorofenoles así como las peroxidasas de soja (SBP) para tratar bisfenol, compuestos policlorados y bifenilicos y las peroxidasas de *Charantia momordica* para el tratamiento de colorantes textiles (Osman *et al*, 2008).

Otra alternativa ya encontrada es el estudio realizado con la peroxidasa de chayote que ha mostrado un gran potencial para la remoción de sustancias tóxicas (Villegas *et al*, 2003).

2.10. PRECIPITACIÓN POR PEROXIDASAS

La precipitación de contaminantes aromáticos como las aminas y los fenoles se logra fácilmente por medio de las peroxidasas debido a que estas enzimas tienen la habilidad de catalizar la polimerización, seguido de una precipitación de los polímeros que se forman en las soluciones acuosas (Karim y Husein, 2009 y González *et al*, sin año). Las peroxidasas de HRP reaccionan con algunos compuestos recalcitrantes como fenoles y aminas aromáticas a través de mecanismos de radicales libres de polimerización. Se mostró que HRP fue efectiva en polimerizar y precipitar colorantes industrialmente

importantes de tipo azo, como azul remazol y rojo cibacrón. Estos colorantes industrialmente utilizados contienen por lo menos un grupo aromático en su estructura. Se encontró también que HRP funcionó mejor a valores de pH menores a 6 (Mohsina y Khalil, 2009).

3. PROBLEMÁTICA

3.1. PROBLEMÁTICA GENERAL AMBIENTAL

El crecimiento económico y la globalización han originado evidentes beneficios pero al mismo tiempo han provocado la aparición de nuevos riesgos. La medición de la exposición a numerosos factores ambientales es compleja porque no disponemos de sistemas adecuados de información y vigilancia sanitaria que permitan valorar la magnitud y gravedad de los riesgos (Vargas, 2005).

La contaminación del aire y del suelo, va acompañada por la contaminación del agua con diferentes sustancias peligrosas, provenientes de las descargas de desechos industriales de diferentes procesos, servicios públicos y actividades agrícolas. Las plantas industriales descargan anualmente enormes cantidades de desechos en lagos, ríos y océanos, afectando frecuentemente los mantos freáticos. Estas descargas pueden ser de origen accidental (derrames) o estructural (presencia permanente de fuentes contaminantes) (Hernández *et al*, 1998). Estos últimos pueden clasificarse de acuerdo con la rama industrial en donde se producen y con base a su composición, como se muestra en la cuadro 1.

La industrialización en la que viven países en desarrollo con un enorme consumo de sustancias químicas causa un peligro ambiental severo y creciente de contaminación (Ong *et al*, 2008). Frecuentemente en México se vierten aguas contaminadas sin un tratamiento previo al drenaje o directamente a los ríos, lo que conlleva a un serio problema ambiental (Villegas *et al*, 2003). La contaminación de los escasos cuerpos de agua con sustancias químicas es una gran preocupación en el mundo (Oliveira *et al*, 2007).

INDUSTRIA	EMISIÓN DE CONTAMINANTE
PETROLERA Y PETROQUÍMICA	Petróleo crudo, aceites, naftas, aromáticos mercaptanos, fenoles, sulfuro de hidrógeno
DEL CARBON	Fenoles, piridina, grasas, amoniaco, hidrocarburo.
PULPA Y PAPEL	Mercaptanos, sulfitos, cetonas, alcoholes, aldehídos, fenoles, colorantes.
TINTES Y PINTURAS	HNO ₃ , H ₂ SO ₄ , fenoles, aminas, colorantes.
POLIMEROS	Alcoholes, hidrocarburos, fenoles, aldehídos, colorantes
DEL CLORO.	Cloro, cloruros, HCl, mercurio

Cuadro 3. Principales industrias contaminantes y tipo de compuestos que emiten al ambiente (Hernández *et al*, 1998).

Si bien es cierto que las aguas subterráneas suelen ser más difíciles de contaminar que las superficiales, cuando esta contaminación se produce, es más costosa y difícil de eliminar. Sucede así porque las aguas del subsuelo tienen un ritmo de renovación muy lento. Se calcula que mientras el tiempo medio de permanencia del agua en los ríos es de días, en un acuífero es de cientos de años, lo que hace muy difícil su saneamiento. En muchas ocasiones, la situación se agrava por el reconocimiento tardío de que se está deteriorando el acuífero, ya que como el agua subterránea no se ve, el problema puede tardar en hacerse evidente (Sainz y Becerra, 2006)..

De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas, un país con escasez de agua es aquel que cuenta con menos de 1000 metros cúbicos disponibles por habitante por año, lo que no es suficiente para proporcionar adecuada alimentación o para respaldar el progreso económico, y es además una causa potencial de severos daños ambientales. Los países con 1000 a 1700 metros cúbicos de agua por persona por año se dice que tienen dificultades hídricas, México se ubica entre los países que se consideran con dificultades hídricas e incluso el área de la ciudad de México está considerada como una cuenca con escasez de agua. En el país existen enormes diferencias regionales en la disponibilidad

de agua, en tanto que un gran aumento de la población y de las actividades industriales ha determinado su disminución (Sainz y Becerra, 2006)..

La calidad del agua es un factor determinante de la salud pública y de los ecosistemas, que restringe la oferta de agua y su distribución potencial para los diferentes usos. El agua está asociada a la transmisión de enfermedades que afectan la salud humana, ya sea por ingestión directa o mediante la contaminación de los alimentos, por lo que su condición está absolutamente relacionada con la calidad de vida de la población. En México los problemas de calidad del agua son severos y tienen un fuerte rezago en su atención comparados con los relativos a la cantidad y a la provisión de servicios a la población. El monitoreo de la estofa del agua es un proceso que debe ser eficaz, regulado y actualizado. De la misma manera, la evaluación de la calidad del agua es indispensable para poder orientar esfuerzos que favorezcan su reutilización. Los recursos hídricos del país están enfrentados a graves problemas de contaminación, los estándares del agua está por debajo de los límites permisibles para la salud humana, tanto las aguas superficiales como las subterráneas, se utilizan como cuerpos receptores de cargas contaminantes (Sainz y Becerra, 2006).

México ocupa el lugar 106 entre 122 países evaluados a partir de un indicador de calidad de agua por el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). Esta evaluación coloca a México como un país cuya calidad del agua debe ser una prioridad de la política hídrica (Sainz y Becerra, 2006).

3.2. PROBLEMAS A CAUSA DE COLORANTES

El color es uno de los indicadores más obvios de contaminación de aguas. Las descargas de color de la industria textil son sumamente fuertes y pueden contaminar verdaderamente los mantos acuíferos. Se estima que del 10 al 15% del colorante se pierde en el efluente después del proceso de teñido. Por lo tanto, el tratamiento de estos colorantes es importante para la protección de aguas naturales (Guivarach *et al*, 2003). Las aguas coloreadas de la industria textil tienen suspensión de sólidos, coloración fuerte y concentraciones bajas de sustancias orgánicas (10-50 mg/L). Además de la industria textil, las industrias del plástico y del papel utilizan colorantes sintéticos. Los colorantes son indeseables, no sólo por razones estéticas, también porque se ha demostrado que muchos colorantes del grupo azo y sus productos de descomposición son tóxicos a la biota acuática (Patsukphun *et al*, 2006).

La industria textil utiliza cantidades grandes de agua y una gran variedad de sustancias químicas orgánicas e inorgánicas. El agua de gran calidad es un factor crucial en las industrias para muchos procesos como limpieza, aclarar, teñir y lavar. Actualmente se recomienda reutilizar el agua para no dañar el ambiente por tal razón debe estimularse el desarrollo sostenible en la industria textil (Katarzina *et al*, 2009).

Un ejemplo evidente de la problemática fue en Brasil en una planta procesadora de colorantes que arrojaba al río Cristais desechos de colorantes azo extensamente utilizados y de este río una comunidad se abastecía de agua por lo que las personas que consumían agua tuvieron problemas mutagénicos ya que estudios posteriores indicaban que el agua contenía restos de azul 373, naranja 37 y violeta disperso 93 (Alves *et al*, 2007).

Estos colorantes azoicos son tóxicos y se distribuyen fácilmente en el ambiente provocando un serio problema de contaminación (Xu *et al*, 2007). A bajas concentraciones son solubles en agua y contaminan fácilmente el suelo y agua (Rodríguez *et al*, 2005).

La estructura de los colorantes azo está diseñada para ser recalcitrante, no biodegradables y persistentes (Venkata *et al*, 2005). Su color se atribuye al enlace azo y a un sistema de dobles enlaces conjugados (Zhang *et al*, 2010) y tienen gran variedad de colores que no se encuentran en los colorantes naturales (Xu *et al*, 2007). La mayor parte de los colorantes sintéticos son compuestos xenobióticos (Davies *et al*, 2009). Para el caso particular de la industria textil, después de un proceso típico de teñido, permanece una gran variedad de sustancias químicas contaminantes, entre ellas los colorantes que no se fijan a las fibras textiles. Los colorantes azo tienen alta cantidad de sulfatos, sulfitos y tiosulfatos un ejemplo de ello es el colorante negro directo 38 (Pricelius *et al*, 2007).

4. JUSTIFICACIÓN

Los colorantes de tipo azoico tienen una toxicidad elevada ya que son cancerígenos y mutágenos para los animales y seres humanos ya que cuando se degrada la molécula de colorante azo se forman arilaminas que son potencialmente cancerígenas, además de que contaminan los mantos acuíferos. Se han realizado numerosos estudios sobre la decoloración de los colorantes azo como son los métodos físicos (adsorción y filtración), químicos (ozonación y uso de peróxidos) y biológicos (bacterias y hongos) que resultan en la mayoría de los casos muy costosos en infraestructura y materiales así como muy laboriosos y tardados, aparte de que cubren reducidas cantidades de agua contaminada a remediar. Por tales motivos se pretende usar métodos de remediación que sean amigables con el ambiente y que eliminen a los colorantes del agua usando la fitorremediación que se ha reportado en los últimos años como una tecnología nueva de descontaminación usando vegetales o parte de ellos con muy buenos resultados y a un bajo costo de inversión por lo que resulta ambientalmente recomendable su aplicación. Las enzimas vegetales peroxidadas se ha demostrado que pueden reaccionar degradando las moléculas de colorantes azo y polimerizar los productos obtenidos de la degradación, por lo cual se pretende usar partes de vegetales que sean abundantes, de desecho y baratos.

5. HIPÓTESIS

Las peroxidadas vegetales son capaces de efectuar biotransformaciones sobre los colorantes de tipo azo y se han utilizado exitosamente para la decoloración de agua contaminada; por lo que si utilizamos vegetales altos en contenido de enzimas peroxidadas se podrá decolorar el agua con negro directo 38.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar si las peroxidasas del tallo de brócoli (*Brassica oleracea var itálica L*), la cáscara de melón (*Cucumis melo*) y el tallo de flor de calabaza (*Cucurbita pepo*) pueden decolorar el agua contaminada con negro directo 38.

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar en todos los experimentos la actividad peroxidasa de tallo brócoli (TB), cáscara de melón (CM) y tallo de flor de calabaza (TFC).

Analizar cual de las siguientes preparaciones de cada uno de los vegetales del inciso anterior es mejor para llevar a cabo la biorremediación: jugo, licuado, secciones o bagazo.

Efecto de la concentración de ND-38 en el porcentaje de decoloración.

Evaluar el efecto del peróxido de hidrógeno en el proceso de biorremediación usando varias cantidades de peróxido de hidrógeno.

Evaluar la influencia del pH en la biorremediación con las especies vegetales usadas. Usando soluciones amortiguadoras en el colorante a pH (2, 4, 6, 8, 10, 12).

Utilizando el espectrofotómetro de UV-visible, evaluar si hay cambios en la molécula del colorante después de la biorremediación.

7. METODOLOGÍA

7.1. EQUIPO Y MATERIALES USADOS

El material vegetal se compró en el mercado y no se conocen las condiciones de almacenamiento ni su origen.

Reactivos: Agua destilada de la FES Zaragoza, el H₂O₂ es marca Aldrich al 30%, el guayacol grado reactivo marca Sigma, negro directo 38 puro. Las sales, ácidos y bases que se usaron son grado reactivo son marca Baker (ver anexo).

