



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA  
INGENIERÍA AMBIENTAL – AGUA

“DECOLORACIÓN DEL COLORANTE AZUL DIRECTO 2  
MEDIANTE PEROXIDASAS”

**TESIS**  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN INGENIERÍA**

**PRESENTA:**  
María Yesenia Vargas Espinoza

**TUTOR PRINCIPAL**  
Dra. Gabriela Eleonora Moeller Chávez,  
Facultad de Ingeniería-Campus Morelos

**COMITÉ TUTOR**  
Dra. Georgina Fernández Villagómez, Facultad de Ingeniería  
Dr. Simón González Martínez, Instituto de Ingeniería  
Dra. María Lioba Osnelda Villegas Rosas,  
Programa de Maestría y Doctorado en Ingeniería  
Dra. Marisela Bernal González, Facultad de Química

MÉXICO, D. F. ENERO, 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO PROGRAMA DE MAESTRÍA Y  
DOCTORADO EN INGENIERÍA

**JURADO ASIGNADO:**

- Presidente:** Dr. Simón González Martínez
- Secretario:** Dra. Fernández Villagómez Georgina
- 1er. Vocal:** Dra. María Lioba Osnelda Villegas Rosas
- 2do. Vocal:** Dra. Marisela Bernal González
- 3er. Vocal:** Dra. Gabriela Eleonora Moeller Chávez

**LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS:**

Universidad Nacional Autónoma de México  
Campus Morelos  
Paseo Cuauhnáhuac 8532  
Colonia Progreso  
C.P. 62550  
Jiutepec, Morelos  
México.

**TUTOR DE TESIS**

---

Dra. Gabriela Eleonora Moeller Chávez



---

---

## AGRADECIMIENTOS

*A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a la división de estudio de Posgrado de la Facultad de Ingeniería, campus Morelos y al Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.*

*A la Dra. Gabriela Moeller Chávez, por brindarme su valiosa asesoría, dirección, comprensión, apoyo, por compartir conmigo su conocimiento y por ser un ejemplo de excelencia en el trabajo, mi más sincero agradecimiento.*

*A la Dra. Osnelida Villegas Rosas, por las aportaciones, comentarios y correcciones realizados a este trabajo, y sobre todo por brindarme su amistad muchas gracias.*

*A la Dra. Georgina Villágomes, por las aportaciones, comentarios y correcciones muy valiosas realizadas a este trabajo.*

*A la Dra. Marisela Bernal, por todas sus observaciones para mejorar este trabajo.*

*Al Dr. Simón González por todos sus comentarios que siempre fueron muy positivos para mejorar y llegar a la culminación de este trabajo, muchas gracias.*

*A Erika Viviana Miranda por todas tus enseñanzas y por todos tus comentarios para mejorar este trabajo de tesis.*

*Al CONACYT, por la beca otorgada para realizar los estudios de Maestría en Ingeniería Ambiental, culminados con esta Tesis.*

---

---

---

---

## DEDICATORIAS

*A mis padres, Felipe Vargas y Estela Espinoza, por todo su amor y apoyo*

*A mis Hijos Dania y Tomy por estar conmigo en los momentos más difíciles los amoooooo*

*A mis hermanos Felipe, Estela, Nayeli, gracias por estar conmigo, son mi motor a seguir adelante los quieroooo*

*A mi esposo David por todo su apoyo en este nuevo reto en mi vida, sabes que eres el amor de mi vida.*

---

---

---

## RESUMEN

Las peroxidasas han surgido como una clase importante de enzimas que se pueden utilizar para la eficiente degradación de contaminantes orgánicos. En este trabajo se utilizaron dos métodos enzimáticos para el tratamiento del colorante azul directo 2. Se evaluó la capacidad catalítica de dos enzimas peroxidasas: la primera, obtenida de un residuo industrial de soya y la segunda proveniente del fruto del chayote. El objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad de decoloración de dichas peroxidasas sobre el colorante azul directo 2 preparado en una solución artificialmente contaminada. Se evaluaron varios parámetros operacionales que afectan a la degradación enzimática tales como concentración inicial del colorante, dosis de peróxido de hidrógeno, tiempo de contacto, pH de la solución y cantidad de enzima peroxidasa. En las pruebas realizadas la concentración del colorante azul directo 2 fue de 10, 20, 30, 40, 50, y 60 mg L<sup>-1</sup>. La estrategia de dosificación de la enzima fue una única adición al inicio del tratamiento. Finalmente se debe mencionar, que mediante el uso de técnicas quimiométricas como el diseño de experimentos fue posible encontrar las condiciones óptimas de tratamiento para las dos enzimas seleccionadas.

La metodología para la obtención del extracto parcialmente purificado del residuo industrial de soya se optimizó logrando encontrar actividades enzimáticas entre 20 y 30 U/L, los resultados del diseño experimental mostraron solo un factor significativo: el pH; sin embargo en las gráficas de respuesta se muestra que si existe una relación entre la dosis de peroxidasa y dosis de peróxido de hidrógeno, logrando un porcentaje máximo de decoloración del 73% de acuerdo con los siguientes factores experimentales: dosis de enzima 1000μL, dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 2000μL, pH 3.5, temperatura de 25 °C y tiempo de contacto de 2 h.

Para la enzima del fruto del chayote se logró una actividad enzimática de 30 a 40 U/L, los resultados del diseño mostraron dos efectos significativos: el pH y el tiempo de contacto. En las gráficas de respuesta se logró un porcentaje máximo de decoloración del 97%, con los siguientes factores experimentales: dosis de enzima 2000μL, dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1000 μL, pH 3.5, temperatura de 50 °C y tiempo de contacto 6 h. La toxicidad del efluente fue evaluada mediante la bacteria *Vibrio fischeri*. Se obtuvo un aumento en los resultados de toxicidad en las dos fuentes de peroxidasa debido a la formación de aminas aromáticas más tóxicas que el colorante inicial. En este trabajo se demostró que resulta factible la degradación del colorante azul directo 2 mediante tratamientos enzimáticos, por lo que la peroxidasa del residuo industrial de soya y del fruto del chayote pueden ser utilizadas en los pasos iniciales del tratamiento de efluentes para la decoloración, seguido por un tratamiento convencional para obtener además de la decoloración la eliminación de las sustancias tóxicas que se obtienen.