Equipo: Espectrofotómetro UV- visible Genesys 10 marca Thermo; espectrofotómetro UV visible marca Perkin-Elmer-Lambda 2; balanza analítica marca Adventurer Ohaus; centrifuga marca Solbat C-600; agitador rotatorio marca Barnstead Lab Line Max-Min 4450.

7.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA

A una celda del espectrofotómetro se le adicionó 1 mL de solución buffer de fosfatos pH 6, 200 µl de guayacol (1% en alcohol), 200 µl de H₂O₂ (0.5% en agua destilada), 1 mL de agua destilada, se agita manualmente se lee en el espectrofotómetro (Genesys 10 UV) a una longitud de onda de 470 nm. Esta primera lectura corresponde al tiempo 0. Posteriormente se adicionó el extracto enzimático (5 µl) se tomó las lecturas de absorbancia cada 10 segundos durante 1 minuto.

Las actividades enzimáticas se reportan como actividad específica (unidad/g de planta):

$$\left(\left(\frac{(\text{Abs } 2 - \text{Abs } 1)}{\epsilon} \right) (2.85) \right) / \text{CMEE}$$

Abs 2= absorbancia al minuto.

Abs 1= absorbancia antes de añadir las enzimas.

Coefficiente de extinción del tetrámero guayacol. $\epsilon = 5.2/\text{mM cm}$

Cantidad de microlitros del extracto enzimático. (CMEE)=0.005

Constante de la relación entre actividad enzimática y coeficiente de extinción= 2.85

Las lecturas de absorbancia que se tomaron con el espectrofotómetro estuvieron entre 0.2 a 0.9 nm.

7.3. MÉTODO PARA MEDIR LAS CONCENTRACIONES DE ND-38

Se obtuvieron 2 mL del agua tratada con los extractos enzimáticos y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min, se agregaron 200 microlitros de sobrenadante a la celda del espectrofotómetro con 1.8 mL de agua destilada. Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro Genesys 10 UV - visible a 504 nm a diferentes intervalos de tiempo y con la curva estándar se calcularon las concentraciones de colorante.



Figura 3: Espectrofotómetro Genesys 10 UV-visible, las celdas y las micropipetas usadas en la experimentación.

7.4. PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Para este experimento se utilizó el mismo lote de cada vegetal y ND-38 a 1000 ppm.

Jugo: Se preparó con un extractor de jugos. Se obtuvo jugo de TB, CM y TFC

Secciones: Se cortó el vegetal en secciones de 5 mm de largo y 2 mm de ancho de TB, CM y TFC.

Bagazo: Se obtuvo del residuo del extractor.

Licuada: Con licuadora se molió 15 g de los vegetales: TB, CM y TFC más 5 mL agua destilada.

En frascos de 50 ml, con los vegetales seleccionados se mezcló por separado (15 mL de jugo, 15 g de vegetal en secciones, 15 g de bagazo y 15 mL de licuada) con 15 mL de colorante ND-38 a una concentración de 1000 ppm, se colocaron los frascos en agitación rotatoria a 250 rpm y se midieron las absorbancias a 504 nm a intervalos de tiempo de 24 horas, hasta que el colorante disminuyó notoriamente.

Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de decoloración:

$$\% \text{ Decoloración} = ((\text{abs inicial} - \text{abs final}) / \text{abs inicial}) * 100$$

Se graficaron los porcentajes de decoloración.

7.5. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL ND-38 EN EL PORCENTAJE DE DECOLORACIÓN

En frascos de 50 mL, con los vegetales seleccionados se mezcló 15 mL de jugo con 15 mL de colorante ND-38 a concentraciones de 250, 500, 1000 ó 1500 ppm, se colocaron los frascos en agitación rotatoria a 250 rpm y se midieron las absorbancias a 504 nm cada 24 horas, hasta que el colorante disminuyó notoriamente. Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de decoloración: $\% \text{ Decoloración} = ((\text{abs inicial} - \text{abs final}) / \text{abs inicial}) * 100$

Se graficaron los porcentajes de decoloración.

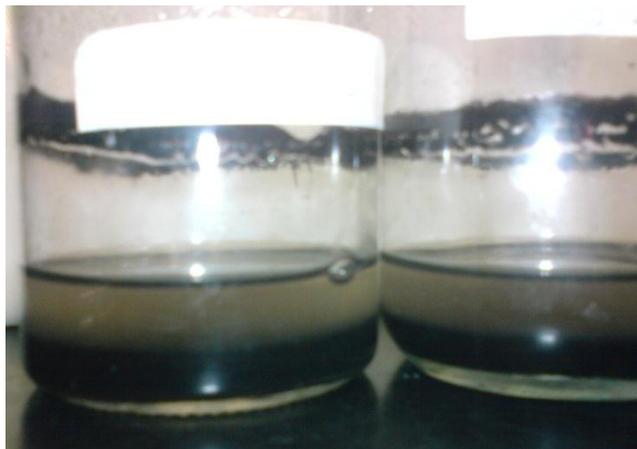


Figura 4: Frascos con material vegetal y ND- 38 a 1000 ppm en biorremediación.

7.6. EFECTO DE LOS VALORES DE pH 2, 4, 6, 8, 10, 12 EN LA BIORREMEDIACIÓN

Composición de las soluciones amortiguadoras:

pH 2 (0.2M KCl + 0.2M HCl); pH 4 (0.1M NaAc + 0.1HAc); pH 6 y 8 (0.1M Na₂HPO₄ + 0.1M KH₂PO₄); pH 10 (0.05M NaHCO₃ + 0.1M NaOH); pH 12 (0.2M KCl + 0.2M NaOH)(Ver anexo).

Se obtuvieron 50 mL de cada solución amortiguadora y se les agregaron 0.05 g de ND-38 para tener una concentración de 1000 ppm, de cada una de esas soluciones se tomaron 15 mL y se colocaron cada una de ellas en un frasco serológico a cada uno de los cuales se les agregó posteriormente 15 mL del extracto de los vegetales, finalmente se colocaron en agitación rotatoria a 250 rpm, se midió la absorbancia a 504 nm cada 24 horas, hasta que el colorante disminuyó notoriamente. Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de decoloración: % Decoloración= ((abs inicial - abs final) / abs inicial) * 100. Se graficaron los porcentajes de decoloración.

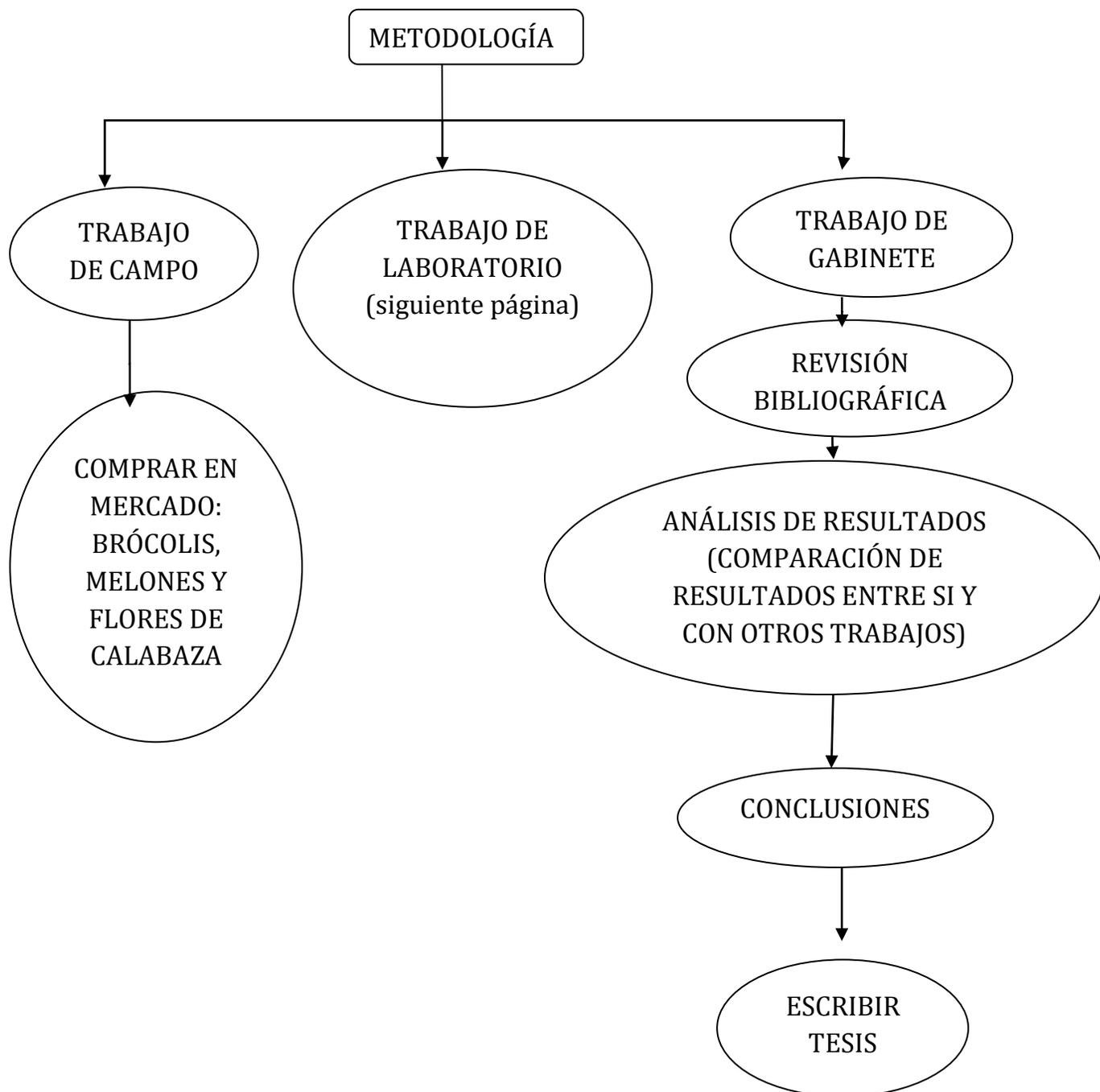
7.7. EFECTO DEL H₂O₂ EN LA BIORREMEDIACIÓN

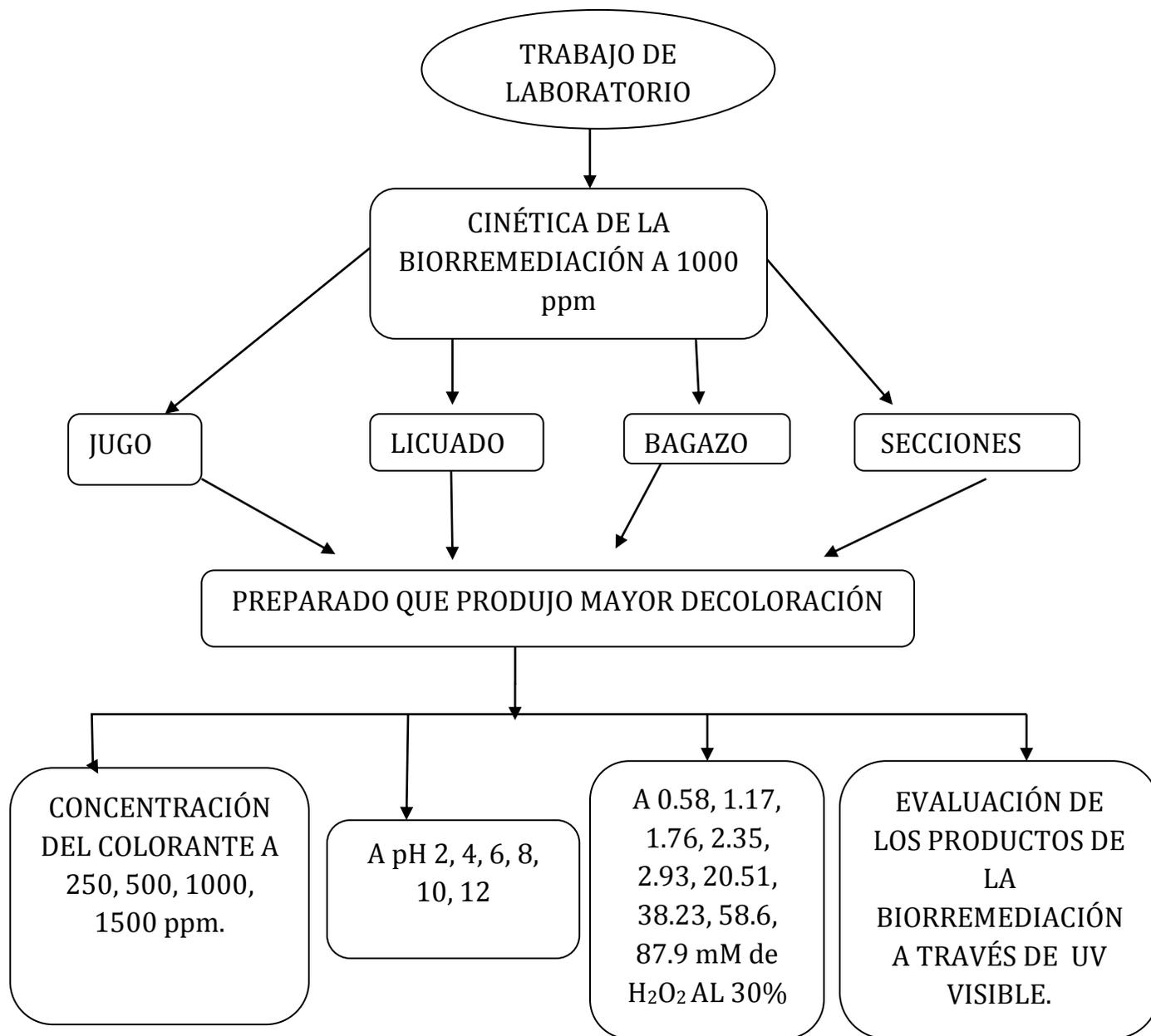
En frascos de 50 mL, con los vegetales usados se mezcló 15 mL de jugo vegetal con 15 mL de ND-38 a 1000 ppm y se le añadió 0.58, 1.17, 1.76, 2.35, 2.93, 20.51, 38.23, 58.6, 87.9 mM de H₂O₂ al (30%) respectivamente a cada frasco (se analizaran un total de 27 frascos con las muestras). Se colocaron en agitación rotatoria a 250 rpm, se midió su absorbancia a 504 nm cada 24 horas, hasta que el colorante disminuyó notoriamente. Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de decoloración: % Decoloración = ((abs inicial - abs final) / abs inicial) * 100. Se graficaron los porcentajes de decoloración.

7.8. ESPECTROS DE UV-VISIBLE DE LOS PRODUCTOS DE LA BIORREMEDIACIÓN

El precipitado obtenido después de la centrifugación del agua tratada con peroxidasas de cada vegetal usado se lavó con acetona, se filtró con papel filtro, se obtuvieron los espectros del visible y se compararon con el espectro de ND-38 puro.

7.9. DIAGRAMAS DE FLUJO DE ACTIVIDADES





7.10. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDADES	2009								2010			
	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR
1.- búsqueda bibliográfica.	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2.- Conocer la actividad peroxidasa de cada una de las especies vegetales que se empleen.		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
3.- Evaluar la forma de preparación del material vegetal (las tres especies).		x	x									
4.- Evaluar la velocidad de biorremediación del negro directo 38 con cada una de las especies vegetales seleccionadas.				x	x	x	x					
5.- Evaluar cual es la concentración del colorante óptima para el proceso de biorremediación para los tres vegetales.				x	x	x	x					
6.- Evaluar el efecto del peróxido de hidrogeno en la biorremediación.							x	x	x			
7.- Evaluar el pH óptimo para el proceso de biorremediación con las especies vegetales.							x	x	x	x		
8.- Evaluar alguno de los productos de la reacción en la biorremediación con cada vegetal.										x	x	x
9. - Redacción de tesis.	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. ACTIVIDAD PEROXIDASA DE LAS ESPECIES VEGETALES USADAS EN CADA EXPERIMENTO

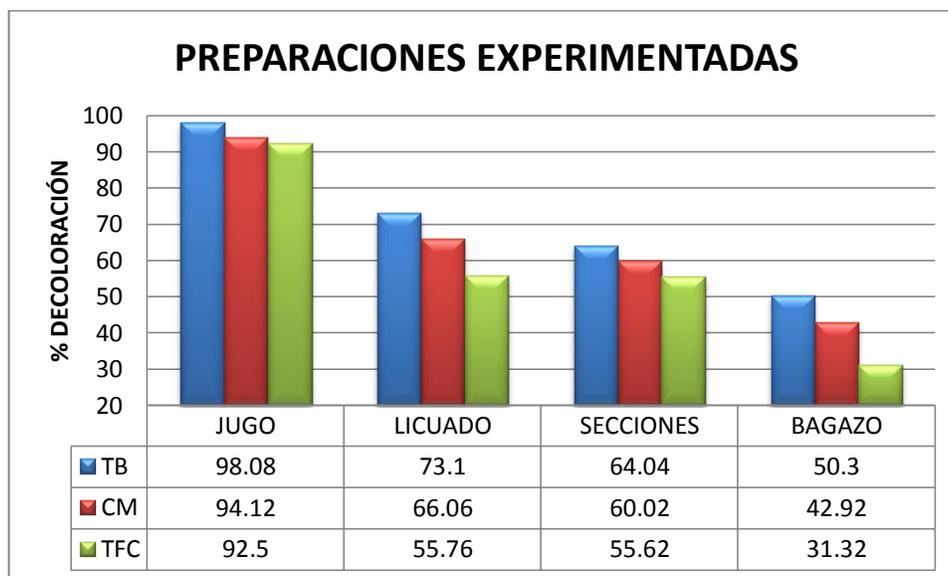
La actividad peroxidasa se expresa en u/g (unidad por gramo de vegetal), se colocaron los valores de las actividades peroxidasa de cada vegetal que se midieron antes de realizar cada uno de los cuatro experimentos: 1) forma preparación del vegetal; 2) efecto de la concentración de ND-38 en el porcentaje de decoloración; 3) efecto del peróxido de hidrógeno y 4) efecto del pH en la decoloración.

FECHA	EXPERIMENTO	TB	CM	TFC
Noviembre 2009	Preparados vegetales	64.05	48.12	32.99
Enero 2010	Evaluación de la concentración de colorante en % decoloración	66.5	37.81	30.83
Febrero 2010	Biorremediación Peróxido de hidrógeno	68.83	38.03	26.52
Marzo 2010	pH	72.67	55.20	24.77

Cuadro 4. Actividad peroxidasa con cada vegetal usado en cada experimento y fecha de todos los vegetales usados.

8.2. FORMAS DE PREPARACION DE LOS VEGETALES

Los materiales vegetales para realizar la biodecoloración se prepararon de 4 diferentes formas: a) con extractor de jugos, b) en licuadora c) secciones de 0.5 cm y d) bagazo. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la gráfica 1.



Gráfica 1. Porcentajes de decoloración de las preparaciones que se probaron a las 72 h de tratamiento.

Con TB se obtuvieron los mejores resultados en forma de jugo (98.08%) a 1000 ppm en 72 horas. De manera semejante Villegas *et al*, (2003) realizó los tratamientos para decolorar azul cibarron a 50 ppm con jugo y con bagazo, encontrando un 95% de decoloración con el jugo y un 81% con bagazo en 60 minutos en los dos casos, mientras que en este trabajo el bagazo obtuvo su máxima decoloración con TB con 50.3% de decoloración, posiblemente en el bagazo los resultados fueron más bajos debido a que ahí se encuentran solamente las enzimas no solubles.

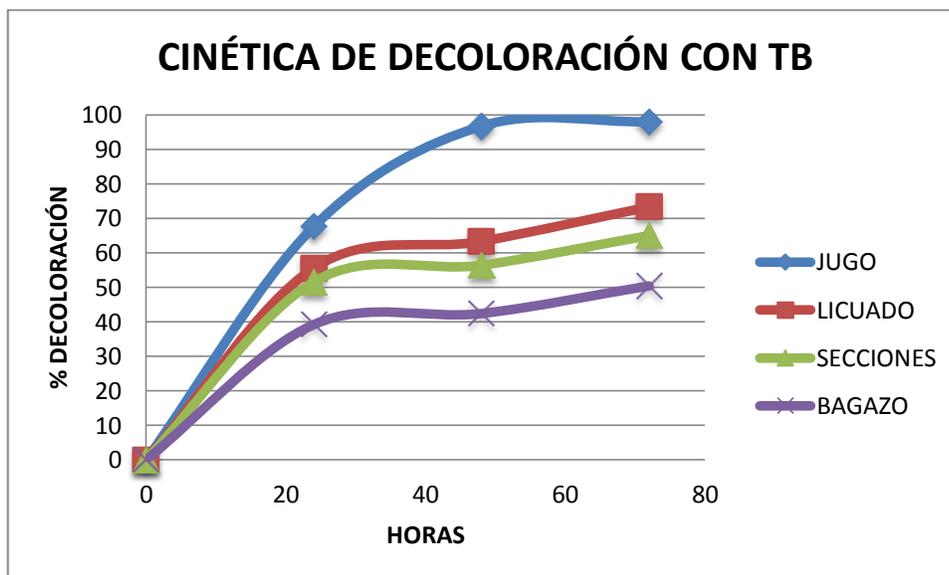
En forma de jugo de TB y TFC trabajó Domínguez, (2009) para eliminar fenol 0.5 mM del agua, obtuvo el 50% de eliminación con TFC y 60% con TB en 5 horas, en forma parecida se obtuvo con TB 67% y TFC 44% de decoloración de ND-38 en 24 horas por lo que se observa una similitud en los resultados de ambos trabajos.

En este trabajo la preparación en jugo en todos los vegetales logró los más elevados porcentajes de decoloración, en licuado la biodecoloración fue menor probablemente porque en jugo se tiene una mayor concentración de peroxidasa que en licuado.

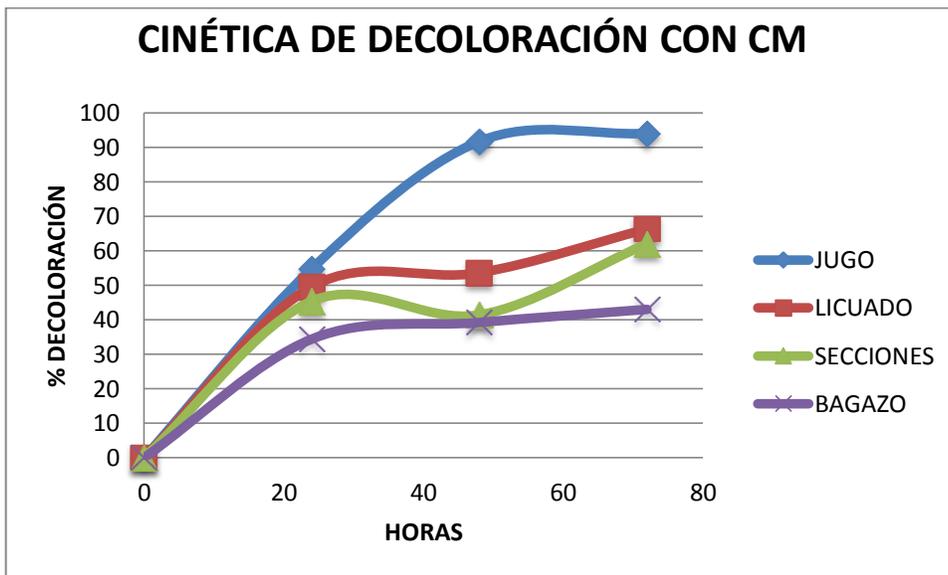
En forma de secciones trabajó Domínguez, (2009) para eliminar fenol 0.5 mM del agua logrando con TB y TFC el 100% de eliminación en 24 horas en ambos casos. Se utilizaron secciones de los vegetales empleados debido a que las peroxidadas que se encuentran en el tejido vegetal están inmovilizadas (Dec y Bollag, 1994) en nuestro experimento los resultados obtenidos de esta manera estuvieron entre el 55 y 64% de decoloración.