**Palabras clave:** colorante azo, degradación, enzima, peroxidasa.

---

**ABSTRACT**

Peroxidases have emerged as an important class of enzymes that can be used for the efficient degradation of organic contaminants. In this study, two enzymatic methods for the direct treatment of direct blue 2 dye were used. The catalytic ability of two peroxidases, one obtained from an industrial waste soybean and the other from the “chayote” was evaluated. The objective of this work was to evaluate the ability of peroxidases to decolorize the direct blue 2 dye prepared in an artificially contaminated solution. Several operational parameters that affect the enzymatic degradation, such as initial concentration of the dye, hydrogen peroxide dose, contact time, pH of solution and amount of peroxidase enzyme were evaluated. In the tests the concentration of the dye used were 10, 20, 30, 40, 50, and 60 mg L<sup>-1</sup>. The strategy of the enzyme dosage was a unique addition at the beginning of the treatment.

Finally it should be mentioned that by using chemometric techniques such as design of experiments, it was possible to select the best treatment for both peroxidase enzymes.

The methodology to obtain the industrial residue, partially purified was optimized to obtain enzymatic activities between 20 and 30 U/L, the results of the experimental design exhibited only a significant factor pH, however the response graphs shown that there is a relationship between the dose of peroxidase and the dose of hydrogen peroxide, achieving a maximum decoloration of 73%, according to the following experimental factors: enzyme dosage 1000µL, 2000µL peroxide dosage, pH 3.5, a temperature of 25 °C and a contact time of 2 h.

For the chayote enzyme an enzymatic activity of 30 to 40 U/L was achieved. Results of the experimental design showed two significant effects: pH and contact time. In the response graphs a maximum discoloration of 97% was achieved, with the following experimental factors: enzyme dosage 2000µL, 1000 uL dose of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 3.5, a temperature of 50 °C and a contact time of 6 h. Effluent toxicity was evaluated by *Vibrio fischeri*. An increase in toxicity results were obtained due to the formation of a more toxic product than the initial dye: aromatic amines.

This study demonstrated that it is feasible to degrade the direct blue 2 dye by enzymatic treatments, so the peroxidase industrial waste soy bean and the chayote fruit can be used as an initial steps or pretreatment for the treatment of highly coloured effluents to achieve a color reduction, followed by a conventional treatment for obtaining fading plus the elimination of toxic substances obtained.

**Key words:** azo dye degradation enzyme, peroxidase

---

<i>RESUMEN</i> .....	<i>i</i>
<i>ABSTRACT</i> .....	<i>ii</i>
<i>ÍNDICE DE TABLAS</i> .....	<i>vi</i>
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i> .....	<i>vii</i>
<i>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</i> .....	<i>xii</i>
<i>UNIDADES Y SÍMBOLOS</i> .....	<i>xii</i>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Objetivo general</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3 Alcances y limitaciones</b> .....	<b>3</b>
<b>1.4 Justificación</b> .....	<b>4</b>
<b>2 ANTECEDENTES</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1 Colorantes azo</b> .....	<b>5</b>
2.1.1 Clasificación según la estructura química.....	7
2.1.2 Clasificación según el modo de aplicación .....	7
2.1.3 Impacto ambiental de los colorantes.....	9
2.1.4 Efectos tóxicos .....	11
2.1.5 Normatividad relativa .....	11
<b>2.2 Enzimas</b> .....	<b>12</b>
2.2.1 Clasificación de las enzimas .....	12
2.2.2 Peroxidasas.....	13
2.2.3 Fuentes de obtención de las peroxidasas .....	15
2.2.4 Descripción de la soya .....	16
2.2.5 Descripción del chayote.....	16
2.2.6 Actividad enzimática peroxidasa.....	17
2.2.7 Importancia de las peroxidasas vegetales .....	17
<b>2.3 Métodos de tratamiento para efluentes textiles</b> .....	<b>18</b>
2.3.1 Métodos químicos.....	18
2.3.2 Métodos físicos.....	22
2.3.3 Métodos biológicos.....	24



<b>3</b>	<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Planteamiento metodológico</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2</b>	<b>Pruebas preliminares del colorante azul directo 2</b> .....	<b>29</b>
3.2.1	Caracterización fisicoquímica del colorante azul directo 2 .....	29
3.2.2	Curvas de calibración del colorante azul directo 2.....	31
3.2.3	Factores de operación para el tratamiento del colorante azul directo 2.....	32
3.2.4	Cálculo para el porcentaje de decoloración (D%) .....	32
<b>3.3</b>	<b>Obtención de un concentrado de peroxidasas de chayote (<i>Sechium edule</i> (Jacq.)( Sw.)</b> .....	<b>33</b>
3.3.1	Obtención del zumo de chayote .....	33
3.3.2	Diálisis del zumo del chayote.....	33
3.3.3	Obtención de un concentrado de peroxidasas de chayote ( <i>Sechium edule</i> (Jacq. Sw.).	33
<b>3.4</b>	<b>Obtención de un concentrado de peroxidasas del residuo industrial de soya.</b>	<b>34</b>
3.4.1	Obtención de un extracto acuoso del residuo industrial de soya.....	34
3.4.2	Diálisis del extracto acuoso del residuo industrial de soya.....	34
3.4.3	Obtención de un concentrado de peroxidasas del residuo industrial de soya ..	34
<b>3.5</b>	<b>Determinación de la actividad enzimática</b> .....	<b>35</b>
<b>3.6</b>	<b>Diseño de experimentos</b> .....	<b>36</b>
<b>3.7</b>	<b>Pruebas de toxicidad Microtox®</b> .....	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Obtención de las enzimas peroxidasas de las fuentes a estudiar</b> .....	<b>38</b>
4.1.1	Obtención de un concentrado de peroxidasas de chayote ( <i>Sechium edule</i> (Jacq. Sw.).	38
4.1.2	Obtención del zumo de chayote .....	38
4.1.3	Diálisis del zumo del chayote.....	39
4.1.4	Obtención de un concentrado de peroxidasas del chayote.....	39
<b>4.2</b>	<b>Obtención de un concentrado del residuo industrial de soya</b> .....	<b>40</b>
4.2.1	Descripción del residuo industrial de soya .....	40
4.2.2	Obtención del extracto enzimático del residuo industrial de soya .....	41
4.2.3	Diálisis del zumo del residuo industrial de soya .....	41
4.2.4	Obtención de un concentrado de peroxidasas del residuo industrial de soya ..	41
4.2.5	Actividades enzimáticas para las dos peroxidasas .....	43