8.2.1. CINÉTICAS DE DECOLORACIÓN DE LAS FORMAS DE PREPARACIÓN

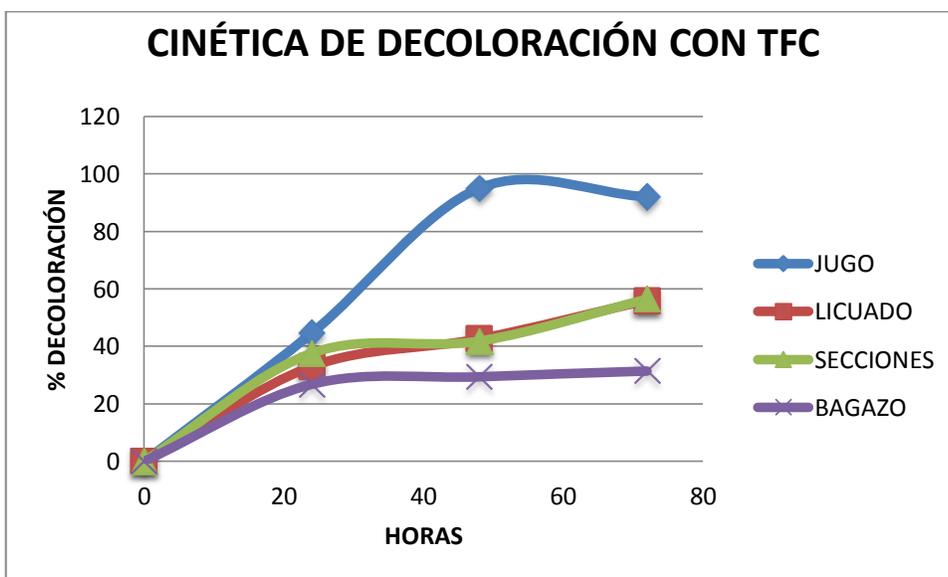
En las gráficas se presentan los cambios en porcentaje de decoloración con respecto al tiempo con las tres especies vegetales.



Gráfica 2. Cinética de decoloración con todas las formas de preparación del TB



Gráfica 3. Cinética de decoloración con todas las formas de preparación de CM



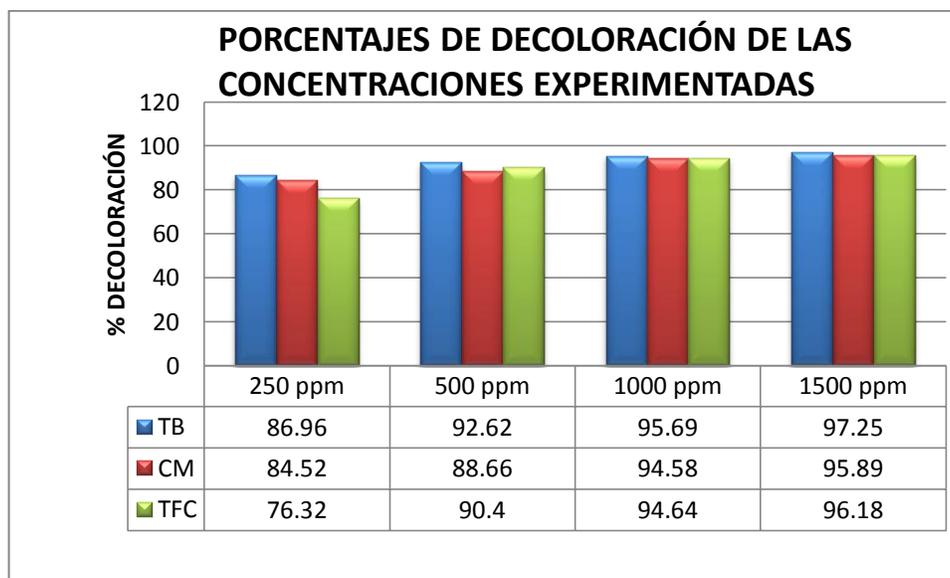
Gráfica 4. Cinética de decoloración con todas las formas de preparación del TFC

Nótese que a las 48 horas la preparación en jugo con TB, CM y TFC logra porcentajes elevados de 91-96% de decoloración por lo que se puede dar por terminado el tratamiento en ese momento ya que sería innecesario continuar hasta las 72 horas.

Se puede observar que el vegetal con mayor actividad peroxidasa que es el TB tiene más actividad peroxidasa (cuadro 4) y decolora con mayor eficiencia al ND-38 en las condiciones de este experimento que son temperatura ambiente a una concentración de 1000 ppm de colorante con agua.

8.3. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL ND-38 EN EL PORCENTAJE DE DECOLORACIÓN CON LA PREPARACIÓN EN JUGO.

Los resultados obtenidos a 250, 500, 1000 y 1500 ppm con cada vegetal usado se muestra en la gráfica 5.



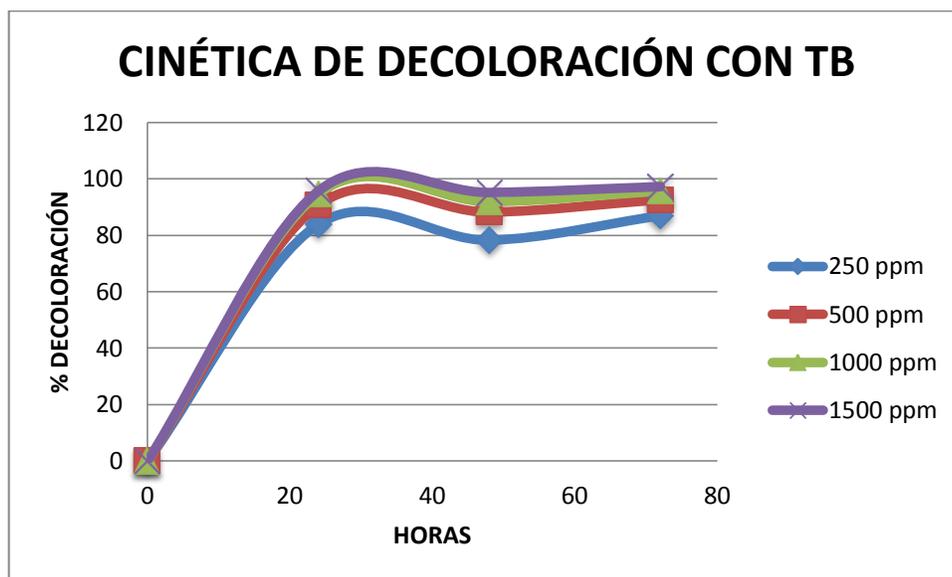
Gráfica 5. Porcentaje de decoloración con TB, CM y TFC a 250, 500, 1000 y 1500 ppm.

En la biorremediación a una concentración de 1500 ppm con los vegetales usados se logró un porcentaje de decoloración de 96-97%. Mientras que a 1000 ppm se obtiene de 94-95% de decoloración con TB, CM y TFC, esto es un 1% menos que a 1500 ppm por lo que se considera que ambas concentraciones son adecuadas para llevar a cabo la biorremediación.

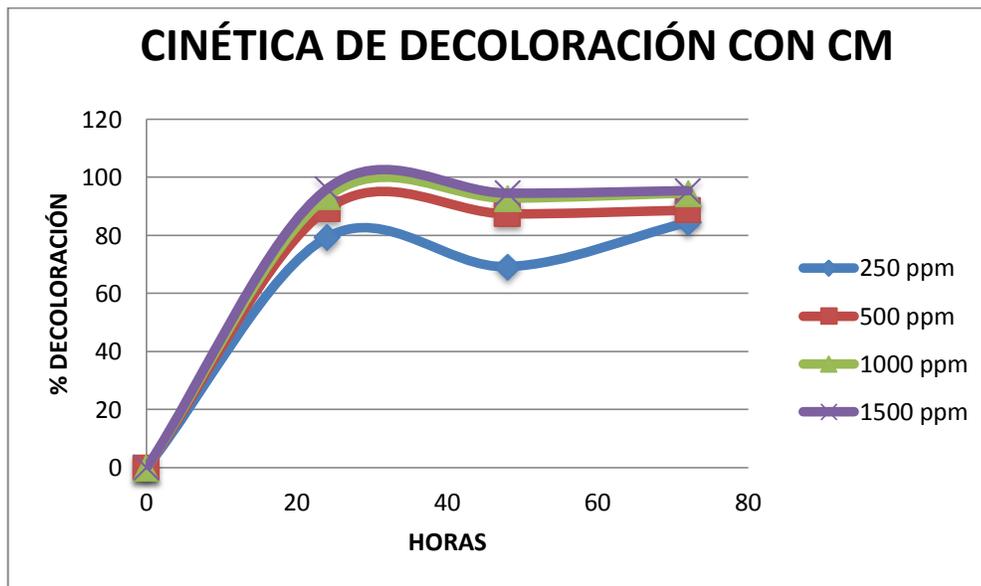
Para comparar el efecto de la concentración en el porcentaje de decoloración Kagalcar *et al*, (2009) uso extracto de raíces de *Blumea malcolmii* con el contaminante rojo

directo 5 a diferentes concentraciones, a 10 ppm logró la máxima decoloración con un 68% a 20 ppm obtuvo un 61%, un porcentaje de decoloración más bajo se observó a 100 ppm, esto indica que una concentración alta de colorante probablemente podría inhibir las actividades de las enzimas.

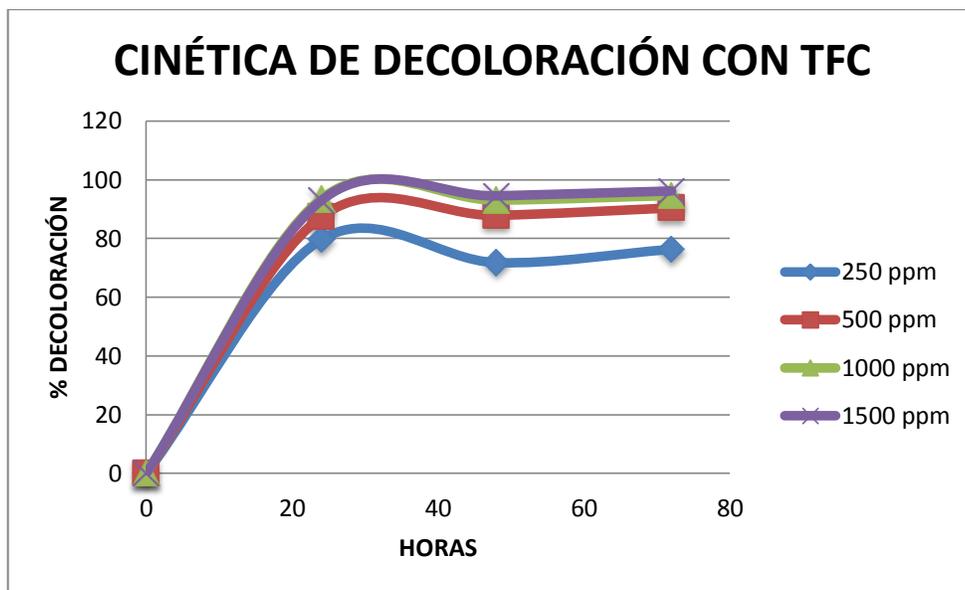
8.3.1. CINÉTICAS DE DECOLORACIÓN A DIFERENTES CONCENTRACIONES



Gráfica 6. Cinética de decoloración con todas las concentraciones de ND-38 usadas con el TB.



Gráfica 7. Cinética de decoloración con todas las concentraciones de ND-38 usadas con el CM.

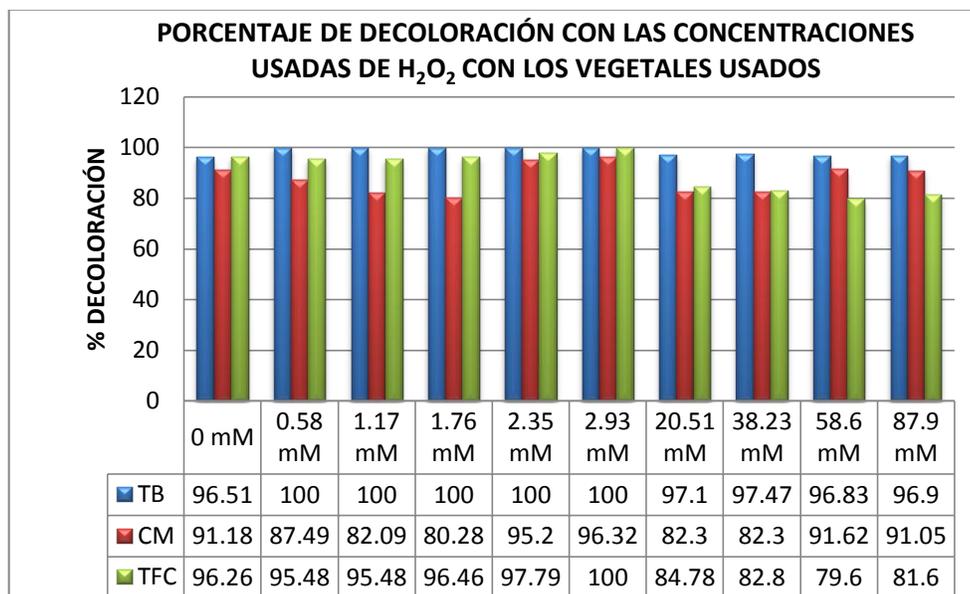


Gráfica 8. Cinética de decoloración con todas las concentraciones de ND-38 usadas con el TFC.

Observese que la concentración de 1500 ppm a 72 horas con todos los vegetales usados se obtienen los porcentajes de decoloración más altos (96 a 97%) por lo que a esa concentración se elimina más cantidad de ND-38 del agua, pero a 24 horas se logra de 92-95% de decoloración convendría terminar el tratamiento en ese momento. Las concentraciones de 250 y 500 ppm obtuvieron los valores más bajos de decoloración.

8.4. EFECTO DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN LA BIORREMEDIACIÓN CON MATERIAL VEGETAL EN JUGO.

Resultados obtenidos con la adición de 0.58, 1.17, 1.76, 2.35, 2.93, 20.51, 38.23, 58.6 y 87.9 mM de H₂O₂ al 30% con cada vegetal usado.



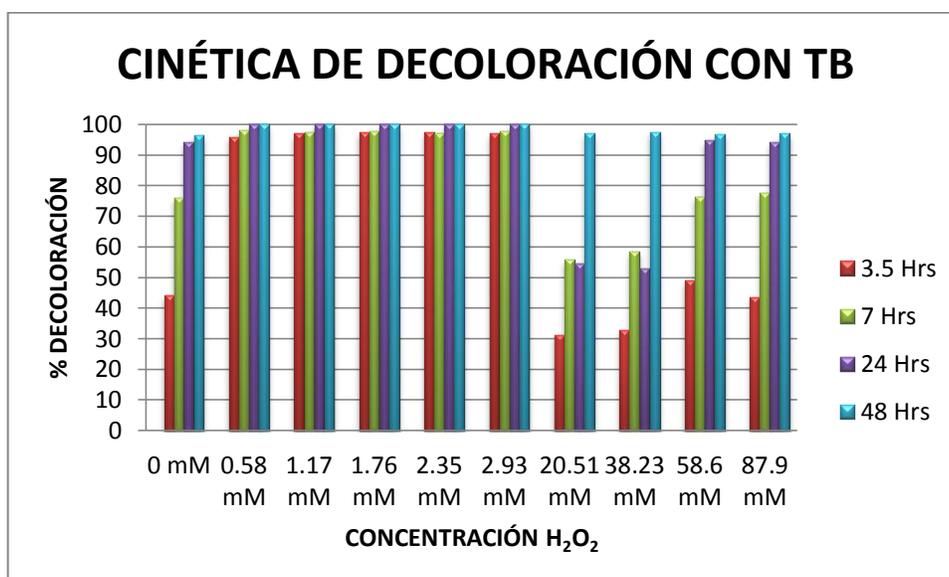
Gráfica 9. Comparación de los porcentajes de decoloración del agua tratada con TB, CM y TFC y con la adición de varias concentraciones de peróxido de hidrógeno al 30%.

El empleo de peróxido de hidrógeno en la biorremediación mostró que con la adición de 2.93 mM de H₂O₂ al 30% se obtienen los mejores porcentajes de decoloración de 93 a 100% con los vegetales usados. Mientras que Kumar *et al*, (2009) obtiene 99% de eliminación con la adición de 3 mL de H₂O₂ al 30% y con 1 mL de H₂O₂ al 30% logró 98% de eliminación para decolorar rojo congo con zeolita, sin embargo encontró que el aumento de la concentración de H₂O₂ puede dar lugar a la formación de radicales libres que aceleran la decoloración, pero el exceso de H₂O₂ pudiera dar lugar a la formación de radicales de hidroperóxido (OH•), que no contribuirían a la decoloración.

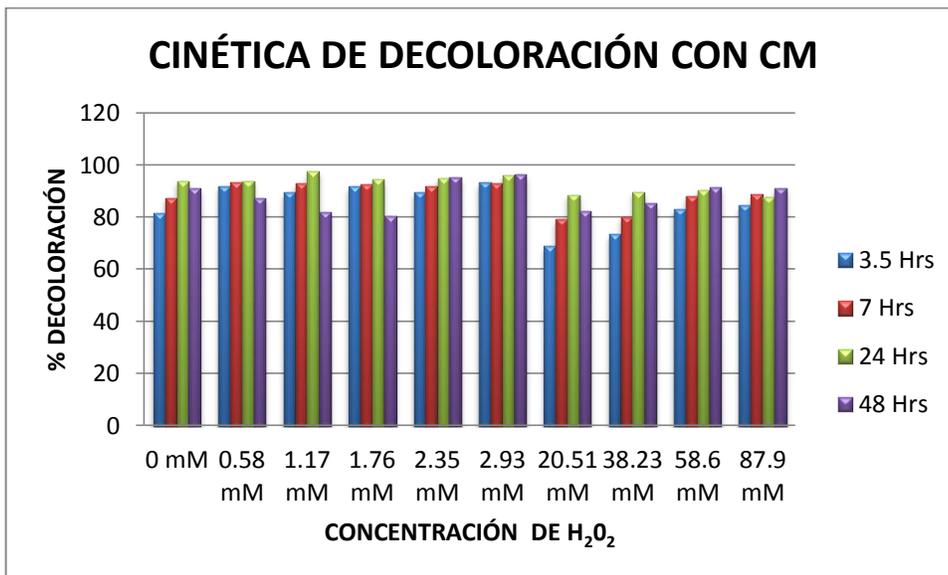
Se han reportado trabajos de uso de peroxidases sin el empleo de peróxido de hidrógeno como el realizado por Kagalkar *et al*, (2009), que obtuvo 96% de decoloración de verde malaquita a 20 mg L⁻¹ en 72 horas usando raíz de *Blumea malcolmii* notándose que obtiene un buen porcentaje de decoloración.

En la biorremediación con H₂O₂ y con uso de TB, CM y TFC se logró aumentar de manera no significativa el porcentaje de decoloración.

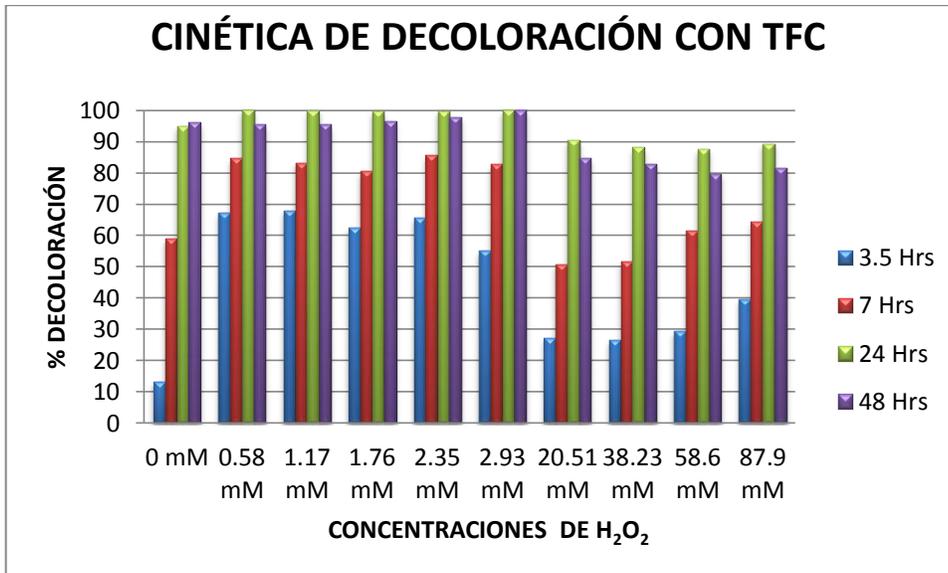
8.4.1. CINÉTICAS DE DECOLORACIONES DE LAS CONCENTRACIONES USADAS DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO CON TB, CM Y TFC.



Gráfica 10. Cinética de decoloración con todas las concentraciones de H₂O₂ que se utilizaron con TB.



Gráfica 11. Cinética de decoloración con todas las concentraciones de H₂O₂ que se utilizaron con CM.

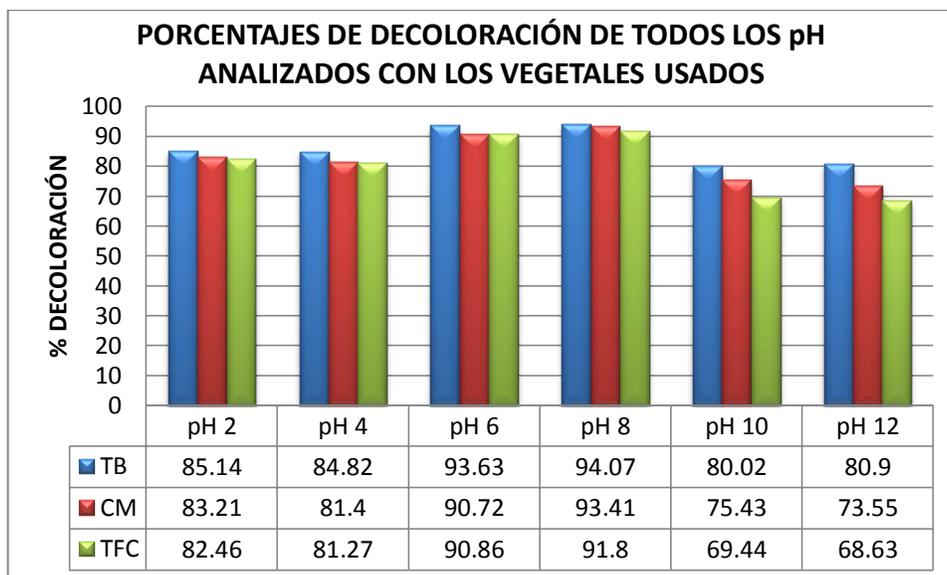


Gráfica 12. Cinética de decoloración con todas las concentraciones de H₂O₂ que se utilizaron con TFC.

La concentración en que se logró el mayor porcentaje de decoloración con los tres vegetales usados fue 2.93 mM de peróxido de hidrógeno de 93-100% de decoloración.

8.5. EFECTO DEL pH EN LA BIORREMEDIACIÓN CON MATERIAL VEGETAL EN JUGO

Los resultados obtenidos de la biorremediación con valores de pH 2, 4, 6, 8, 10 y 12 se muestran en la gráfica 13.