---

<b>4.3</b>	<b>Resultados del diseño estadístico.....</b>	<b>44</b>
4.3.1	Diseño experimental para la decoloración del colorante azul directo 2 con tratamiento enzimático. ....	44
4.3.2	Diagrama de Pareto estandarizado para las dos fuentes de peroxidasa. ....	50
4.3.3	Optimización del tiempo de reacción .....	51
4.3.4	Optimización de pH y temperatura óptima .....	53
4.3.5	Concentración óptima de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	55
4.3.6	Concentración óptima de colorante .....	56
4.3.7	Optimización del proceso de decoloración .....	58
4.3.8	Pruebas de toxicidad para las dos fuentes de peroxidasa.....	59
4.3.9	Caracterización mediante espectroscopía UV-vis y seguimiento visual para las dos fuentes de peroxidasa .....	61
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>PRODUCTOS GENERADOS EN ESTA INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>80</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>92</b>
	<b>ANEXO 1 MODELO ESTADÍSTICO QUE SE UTILIZÓ PARA LAS DOS FUENTES DE PEROXIDASA.....</b>	<b>92</b>

---

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 2.1. Clasificación de los colorantes de acuerdo a sus grupos cromóforos (EPA, 1996; O'Neil <i>et al.</i> , 1999; Robinson <i>et al.</i> , 2001; Hunger, 2003; Husain 2006; Gupta y Suhas, 2009). .....	8
Tabla 2.2. Clasificación de colorantes de acuerdo a su forma de aplicación (Li <i>et al.</i> , 2010; Pricelius <i>et al.</i> , 2007; Zaharia y Seteu, 2012).....	9
Tabla 2.3. Diferentes clases de enzimas y su aplicación en sustancias orgánicas.....	27
Tabla 3.1. Propiedades químicas del colorante azul directo 2 .....	29
Tabla 3.2. Características de una solución de colorante azul directo 2 a 100 mg/L.....	30
Tabla 3.3. Valores de las concentraciones y sus absorbancias para obtener la curva de calibración del colorante azul directo 2 en el intervalo de concentraciones de 10 a 100 mg/L. ....	32
Tabla 3.4. Cantidades de los reactivos utilizados para la determinación de la actividad peroxidasa mediante el método de 4-aminoantipirina a una $\lambda$ de 510 nm.....	36
Tabla 3.5. Factores de operación para el tratamiento del colorante azul directo 2 para las dos fuentes de peroxidasa.....	37
Tabla 4.1. Primera posible solución de tratamiento a 25°C con 6 h de tiempo de contacto enzima- peróxido .....	45
Tabla 4.2. Segunda posible solución de tratamiento a 25°C con 2 h de tiempo de contacto enzima- peróxido .....	46
Tabla 4.3. Tercera posible solución de tratamiento a 50°C con 2 h de tiempo de contacto enzima- peróxido .....	47
Tabla 4.4. Cuarta posible solución de tratamiento a 50°C con 6 h de tiempo de contacto enzima- peróxido .....	48
Tabla 4.5. Quinta posible solución de tratamiento a 37.5°C con 4 h de tiempo de contacto enzima- peróxido .....	49
Tabla 4.6. Diseño óptimo del proceso de decoloración del azul directo 2 para la enzima del residuo industrial de soya. ....	58
Tabla 4.7. Diseño óptimo del proceso de decoloración del azul directo 2 mediante la enzima del chayote.....	59
Tabla 4.8. Resultados de toxicidad utilizando ( <i>Vibrio fischeri</i> ).....	59

---



---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 2.1. Estructura de un colorante monoazo y sus auxocromos (Dos Santos <i>et al.</i> , 2007). .....	7
Figura 2.2. Efectos ecológicos a cuerpos receptores (Chung <i>et al.</i> , 1992) .....	10
Figura 2.3. Estructura en la cual se observa la reacción entre 4 moléculas de guayacol y 4 moléculas de peróxido de hidrógeno, gracias a la catálisis de la peroxidasa se obtiene un producto de tetraguayacol y 8 moles de agua. (Fernández <i>et al.</i> , 2003; Araujo <i>et al.</i> , 2006). .....	17
Figura 2.4. Tecnologías para el tratamiento de colorantes azo modificado (Vandevivere <i>et al.</i> , 1998; Robinson <i>et al.</i> , 2001; Forgacs <i>et al.</i> , 2004). .....	18
Figura 2.5. Colorante amarillo 3 (Fragoso, 2009). .....	20
Figura 2.6. Estructuras del colorante rojo ácido 1 (RA1) (Hassan <i>et al.</i> , 2011). .....	20
Figura 2.7. Estructuras del colorante rojo ácido 14 (Idel-Aouad <i>et al.</i> , 2011).....	21
Figura 2.8. Estructuras del colorante azul reactivo 4 (Zhou <i>et al.</i> , 2009). .....	21
Figura 2.9. Estructuras del colorante anaranjado de metilo (Haji <i>et al.</i> , 2011). .....	22
Figura 3.1. Planteamiento metodológico para la decoloración del colorante azul directo	228
Figura 3.2. Estructura química del colorante azul directo 2.....	29
Figura 3.3. Espectro de absorción ultravioleta visible del colorante azul directo 2, en el intervalo de longitudes de onda de 200 a 800 nm. ....	30
Figura 3.4. Colorante azul directo 2 en forma comercial y .....	31
Figura 3.5. Curva de calibración del colorante azul directo 2.....	31
Figura 4.1. Fruto de chayote ( <i>Sechium edule</i> (Jacq.) Sw.) variedad no espinosa.....	38
Figura 4.2. Cortes del fruto del chayote para la remoción de la semilla para la obtención del zumo.....	38
Figura 4.3. Cromatografía de intercambio catiónico en CM-52 del zumo de chayote dializado y centrifugado durante el proceso de elución con el amortiguador AcNa/HAc 1M, pH 5.0.....	39
Figura 4.4. Concentrado de peroxidasa de chayote obtenido de la cromatografía de intercambio catiónico en CM-52, eluída con el amortiguador 1M de AcNa/HAc pH 5.0 y con una actividad entre 20 y 30 U/L.....	40
Figura 4.5. Residuo industrial de soya .....	40
Figura 4.6. Extracto acuoso del residuo de soya industrial dializado en .....	41
Figura 4.7. Bandas cromatográficas obtenidas del extracto acuoso del residuo de soya industrial dializado y centrifugado: (a) café intenso (b) rosa claro (c) salmón rojiza (d) amarillo muy tenue .....	42
Figura 4.8. Actividad enzimática para las dos fuentes de peroxidasa .....	43
Figura 4.9. Actividad enzimática entre 8 a 12 U/L para la peroxidasa de soya .....	43
Figura 4.10. Actividad enzimática de 20 a 30 U/L para la peroxidasa del chayote .....	43
Figura 4.11. Colorante azul directo 2 antes del tratamiento enzimático.....	44

---

Figura 4.12. Colorante azul directo 2 después del tratamiento enzimático.....	44
Figura 4.13. Diagrama de Pareto estandarizado para la decoloración del azul directo 2 con la enzima del residuo industrial de soya. ....	50
Figura 4.14. Diagrama de Pareto estandarizado para la decoloración del azul directo 2 mediante la enzima del chayote.....	51
Figura 4.15. Optimización del tiempo de reacción para la decoloración del azul directo 2 con la enzima del residuo industrial de soya. ....	52
Figura 4.16. Optimización del tiempo de reacción para la decoloración del azul directo 2 con la enzima del chayote. ....	52
Figura 4.17. Optimización de temperatura y pH para la decoloración del colorante azul directo 2 con la enzima del residuo industrial de soya. ....	54
Figura 4.18. Optimización de temperatura y pH para la decoloración del colorante azul directo 2 con la enzima del chayote.....	54
Figura 4.19. Optimización de la dosis de enzima y peróxido para la decoloración del azul directo 2 para la enzima del residuo industrial de soya. ....	56
Figura 4.20. Optimización de la dosis de enzima y peróxido para la decoloración del azul directo 2 mediante la enzima del chayote. ....	56
Figura 4.21. Optimización dosis de enzima y peróxido para la decoloración del azul directo 2 mediante el residuo industrial de soya. ....	57
Figura 4.22. Optimización dosis de enzima y peróxido para la decoloración del azul directo 2 mediante la enzima del chayote.....	58
Figura 4.23. Toxicidad efluente del las muestras después del tratamiento enzimático con la enzima peroxidasa del chayote.....	60
Figura 4.24. Toxicidad efluente del las muestras después del tratamiento enzimático con el residuo industrial de soya. ....	60
Figura 4.25. Espectros de absorción UV-vis del tratamiento del colorante azul directo 2, al minuto 0 y al final del tratamiento enzimático de 360 min. ....	61
Figura 4.26. Seguimiento visual tomadas a diferentes intervalos de tiempos durante 360 min, (Bloque 43) para la decoloración del colorante azul directo 2 con la enzima peroxidasa del residuo industrial de soya en donde se obtuvo un 56.2% de decoloración en 6 h, con 25 °C, con una concentración de enzima y de peróxido de 2000 µL, a pH de 3.5 con una concentración inicial de 10 mg/L de colorante.....	62
Figura 4.27. Seguimiento visual tomadas a diferentes intervalos de tiempos durante 360 min (Bloque 43) para la decoloración del colorante azul directo 2 con la enzima peroxidasa del chayote en donde se obtuvo un 85.4% de decoloración en 6 h, con 25 °C, con una concentración de enzima y de peróxido de 2000 µL, a pH de 3.5 con una concentración inicial de 10 mg/L de colorante. ....	62
Figura 4.28. Colorante azul directo 2: a) sin tratamiento enzimático, y b) al término del tratamiento con un 78.8% de remoción, con la enzima de soya.....	63

---

Figura 4.29. Colorante azul directo 2: a) sin tratamiento enzimático, y b) al término del tratamiento con un 81.5% de remoción, con la enzima del chayote.....	63
Figura 4.30. Colorante azul directo 2: a) sin tratamiento enzimático, y b) al término del tratamiento con un 46.0% de remoción, con la enzima de soya.....	64
Figura 4.31. Colorante azul directo 2: a) sin tratamiento enzimático, y b) al término del tratamiento con un 81.8% de remoción, con la enzima del chayote.....	64
Figura 4.32. Espectros de absorción UV-vis del tratamiento del colorante azul directo 2, al min 0 y al final del tratamiento enzimático de 120 min.....	65
Figura 4.33. Seguimiento visual tomadas a diferentes intervalos de tiempos durante 120 min (Bloque 47) para la decoloración del colorante azul directo 2 con la enzima peroxidasa del residuo industrial de soya en donde se obtuvo un 51.4% de decoloración en 2 h, con 50°C, con una concentración de enzima de 1000 $\mu$ L y de peróxido de 2000 $\mu$ L, a pH de 7.5 con una concentración inicial de 10 mg/L de colorante.....	65
Figura 4.34. Seguimiento visual tomadas a diferentes intervalos de tiempos durante 120 min (Bloque 47) para la decoloración del colorante azul directo 2 con la enzima peroxidasa del chayote en donde se obtuvo un 64.8% de decoloración en 2 h, con 50°C, con una concentración de enzima de 1000 $\mu$ L y de peróxido de 2000 $\mu$ L, a pH de 7.5 con una concentración inicial de 10 mg/L de colorante.....	66
Figura 4.35. Colorante azul directo 2: a) sin tratamiento enzimático, y b) al término del tratamiento con un 38.5% de remoción, con la enzima del residuo industrial de soya para el bloque 6.....	66
Figura 4.36. Colorante azul directo 2: a) sin tratamiento enzimático, y b) al término del tratamiento con un 81.5% de remoción, con la enzima del chayote bloque 14. ....	67
Figura 4.37. Colorante azul directo 2 solo con la adición del peróxido de hidrógeno sin la enzima del residuo industrial de soya sin peróxido de hidrógeno para el bloque 15. ....	67
Figura 4.38. Colorante azul directo 2 solo con la adición de la enzima del residuo industrial de soya sin peróxido de hidrógeno para el bloque 23.....	68
Figura 4.39. Espectros de absorción UV-vis del tratamiento del colorante azul directo 2, al min 0 y al final del tratamiento enzimático de 120 min.....	68
Figura 4.40. Seguimiento visual tomadas a diferentes intervalos de tiempos durante 120 min (Bloque 30) para la decoloración del colorante azul directo 2 con la enzima peroxidasa del residuo industrial de soya en donde se obtuvo un 51.7% de decoloración en 2 h, con 50°C, con una concentración de enzima de 1000 $\mu$ L y de peróxido de 2000 $\mu$ L, a pH de 3.5 con una concentración inicial de 60 mg/L de colorante.....	69
Figura 4.41. Seguimiento visual tomadas a diferentes intervalos de tiempos durante 120 min (Bloque 30) para la decoloración del colorante azul directo 2 con la enzima peroxidasa del chayote en donde se obtuvo un 59% de decoloración en 2 h, con 50°C, con una concentración de enzima de 1000 $\mu$ L y de peróxido de 2000 $\mu$ L, a pH de 3.5 con una concentración inicial de 60 mg/L de colorante.....	69