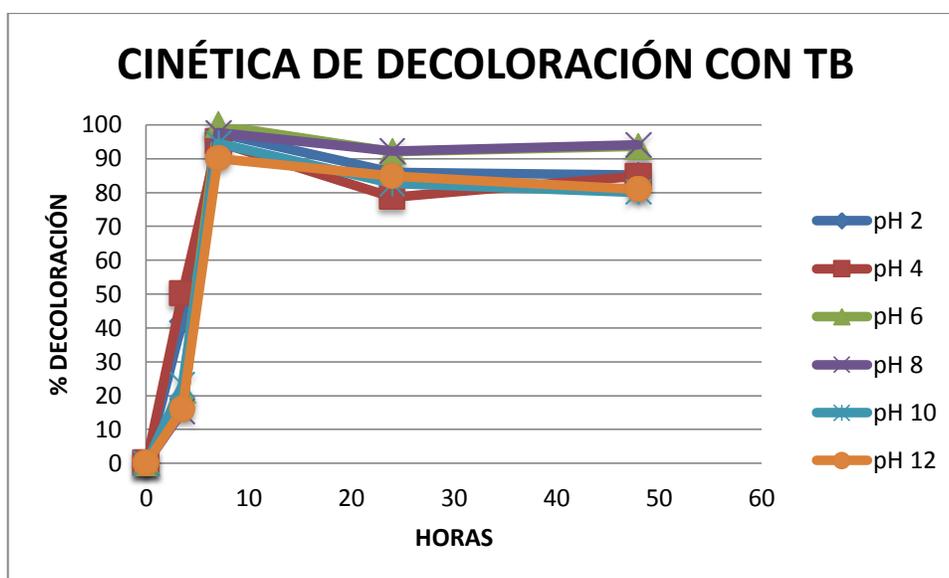


Gráfica 13. Comparación de los porcentajes de decoloración de todos los valores de pH que se experimentaron con el agua tratada y los vegetales usados.

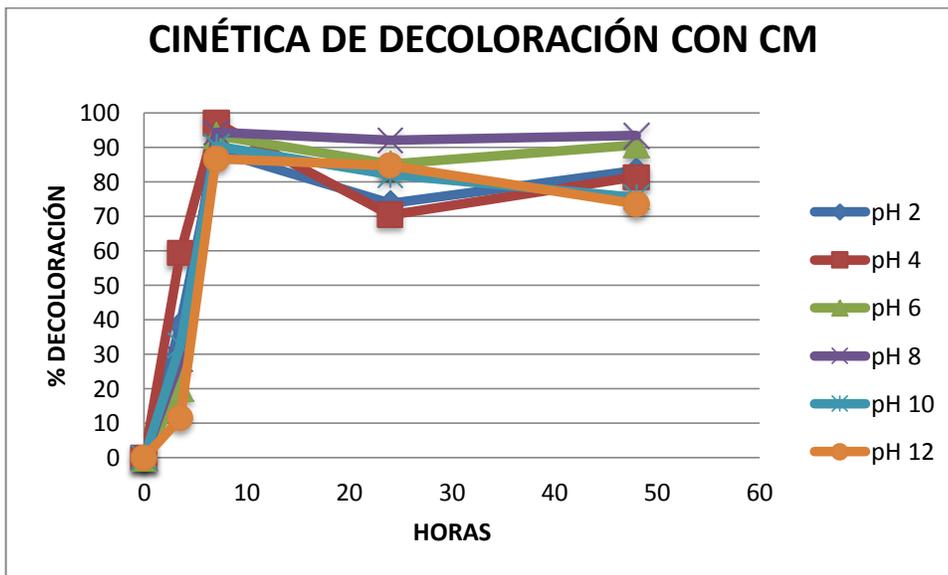
Rukhsana y Husain, (2009) reportó que las enzimas tienen un pH típico en que muestran su actividad máxima, la decoloración en su trabajo se llevó a cabo mejor en valores de pH 4 y 6 para decolorar rojo directo 120 con peroxidasa inmovilizada de *Raphanus sativus* por lo que a valores de pH ácido o neutro las peroxidasa podrían decolorar mejor los colorantes azo. Los estudios realizados con TB, CM y TFC mostraron porcentajes de decoloración de 90-93% en pH 6 que fue el valor de pH por debajo de la neutralidad que mejor funcionó en la biorremediación. A pH 5 ácido Matto y Husain, (2009) logró su máxima decoloración con 95% usando rojo directo 23 con peroxidasa inmovilizada de nabo, observándose que los valores por debajo del pH 5 logran menores resultados de decoloración. La biorremediación a valores de pH 2 y 4 con TB, CM y TFC lograron porcentajes de 81-85% de decoloración. Kumar *et al*, (2009) encontró que entre los valores de pH 7-8 funcionan mejor las peroxidasa en pH 8 obtuvo una máxima decoloración de 80% en 240 minutos y con pH 7 el 100% de decoloración para

decolorar el rojo congo con zeolita usado como catalizador. Cuando se lleva a cabo la biorremediación de ND-38 con TB a pH 8 se logra 94% de decoloración. A diferencia de los porcentajes de eliminación que presenta Kumar *et al*, (2009) con pH 9 logró el 10% de eliminación y con pH 11 logró 0% de eliminación de colorante rojo congo remediado con zeolita, observándose que se logran porcentajes bajos. Cuando se utilizó el tratamiento con TB a valores de pH de 10 y 12 se obtuvo porcentajes de decoloración de 68-80% los más bajos de las biorremediaciones con los distintos valores de pH que se utilizaron.

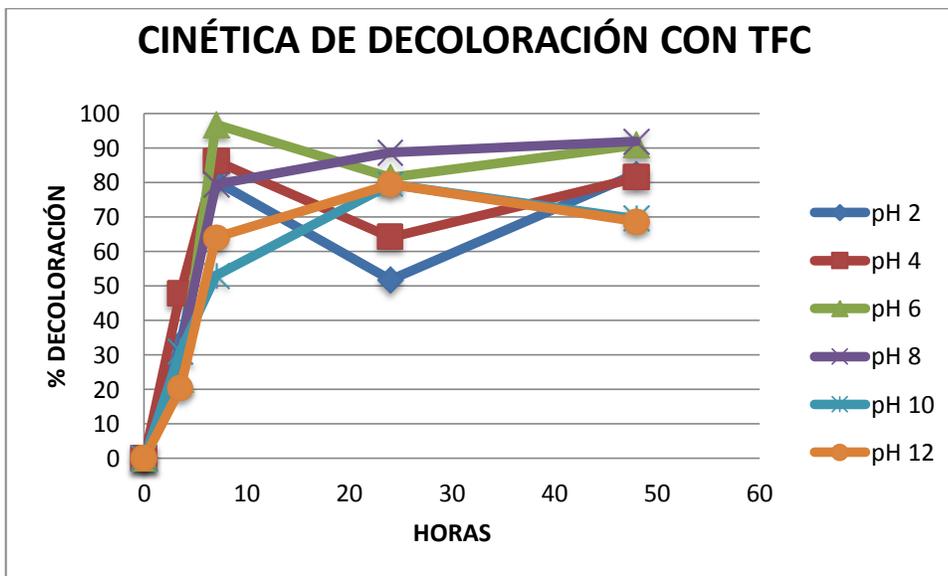
8.5.1. CINÉTICAS DE DECOLORACIÓN DE LOS VALORES DE pH UTILIZADOS



Gráfica 14. Cinética de decoloración de todos los valores de pH con TB.



Gráfica 15. Cinética de decoloración de todos los valores de pH con CM.



Gráfica 16. Cinética de decoloración de todos los valores de pH con TFC.

Los valores de pH que logran los porcentajes de decoloración más elevados son 6 y 8 con todos los vegetales usados a las 48 horas de reacción, notándose su máxima decoloración a las 7 horas de remediación.

En las siguientes imágenes se observa las coloraciones del agua biorremediada a distintos valores de pH después de la centrifugación.

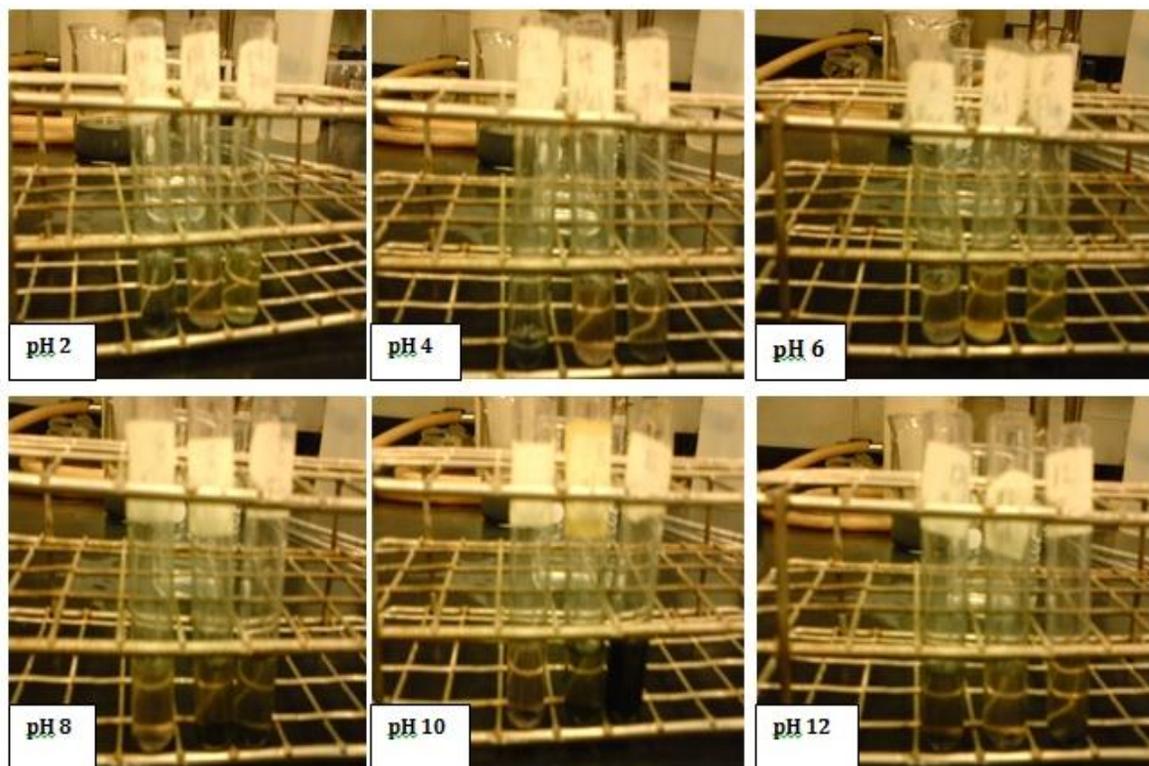


Figura 5. Fotografías de tubos de ensaye con agua biorremediada después de centrifugarse a distintos valores de pH.

En el pH 2 se observa que el tubo de la izquierda muestra una coloración verde transparente con TB; el tubo del centro muestra la coloración rosada con CM y el tubo de la derecha muestra la coloración verde transparente con TFC.

En el pH 4 el tubo de la izquierda muestra una coloración verde transparente con TB; el tubo del centro muestra la coloración rosada con CM y el tubo de la derecha muestra la coloración verde transparente con TFC.

A pH 6 se ve que el tubo de la izquierda muestra una coloración morada tenue con TB; el tubo del centro muestra la coloración rosada con CM y el tubo de la derecha muestra la coloración verde transparente con TFC.

En el pH 8 el tubo de la izquierda muestra una coloración morada tenue con TB; el tubo del centro muestra la coloración café con CM y el tubo de la derecha muestra la coloración café con TFC.