---

Figura 4.42. Colorante azul directo 2: a) sin tratamiento enzimático, y b) al término del tratamiento con un 55% de remoción, con la enzima del residuo industrial de soya bloque 20.....	70
Figura 4.43. Colorante azul directo 2: a) sin tratamiento enzimático, y b) al término del tratamiento con un 85.9 % de remoción, con la enzima del chayote bloque 20. ....	70
Figura 4.44. Espectros de absorción UV-vis del colorante azul directo 2, al minuto 0 y al final del tratamiento enzimático de 240 min. ....	71
Figura 4.45. Seguimiento visual tomadas a diferentes intervalos de tiempos durante 240 min (Bloque 12) para la decoloración del colorante azul directo 2 con la enzima peroxidasa del residuo industrial de soya se obtuvo un 38.9% de decoloración en 4 h, con 37.5°C, con una concentración de enzima de 1500 $\mu$ L y de peróxido de 1500 $\mu$ L, a pH de 5.5 con una concentración inicial de 35 mg/L de colorante.....	71
Figura 4.46. Seguimiento visual tomadas a diferentes intervalos de tiempos durante 240 min (Bloque 37) para la decoloración del colorante azul directo 2 con la enzima peroxidasa del residuo industrial de soya se obtuvo un 70.5% de decoloración en 4 h, con 37.5°C, con una concentración de enzima de 1500 $\mu$ L y de peróxido de 1500 $\mu$ L, a pH de 5.5 con una concentración inicial de 35 mg/L de colorante.....	72
Figura 4.47. Colorante azul directo 2: a) sin tratamiento enzimático, y b) al término del tratamiento con un 38.9 % de remoción, con la enzima del residuo industrial de soya bloque 12.....	72
Figura 4.48. Colorante azul directo 2: a) sin tratamiento enzimático, y b) al término del tratamiento con un 87.4% de remoción, con la enzima del chayote bloque 37. ....	73
Figura 4.49. Espectros de absorción UV-vis del tratamiento del colorante azul directo 2, al min 0 y al final del tratamiento enzimático de 360 min.....	73
Figura 4.50. Seguimiento visual tomadas a diferentes intervalos de tiempos durante 360 min (Bloque 2) para la decoloración del colorante azul directo 2 con la enzima peroxidasa del residuo industrial de soya se obtuvo un 51.1% de decoloración en 6 h, con 50°C, con una concentración de enzima de 2000 $\mu$ L y de peróxido de 1000 $\mu$ L, a pH de 7.5 con una concentración inicial de 60 mg/L del colorante.....	74
Figura 4.51. Seguimiento visual tomadas a diferentes intervalos de tiempos durante 360 min (Bloque 33) para la decoloración del colorante azul directo 2 con la enzima peroxidasa del residuo industrial del chayote se obtuvo un 89.6% de decoloración en 6 h, con 50°C, con una concentración de enzima de 2000 $\mu$ L y de peróxido de 2000 $\mu$ L, a pH de 3.5 con una concentración inicial de 10 mg/L del colorante. ....	74
Figura 4.52. Colorante (AD2) a) sin tratamiento enzimático b) al término del tratamiento con un 48.1% de remoción, con la enzima de la soya (Bloque 2).....	75
Figura 4.53. Colorante (AD2) a) sin tratamiento enzimático b) al término del tratamiento con un 89.6% de remoción, con la enzima del chayote (Bloque 33).....	75
Figura 4.54. Espectros de absorción UV-vis del tratamiento del (AD2), al min 0 y al final del tratamiento enzimático 48 horas de reposo. ....	76

Figura 4.55. Seguimiento visual (Bloque 2) para la decoloración (AD2) para el residuo industrial de soya, con una concentración inicial de 10 mg/L. .... 76

Figura 4.56. Seguimiento visual (Bloque 33) para la decoloración (AD2) para el chayote, con una concentración inicial de 60 mg/L. .... 76



---



---

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>DBO<sub>5</sub></b>	Demanda bioquímica de oxígeno
<b>UT</b>	Unidades de toxicidad
<b>DQO</b>	Demanda química de oxígeno
<b>D</b>	Distancia que atraviesa el haz de luz por la celda
<b>D%</b>	Porcentaje de decoloración
<b>AD2</b>	Azul directo 2
<b>CI</b>	Color index
<b>CONAGUA</b>	Comisión Nacional del Agua
<b>USEPA</b>	Agencia de protección ambiental de Estados Unidos de América
<b>UV/vis</b>	Ultra violeta- visible
<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>AE</b>	Actividad enzimática
<b>HRP</b>	Raíz de rábano picante
<b>Ve</b>	Volumen de ensayo
<b>ADMI</b>	Instituto Americano de Fabricantes de Colorantes
<b>EEA</b>	European Environmental Agency
<b>UNEP</b>	United Nations Environment Programme
<b>SEMARNAT</b>	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
<b>MAK</b>	Aminas aromáticas tóxicas
<b>SAGARPA</b>	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación.
<b>LD</b>	Dosis letal

## UNIDADES Y SÍMBOLOS

<b>C</b>	Concentración, mg/L <sup>-1</sup>
<b>g</b>	gramo
<b>h</b>	hora
<b>kg</b>	kilogramo
<b>L</b>	litro
<b>mg</b>	miligramo
<b>nm</b>	nanómetro
<b>s</b>	segundo
<b>t</b>	tiempo
<b>T</b>	temperatura
<b>μ</b>	microlitro
<b>mL</b>	mililitro
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>M</b>	Molar
<b>ε</b>	Constante de extinción molar de desaparición de la 4 aminoantipirina
<b>U/L</b>	Unidad de actividad enzimática

# 1 INTRODUCCIÓN

Los colorantes y pigmentos son sustancias orgánicas que se utilizan en pequeñas proporciones para impartir color a diferentes materiales con propósitos funcionales o estéticos. Los colorantes son sustancias orgánicas que exhiben color debido a su capacidad para absorber luz de la región visible del espectro desde longitudes de onda de 4000 a 8000 Å (Garzón-Zúñiga *et al.*, 2011).

Los colorantes azo, representan el 70% de la totalidad de colorantes utilizados en el mundo (Tantak y Chaudhari, 2006), son compuestos químicos xenobióticos que se caracterizan por la presencia en su estructura molecular del grupo cromóforo azo, constituido por dos átomos de nitrógeno unidos mediante un doble enlace (-N=N-) (Muruganandham y Swaminathan, 2004).

En la industria textil se consumen dos tercios de la producción de colorantes azo, la cual fue estimada en 1,400,000 toneladas en el año 2006 (Mahmoodi y Arami, 2006), materia prima que es utilizada para el proceso de teñido. Se estima que el 15% de la producción mundial total de colorantes se pierde durante el proceso de teñido, el cual se desecha en los efluentes (Maljaei *et al.*, 2009).

Por lo tanto, una de las características de las aguas residuales textiles es su alto contenido de colorantes. Algunos efectos negativos observados por los vertimientos de aguas residuales con alto contenido de estas sustancias son: 1) inhibición de la fotosíntesis de plantas presentes en los cuerpos de agua receptores: 2) acumulación del colorante en el ambiente, lo cual representa un serio problema de salud debido a que muchos de ellos generan subproductos que pueden ser carcinogénicos, mutagénicos o bien pueden ocasionar reacciones alérgicas (Chung y Cerniglia, 1992; Chung y Stevens, 1993).

La toxicidad de los colorantes es una propiedad de gran importancia debido a que aproximadamente 130 de 3,200 colorantes azo pueden producir aminas aromáticas carcinogénicas (Sponza y Isik, 2005a). Éstas han sido incluidas en el listado alemán que reporta las concentraciones máximas permisibles en el lugar de trabajo de compuestos tóxicos (MAK por sus siglas en alemán), dentro de los grupos más tóxicos: por ejemplo la bencidina está dentro del grupo MAK III aminas A1, considerado tóxico para los humanos; y la o-toluidina se clasifica dentro del grupo MAK III aminas A2. Por lo cual varios países de la comunidad europea incluido Alemania han prohibido el uso de aminas MAK en productos textiles (Sponza y Isik, 2005b).

En la actualidad uno de los principales problemas a enfrentar en el mundo es el abastecimiento de agua, a pesar de que el 70% de la superficie del planeta es agua y tan solo el 30% es tierra firme. Sin embargo, del agua disponible, el 97.5% es agua salada

proveniente de mares y océanos, el restante 2.5% es agua dulce. Del agua dulce el 69.7% es agua congelada, 30% es subterránea y en los ríos y lagos hay sólo 0.3% (Mercano, 2012). El uso principal de los colorantes es el teñido de textiles, aunque se consumen cantidades sustanciales para colorear materiales tales como cuero, papel, plásticos, productos del petróleo y alimentos.

En los países en vías de desarrollo, el 70% de los desechos generados por el sector industrial son vertidos sin tratamiento, a cuerpos receptores, los cuales se ven afectados, debido a los altos niveles de toxicidad y a la falta de oxígeno, dañando o destruyendo por completo los ecosistemas acuático (Mercano, 2012). En México, las industrias del país utilizan del orden de 6 km<sup>3</sup>/año de agua para sus diferentes actividades productivas y descargan aproximadamente 5.36 km<sup>3</sup>/año como aguas residuales (CONAGUA, 2010).

El término “colorante” engloba tanto a tintes como a pigmentos ambos se diferencian por sus características de solubilidad: los colorantes son compuestos solubles, que se aplican principalmente a materiales textiles en disolución acuosa; los pigmentos son compuestos insolubles, que se incorporan a productos tales como pinturas, tintas de imprenta o plásticos (Christie, 2003).

Existen varios procesos para el tratamiento de aguas residuales procedentes de la industria textil, tales como: físicos, químicos y biológicos cada uno de ellos presenta limitaciones técnicas y económicas. Los procesos biológicos anaerobio o aerobio no son efectivos para la degradación o remoción del colorante pero debido a la alta toxicidad que estos tratamientos presentan y a las posibles inhibiciones que puedan causar, aunado a esto los largos periodos de aclimatación y tiempos de residencia hidráulica son una gran limitante debido a la complejidad de sus estructuras (Supaka *et al.*, 2004; Buitrón, 2003).

Los procesos, tales como oxidación química, ósmosis inversa y adsorción, son altamente eficientes, pero los limitan algunas desventajas como elevado costo, aplicabilidad limitada, alto consumo de energía, producción de lodos y generación de subproductos tóxicos (An *et al.*, 2002; Vasantha *et al.*, 2006; De Souza *et al.*, 2007). Debido a la complejidad que presentan estos efluentes para su tratamiento y a las limitaciones existentes en los procesos, se están desarrollando métodos enzimáticos muy prometedores para el tratamiento de contaminantes, esto mediante el uso de enzimas específicas como las peroxidasas, cuando no pueden ser tratados por procesos convencionales (Klibanov *et al.*, 1983; al-Kassim *et al.*, 1994; Bodzek *et al.*, 1994; Wada *et al.*, 1995; Kinsley y Nicell 2000; Masuda *et al.*, 2001; Singh y Singh 2002; Villalobos y Buchanan 2002; Villegas-Rosas *et al.*, 2002).

Para contribuir con los estudios de degradación de los colorantes este trabajo tiene como objetivo principal la decoloración del azul directo 2, mediante 2 tipos de enzimas peroxidasas.