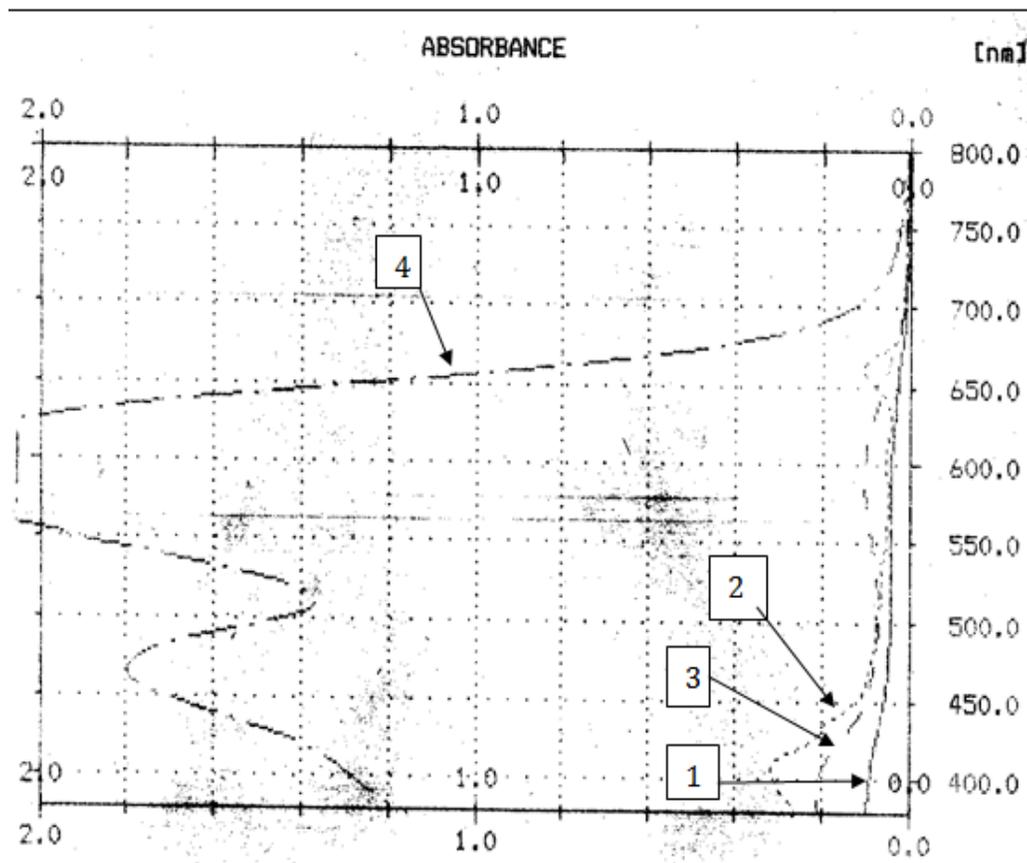
A pH 10 el tubo de la izquierda muestra una coloración café claro con TB; el tubo del centro muestra la coloración café oscuro con CM y el tubo de la derecha muestra la coloración café muy oscuro con TFC.

A pH 12 el tubo de la izquierda muestra una coloración café oscuro con TB; el tubo del centro muestra la coloración café oscuro con CM y el tubo de la derecha muestra la coloración café oscuro con TFC.

Las coloraciones en los valores de pH usados en la biorremediación con TB, CM y TFC son tenues en pH ácidos y fuertes en pH alcalinos debido a los pigmentos de los vegetales que reaccionan produciéndose las diferentes coloraciones.

8.6. ESPECTROS VISIBLES DE LOS PRODUCTOS DE LA BIORREMEDIACIÓN.

Después del tratamiento del agua modelo con las peroxidasas se obtuvo un precipitado negro, al que se le realizó el espectro del visible para determinar si la molécula de colorante ND-38 tuvo una modificación estructural (gráfica 17) se observa la desaparición de la banda en 575 nm y de 470 nm correspondientes al colorante azo ND-38 (Gnanamami *et al*, 2004) y la aparición de un pico en 410 nm correspondientes a los productos de reacción de biorremediación por lo que se infiere un cambio de estructura en la molécula.



Gráfica 17. Espectro del visible con el uso de TB (1), CM (2), TFC (3) y ND-38 puro (4).

Matto y Husain, (2009) ha reportado que los colorantes azo pueden ser eliminados por precipitación por la implicación de radicales libres seguido de una polimerización y finalmente una precipitación. Este proceso posiblemente es la explicación de lo que ocurrió en el presente trabajo en todos los experimentos de biorremediación y con todos los vegetales usados.

En la figura 6 se observan las soluciones de los botones filtrados con acetona resultantes de la centrifugación del agua tratada con peroxidadas de TB, CM y TFC.

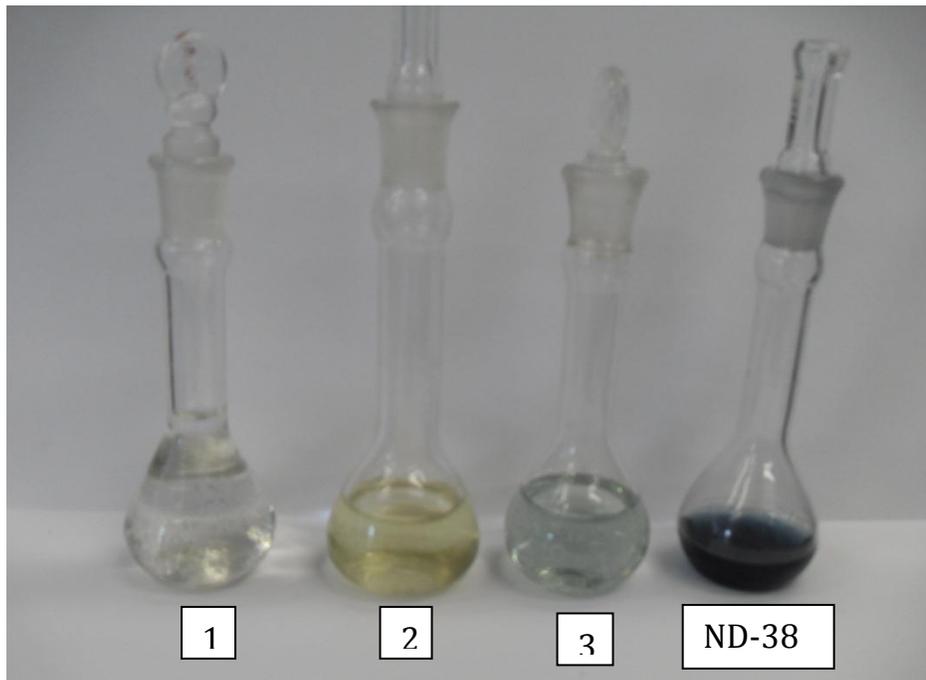


Figura 6. Soluciones de los botones filtrados con acetona resultantes de la centrifugación del agua tratada con peroxidadas de TB (1), CM (2) y TFC (3). Y El matraz de la derecha es (ND-38 puro).

En el siguiente cuadro se observa los métodos empleados, la concentración y el porcentaje de decoloración de varios autores que han experimentado decolorar el ND-38 con diferentes resultados.

Método empleado	Concentración de ND-38	% Decoloración	Referencia
Decoloración con jugo de Tallo de brócoli	1500 ppm	97	Presente trabajo
Oxidación avanzada en reactores usando $\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$	300 ppm	98	Pokrywiecki <i>et al</i> , 2006
Reactor en condiciones secuenciales anaerobias/aerobias	70 ppm	100	Sponza <i>et al</i> , 2005
Incubación de <i>Bjerkandera</i> en condiciones estáticas	1:5	66	Yonni <i>et al</i> , 2008
Decoloración usando cultivos de <i>Cardiobacterium hominis</i> y <i>Pseudomonas stutzeri</i>	100 ppm	90.5	Bafana <i>et al</i> , 2007

Cuadro 5. Porcentajes de decoloración de diferentes métodos usados para decolorar el ND-38.

9. CONCLUSIONES

El TB es el vegetal con mayor actividad peroxidasa 68.12 u/g y el que obtiene los más altos porcentajes de decoloración en todas las biorremediaciones. TB logró 98% de decoloración de ND-38 siendo el mejor, seguido de la CM con 94% de decoloración y con TFC 92% de decoloración.

Se obtuvo mayor eliminación del colorante ND-38 cuando se utilizó la preparación en jugo con todos los vegetales usados.

La concentración óptima de ND-38 para llevar a cabo la biorremediación es 1500 ppm

El peróxido de hidrógeno tiene un efecto poco significativo en el proceso de biorremediación.

Los valores de pH 6 y 8 son los ideales para la biorremediación con TB, CM y TFC.

Las peroxidasas mostraron un efecto de precipitación hacia el colorante ND-38 en todos los experimentos realizados.

Las peroxidasas son una alternativa interesante para la eliminación de estos compuestos de sitios contaminados.

Sin embargo, es claro que en ambientes reales, las enzimas tendrán que eliminar o compartir el medio con una gran variedad de sustratos que no han sido probados en el laboratorio.

Si hubo cambios en la molécula de negro directo 38 después de la biorremediación.

10. RECOMENDACIONES

Realizar la biorremediación a más de 1500 ppm de ND-38 para saber el límite de acción de las peroxidasas en la decoloración de ND-38.

Realizar la biorremediación con más de 87 mM de peróxido de hidrógeno para saber si hay algún efecto negativo o positivo en el porcentaje de decoloración.

Pese al tratamiento dado al ND-38 aún persisten restos de contaminante, se recomienda aplicar nuevamente el tratamiento de peroxidasas con el jugo de TB al agua biorremediada para saber si son eliminados los restos de contaminante.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. AITEX . 2003. Colorantes azoicos. Review. Directiva 2002/61/CE. <http://www.textil.org/extranet/inf/Revista8/colorantes.pdf>
2. Alves de Lima R. O, Bazon A. P, Favero Salvadori D. M, Rechb C. M, Palma Oliveira D, Aragao Umbuzeiro G. 2007. Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. *Mutation Research* 626: 53–60.
3. Ames B. N, Kanmen H. O, 1975. Hair dyes are mutagenic: Identification of a variety of mutagenic ingredients. *National Administration Science*. 72:6: 2423-2427
4. Bafana A, Sivanesan S. D, Kannan K, Tapan Ch. 2007. Kinetics of decolourisation and biotransformation of direct black 38 by *C. hominis* and *P. stutzeri*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 74:1145–1152.
5. Braz R, Pirra A, Marco S. L, Peres, J.A. 2010. Combination of long term aerated storage and chemical coagulation/flocculation to winery wastewater treatment. *Desalination* 263:226–232.
6. Carias C.C, J, Novais M, Martins Dias S. 2007. *Phragmites australis* peroxidases role in the degradation of an azo dye. *Water science & Tecnology*. Vol 3: 263-269.
7. Chen S. X, Schopfer P. 1999. Hydroxyl-radical production in physiological reactions a novel functions of peroxidase. *Eur. J. Biochem*. 260: 726-735.
8. Davies L.C, C.C. Carias, J.M. Novais, Martins Dias S. 2005. Phytoremediation of textile effluents containing azo dye by use *Phragmites australis* in a vertical flow intermittent feeding constructed wetland. *Ecological Engineering* 25: 594–605.
9. Davies L.C , Ferreira R, Cabrita G, Novais J, Martins Dias S. 2009. Are plants a solution for textile wastewater treatment? *New Biotechnology* Volume 25: 2:5:32.
10. Dec J, Bollag J.M. 1994. Use of plant material for the decontamination of water polluted with phenol. *University Park Pennsylvania* 16: 802, 1994.
11. Domínguez Alfaro N.N. 2009. Fitorremediación de compuestos fenólicos en aguas residuales, con peroxidases vegetales. Tesis Licenciatura (Biólogo)-UNAM, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
12. El Qada E. D, Stephen J. A, Walker. G. M. 2008. Adsorption of basic dyes from aqueous solution onto activated carbons. *Chemical Engineering Journal* 135: 174–184.