### ***1.1 Objetivo general***

Evaluar la decoloración del colorante azul directo 2 mediante peroxidasas

### ***1.2 Objetivos específicos***

- ✚ Obtener la enzima peroxidasa a partir de dos fuentes: el residuo industrial de soya y del fruto del chayote utilizando dos medios de soportes, aniónico y catiónico
- ✚ Determinar la actividad catalítica de la enzima peroxidasa utilizando la técnica de la 4-aminoantipirina
- ✚ Determinar las pruebas enzimáticas a escala laboratorio, evaluando el efecto de: pH, tiempo de reacción, concentración de peróxido de hidrógeno, concentración de enzima, sobre el colorante azul directo 2
- ✚ Evaluar la toxicidad antes y después del tratamiento enzimático empleando *Vibrio fisheri*

### ***1.3 Alcances y limitaciones***

- ✚ El trabajo experimental se llevó a cabo en reactores a escala laboratorio
- ✚ Se utilizó agua artificialmente contaminada adicionando diferentes concentraciones del colorante azul directo 2 como sustrato.

#### **1.4 Justificación**

La actividad industrial desarrollada por el hombre ha provocado que se desechen grandes cantidades de compuestos tóxicos y residuos, afectando negativamente el medio ambiente. El sector textil es uno de los principales generadores contaminantes del agua y desechos peligrosos, más de 2000 tipos de colorantes azo son utilizados actualmente para teñir materiales textiles, de piel, cosméticos y alimentos. Este tipo de colorantes son compuestos químicos xenobióticos que se liberan al medio ambiente por medio de dispersiones o soluciones coloreadas en los efluentes industriales. Se estima que la cantidad de colorante que no se fija a las fibras puede variar entre el 2 y 50%, dependiendo del tipo de colorante que se use, los cuales son descargados en las aguas residuales de las plantas de tratamiento o directamente al ambiente (Moeller y Garzón, 2003). Los requerimientos normativos, la inocuidad de los efluentes, así como la necesidad de ahorrar y/o reutilizar agua en la industria, hace necesario que se investiguen nuevos procesos que permitan mejorar la remoción de componentes difícilmente biodegradables, partículas coloidales y microorganismos patógenos que permitan incorporar el efluente en el proceso productivo (Prazeres *et al.*, 2001). Por otra parte, el crecimiento de la industria textil ha experimentado un aumento proporcional en el uso de colorantes sintéticos, y esto ha sido acompañado por un aumento proporcional en la generación de las aguas residuales contaminadas con colorantes (Pandey y Singh, 2007). Por toda esta problemática se demanda buscar nuevos sistemas de tratamiento y/o soluciones tecnológicas diferentes como son el uso de enzimas peroxidasas. La soya se utiliza como alimento para el ganado y en la actualidad para el consumo humano, en diferentes presentaciones. La industrialización de la soya se ha dividido en dos sectores: 1) procesamiento de semilla o grano completo y 2) procesamiento del grano de donde se obtiene aceite y harina. De este último se genera un desecho industrial, el cual puede ser de gran interés para utilizarlo como una fuente de enzimas peroxidasas las cuales pueden aplicarse en el tratamiento de aguas residuales de efluentes textiles, asimismo utilizar la peroxidasa del chayote que se ha demostrado elimina algunos colorantes textiles y fenoles en al menos un 95% (Villegas-Rosas, 2003).

## 2 ANTECEDENTES

El color destaca su presencia cotidiana en todo lo que rodea al hombre. Se prodiga tanto en los objetos de creación humana como en la naturaleza. Desde las etapas más tempranas de la cultura humana el hombre hizo uso consciente y variado del color, lo aplicó sobre las superficies rocosas de las cavernas e incluso, sobre su propia piel. Los servicios que el color ha brindado recorren una amplia gama de funciones, desde cubrir la superficie de un objeto, hasta representar simbólicamente una idea o un concepto. Muchos de estos secretos de la antigüedad se han perdido, y hoy día no se saben preparar muchos de los tintes que fueron usados para decorar piedras, mosaicos y tejidos. El primer colorante sintético que se preparó fue la Mauvine por Willian Henry Perkin en Inglaterra en 1856. El científico que trabajaba en su laboratorio estudió la oxidación de fenilamina, también conocida como anilina con dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ).

Cuando estos compuestos reaccionaron se obtuvo un resultado sorprendente después de tirar el precipitado resultante de la reacción, y lavar el residuo de la botella con alcohol, Perkin se maravilló con la aparición de un colorante rojizo. Repitió la reacción en las mismas condiciones, y volvió a obtener el colorante, el cual lo llamó púrpura de tiro y que posteriormente llegó a ser conocido por el Mauve Francés. Después de este descubrimiento, se produjo una avalancha de productos químicos para lograr sintetizar otros colorantes.

A finales del siglo XIX, los fabricantes de los colorantes sintéticos se establecieron en Alemania, Inglaterra, Francia y Suiza para satisfacer las necesidades de las industrias de esa época como fueron las fábricas de tela, cuero y papel. En los años de 1994 y 1995, las grandes empresas pusieron en marcha sus propias plantas en asociación con los fabricantes locales en varios países asiáticos, como China, India e Indonesia (Abiquim, 2011).

### 2.1 Colorantes azo

De la gran gama de colorantes azo, se distinguen cuatro familias: los mono-azoicos, con un grupo azo; los di-azoicos, con dos grupos azo; los tri-azoicos, con tres grupos azo y los poli-azoicos, con cuatro o más grupos azo (Maljaei *et al.*, 2009). Así mismo, pueden clasificarse como colorantes azo aniónicos y catiónicos (ácidos y básicos), dispersos, directos, reactivos y con complejos metálicos según su estructura molecular, propiedades específicas y aplicaciones.

Los colorantes azo son combinaciones moleculares aromáticas que contienen el grupo cromóforo azoico en combinación con uno o dos radicales libres. Además tienen grupos auxocromos que forman sales, tales como los grupos hidroxilo y amino. Éstos son los encargados a su vez de proporcionar una acción profundizante del color, así como también otros auxocromos que dan una profundidad del color pero en menor escala, tales como: NO<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, halógenos, -CH=CH-, SO<sub>3</sub>H y CO<sub>2</sub>H (Kirk y Othmer, 1985). Debido a la fácil obtención de los colorantes azo y a la posibilidad de preparar una gran variedad de ellos, la industria de los colorantes les ha prestado un estudio especial con respecto a otros tipos de colorantes.