13. Gnanamani A, Bhaskar M, Radhakrishnan G, Sekaran G, Sadulla S. 2004. Chemical and enzymatic interactions of Direct Black 38 Direct Brown 1 on release of carcinogenic amines. *Chemosphere* 56: 833–841.
14. Gómes. A.C, Nunes. J. C, Simões. M. S. R. 2010. Determination of fast ozone oxidation rate for textile dyes by using a continuous quench-flow system. *Journal of Hazardous Materials* 178: 57–65.
15. González Rodríguez C, Quintanilla Guerrero F.; García Almendárez, B, Regalado C. (sin año). Métodos de inmovilización de peroxidasa de nabo y su aplicación en la destoxicación de soluciones fenólicas. DIPA, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro.
16. Guivarach E, Trevin S, Lahitte C, Mehmet A. 2003. Degradation of azo dyes in water by Electro-Fenton process. *Environ Chem Lett.* 1:38–44.
17. Hernández I. J, Aguilar E, López I. 1998. Descomposición de fenol en medio acuoso con peróxido de hidrógeno catalizada por cenizas provenientes de la combustión de carbón mineral. Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco y el Instituto del petróleo.
18. Hu Z, Hui Ch, Feng J.b, Yuana S. 2010. Removal of Congo red from aqueous solution by cattail root. *Journal of Hazardous Materials* 173: 292–297.
19. Kagalkar A. N, Umesh B. J, Jyoti P, Jadhav, Vishwas A. Bapat , Sanjay P. Govindwar. 2009. Biotechnological strategies for phytoremediation of the sulfonated azo dye Direct Red 5B using *Blumeamalcolmii* Hook. *Bioresource Technology.* 100: 4104–4110.
20. Karim Z, Husain Q. 2009. Redox-mediated oxidation and removal of aromatic amines from polluted water by partially purified bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63: 587–593.
21. Katarzyna P, Jadwiga S L, Anna K, Renata Z. 2009. Integration of nanofiltration action biological processes for textiles wastewater treatment. *Environment protection Engineering.* 35:2:98-104.
22. Kumar A.K, Kumar. P, Chand. S. 2009. Catalytic wet peroxide oxidation of azo dye (Congo red) using modified Y zeolite as catalyst. *Journal of Hazardous Materials* 166: 342–347.
23. Lau. W. J, Ismail. A. F. 2010. Polymeric nanofiltration membranes for textile dye wastewater treatment: Preparation, performance evaluation, transport modelling, and fouling control a review. *Desalination* 245: 321–348.

24. Luna F. V, Fernández A, González E, Patiño R, Álvarez G. 2005. Emprendiendo la fitorremediación en México. Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Guanajuato.
25. Macek T, Macková M, Ká J. 2000. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances* 18: 23–34.
26. Matto M, Husain Q. 2009. Decolorization of direct dyes by immobilized turnip peroxidase in batch and continuous processes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.72:965–971.
27. Mohey. A. E-D, Libra J. A, Wiesmann. U. 2003. Mechanism and kinetic model for the decolorization of the azo dye Reactive Black 5 by hydrogen peroxide and UV radiation. *Chemosphere* 52: 1069–1077.
28. Mohsina H, Khalil R. 2009. Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry*. 115: 1177–1186.
29. Morales Guzmán F, Melgoza. A. R. M. 2009. Tratamiento del Colorante Azo Rojo Directo 23 mediante Reactores Discontinuos Secuenciados Anaerobios/Aerobios. *Información Tecnológica Vol. 20(1)* 73-82.
30. Murray, Granner, Mayes Rodwell. *Bioquímica de Harper*. 1992. 12va Edición. Editorial. El Manual Moderno, S.A. de C.V. México.
31. Mustafa I, Sponza D.T. 2004. Decolorization of azo dyes under batch anaerobic and sequential anaerobic/aerobic aonditions. *Journal of environmental science and health*. Vol. A39, No. 4, pp. 1107–1127.
32. Oliveira D, Carneiro P. A, Sakagami M. K, ZanoniM.V , Pisela A. Umbuzeiro.2007. Chemical characterization of a dye processing plant effluent—Identification of the mutagenic components. *Mutation Research* 626: 135–142.
33. O'Neil A, Lopez S, Esteves F, HawkesD. R, Hawkes I, Wilcox S. 2000. Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic treatment system operating on simulated textile effluent. *Appl Microbiol Biotechnol*. 53: 249-254.
34. Ong S.A, Katsuhiko U, Daisuke I, Kazuaki Y. 2008. Simultaneous removal of color, organic compounds and nutrients in azo dye-containing wastewater using up-flow constructed wetland. *Journal of HazardousMaterials* 165: 696–703.
35. Ortega Tovar M. A. (2008). Eliminación de Compuestos fenólicos mediante su polimerización catalizada por peroxidasa de nabo (*Brassica napus* L). Universidad Autónoma de Querétaro.
36. Osman A, Dimitris P. M, Panagiotis K. 2008. Investigation on biocatalytic properties of a peroxidase-active homogenate from onion solid wastes: An insight into quercetin oxidation mechanism. *Process Biochemistry*. 43:861–867.

37. Pavia L. D, Lampman G. M, Kriz G. S. 1978. Química Orgánica experimental. Productos naturales compuestos de interés farmacológico e industrial, Editorial Eunibar.
38. Passardi F, Penel C, Dunand Ch. 2004. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science* 9: 11.
39. Pasukphun N, Vinitnantharat S, Gheewala H. Shabbir K. 2006. Performances and kinetic characteristics of acclimatized and acclimatized activated sludge for reactive azo dye removal from simulated textile wastewater. *Environmental Engineering and Management Journal* 5: 635-648.
40. Platzek T, Lang C, Grohmann, Gi U.S, Baltes W. 1999. Formation of a carcinogenic aromatic amine from an azo dye by human skin bacteria in vitro. *Human & Experimental Toxicology*. 18, 552-559.
41. Pointing S. B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*. 57:20-33.
42. Pokrywiecki T, Casaril L, Bertoldi A.L, 2006. Advanced oxidation processes applied to tannery wastewater containing Direct Black 38—Elimination and degradation kinetics. *Journal of Hazardous Materials*. B: 135 274-279.
43. Poźniak Gryzelda, Poźniak Ryszard, Kazimiera A. Wilk. 2008. Removal of dyes by micellar enhanced ultrafiltration. Wrocław University of Technology, Faculty of Chemistry Wybrzeże Wyspiańskiego. 27, 50-370. Wrocław, Poland.
44. Pricelius S, Held C, Murkovic M, Bozic M, Kokol V, Cavaco P. A, Guebitz G. M. 2007. Enzymatic reduction of azo and indigoid compound *Appl Microbiol Biotechnol*. 77:321-327.
45. Raskin. I, Smith R.D, Salt D.E. 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology*. 8: 221-226.
46. Rodríguez A, J. García, G, Ovejero M. M. 2009. Wet air and catalytic wet air oxidation of several azo dyes from wastewaters: the beneficial role of catalysis. *Water Science & Technology*. 60:8.
47. Rodríguez Macias A, Gunther G, Zayas Pérez M. T, Villegas Rosas M. L. (2005). Remoción de colorantes azul cibacróm, maxilóm y amarillo caballito de agua artificialmente contaminada utilizando la peroxidasa y/o bagazo de chayote. Posgrado en Ciencias Ambientales. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Tecnología y biotecnología ambiental.
48. Rodríguez M.J, Olivio M. L. Rodríguez G.R. (2002). Biomineralización anaerobia de colorantes en aguas residuales de la industria textil de Coahuila. *Biot UAC*.

49. Rukhsana S, Husain Q. 2009. Applications of Celite-adsorbed white radish (*Raphanus sativus*) peroxidase in batch process and continuous reactor for the degradation of reactive dyes. *Biochemical Engineering Journal* 46: 96–104.
50. Sainz Santamaría J, Becerra Pérez M. 2006. Los conflictos por el agua en México: avances de investigación, Instituto Nacional de Ecología. México. 5: 43-55.
51. Smith A. L. (1997). *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*, Oxford University Press.
52. Sponza D.T, Mustafa I,şık. 2005. Reactor performances and fate of aromatic amines through decolorization of Direct Black 38 dye under anaerobic/aerobic sequential. *Process Biochemistry*. 40: 35–44.
53. Stiborova M, Befekadu A, Pave A. 1998. Horseradish peroxidase-mediated formation of benzenediazonium ion from a non-aminoazo dye, 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene (Sudan I) and its binding to DNA. *Department of Biochemistry, Faculty of Natural Sciences, Charles University*. 2: 387-390.
54. Sugano Y, Yuko M, Makoto S. 2006. Complete decolorization of the anthraquinone dye Reactive blue 5 by the concerted action of two peroxidases from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1. *Appl Microbiol Biotechnol*. 73:862–871.
55. Suhail A, Amjad A. K, Qayyum H. 2005. Partially purified bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase catalyzed decolorization of textile and other industrially important dyes. *Bioresource Technology*. 96: 1804–1811.
56. Sukumar. M, Sivasamyb A, Swaminathanb G. 2009. In situ biodecolorization kinetics of acid red 66 in aqueous solutions by *trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials*. 167: 660–663.
57. Tahir H, Sultan M, Qazi J. 2009. Remediation of azo dyes by using household used black tea as an adsorbent. *African Journal of Biotechnology* 8:15. 3584-3589.
58. Tan I.A.W, Ahmad A.L, Hameed. B.H. 2008. Adsorption of basic dye on high-surface-area activated carbon prepared from coconut husk: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Journal of Hazardous Materials* 154: 337–346.
59. Tuesta E.G, Vivas M, Sun R, Gutarra A. 2005. Modificación química de arcillas y su aplicación en la retención de colorantes. *Rev. Soc. Quím. Perú* 71:1: 26-36.
60. Vargas M. F. 2005, La contaminación ambiental como factor determinante de salud. *Rev. Esp. Salud pública*. Vol. 79: 2, Madrid España.
61. Venkata M, Krishna P. K, Chandrasekhara R. N, Sarma P. N. 2005. Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process. *Chemosphere*. 58: 1097–1105.

62. Villegas R; Geissler, G; Handall S. A, González V. E. 2003. Inmovilización de una peroxidasa de chayote y su potencial aplicación en la remoción de sustancias fenólicas en aguas contaminadas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 19 2: 73-81.
63. Whiteley. C. G, Lee D.J. 2006. Enzyme technology and biological remediation. *Enzyme and Microbial Technology*. 38: 291–316.
64. Xu M, Jun G, Guoping S. 2007. Biodegradation of textile azo dye by *Shewanella decolorationis* S12 under microaerophilic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol*. 76:719–726.
65. Yonni F, Fasoli H, Gai M, Álvarez H. 2008. Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad sobre colorantes textiles. *Higiene y Sanidad Ambiental*. 8: 331-334.
66. Zhang M.M, Wen Ming Ch, Bor Yann Ch, Chang Tang Ch, Chung Chuan H, Yongtao D, Kae Long L, Huizhong X. 2010. Comparative study on characteristics of azo dye decolorization by indigenous decolorizers. *Bioresource Technology*. 10:2651–2656.
67. Zobell, C.E. 1946. Action of microorganisms in hydrocarbons. *Bact. Rev.* 10:1-49.

12. ANEXO

12.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Negro directo 38 a **(1500 ppm)**: Pesar 1.5 g de negro directo 38 y aforar a 1 litro de agua destilada.

Negro directo 38 a **(1000 ppm)**: Pesar 1 g de negro directo 38 y aforar a 1 litro de agua destilada.

Negro directo 38 a **(500 ppm)**: Pesar 0.5 g de negro directo 38 y aforar a 1 litro de agua destilada.

Negro directo 38 a **(250 ppm)**: Pesar 0.250 g de negro directo 38 y aforar a 1 litro de agua destilada.

Buffer de fosfatos (10 mM, pH 6.1): 11.9 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y 1.75 g de fosfato disódico (Na_2HPO_4) aforar a 1 L con H_2O destilada, se conserva en refrigerador.

12.2. SOLUCIONES PARA CURVA ESTÁNDAR

ppm	Pesar ND-38 en (mg)	
16	1.6	Aforar en 100 mL de agua destilada
23	2.3	
31	3.1	
39	3.9	
47	4.7	
56	5.6	

Cuadro 6. Soluciones que se utilizaron de ND-38 en la curva estándar.

12.3. SOLUCIONES AMORTIGUADORAS

Buffer pH 2	50 mL de KCl 0.2M	Más	13 mL de HCl 0.2M
Buffer pH 4	2.45 g de NaAc	Más	41 mL de HAc 0.2M
Buffer pH 6	100 mL de KH_2PO_4 0.1M	Más	11.2 mL de NaOH 0.1M
Buffer pH 8	13.42g de Na_2HPO_4 0.1M	Más	0.72 g de KH_2PO_4 0.1M
Buffer pH 10	100 mL de NaHCO_3 0.05M	Más	21 mL de NaOH 0.1M
Buffer pH 12	50 mL de KCl 0.2M	Más	12 mL de NaOH 0.2M

Cuadro 7. Preparaciones de las soluciones amortiguadoras que se utilizaron.