La obtención de los colorantes azo se efectúa mediante la reacción llamada de copulación, la cual consiste en una combinación entre compuestos diazoicos con diversos tipos de fenoles, aminas aromáticas y aunque de manera rara también con compuestos heterocíclicos y alifáticos. Entre más grupos azoicos tenga la molécula del colorante, más profundo será el color y la intensidad; sin embargo, aún más importante son los sustituyentes, ya que ellos determinan el carácter ácido, básico o mordiente de un colorante.

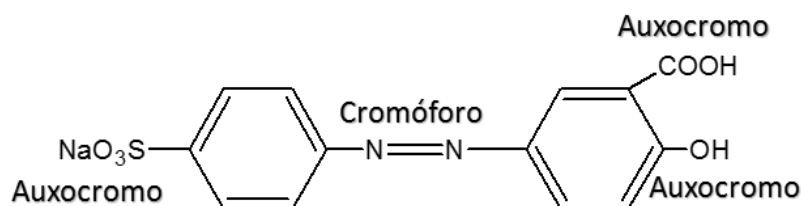
Los colorantes usados en la industria textil son de diversos tipos y pueden ser clasificados dependiendo de varios factores, tales como su composición química, clase de aplicación o uso final. Cada tipo de colorante presenta características físicas, químicas y biológicas diferentes, que les atribuyen propiedades recalcitrantes y efectos tóxicos para el ambiente. Su presencia en el agua residual textil en bajas concentraciones es muy visible e indeseable (Nigam *et al.*, 2000).

El sistema de clasificación internacional es el Colour Index, que es una publicación de la sociedad de tintes y colorantes realizada en 1924 (O'Neill *et al.*, 1999). En ella se clasifican los colorantes asignando un nombre genérico determinado por sus características de aplicación, y a continuación un número CI basado en su estructura química.

Además los colorantes se pueden clasificar de acuerdo a su estructura química o bien de acuerdo al método de aplicación a las fibras. Generalmente el grupo azo se une a dos anillos aromáticos, en cuanto a sus propiedades de color, los de este tipo aportan un rango de matices prácticamente completo y una alta intensidad de color. Además presentan buenas propiedades técnicas: solidez a la luz, al calor, al agua y a otros disolventes. A escala industrial estos colorantes tienen un elevado rendimiento económico, debido a la naturaleza de los procesos utilizados en su fabricación.

Por todas estas razones, los colorantes azo suponen 2/3 de los colorantes orgánicos citados en el Colour Index (O'Neill *et al.*, 1999) y un porcentaje similar de los colorantes empleados en aplicaciones textiles (Christie, 2003). Por esta razón frecuentemente se emplean colorantes azo como modelo en el estudio del tratamiento de efluentes coloreados.

Los colorantes azo son el grupo más importante del conjunto de los colorantes orgánicos, ya que su proceso de producción o síntesis es relativamente sencillo, poseen una alta capacidad para enlazarse a fibras tanto sintéticas como naturales y abarcan todo el espectro de luz visible (Bishop *et al.*, 1996) (Figura 2.1) se presenta la estructura de un colorante y sus auxocromos (Dos Santos *et al.*, 2007).



**Figura 2.1.** Estructura de un colorante monoazo y sus auxocromos (Dos Santos *et al.*, 2007).

### 2.1.1 Clasificación según la estructura química

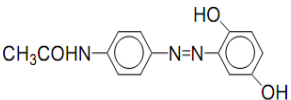
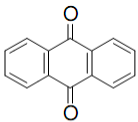
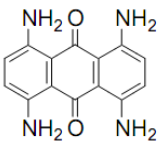
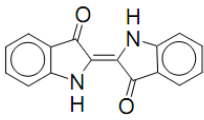
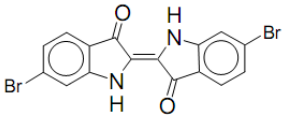

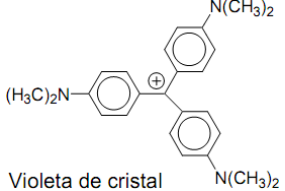
En base a la estructura química o grupo cromóforo se pueden diferenciar entre 20 y 30 grupos de colorantes (Kayan *et al.*, 2010). Los colorantes azo, antraquinonas, ftalocianinas y triarilmetanos son cuantitativamente los grupos más importantes (Tabla 2.1).

### 2.1.2 Clasificación según el modo de aplicación

La industria de colorantes constituye, aproximadamente, el 6% de la producción total del sector Industrial. En 1974, la producción mundial fue de 750,000 ton/año de colorantes. Solo unos pocos colorantes o pigmentos tienen una demanda superior a 1000 ton/año (Zollinguer, 2001) de la mayoría se producen 100-200 ton/año. En términos de población, el consumo medio en el mundo de colorantes por persona al año es de unos 200 g. En los países desarrollados, el consumo llega a ser de 600-700 g/persona al año (Zollinguer, 2001; Herbst y Hunger., 1997). El consumo por aplicaciones es el siguiente: industrial textil 60%, pinturas y tintas 25% y 15% el resto de aplicaciones (papel, cuero, alimentos y otras) (Tabla 2.2).



**Tabla 2.1.** Clasificación de los colorantes de acuerdo a sus grupos cromóforos (EPA, 1996; O'Neil *et al.*, 1999; Robinson *et al.*, 2001; Hunger, 2003; Husain 2006; Gupta y Suhas, 2009).

Familia	Grupo Cromóforo	Descripción	Ejemplo
<b>Azoicos</b>	$Ar-N=N-Ar$ Grupo azo	Estos colorantes se caracterizan por tener un grupo funcional azo, consistente en un enlace doble $-N=N-$ , unido a átomos de carbono. En cuanto a sus propiedades de color, aportan un rango de matices prácticamente completo y alta intensidad de color. Presentan buenas propiedades técnicas: solidez a la luz, al calor, al agua y a otros disolventes	 Amarillo disperso 3
<b>Antraquinonas</b>	 Antraquinona	Los colorantes a base de antraquinonas y quinonas aromáticas policíclicas tienen gran importancia ya que son colorantes ácidos con solidez a la luz, mordientes dispersos corresponden a esta categoría	 Tetraaminoantraquinona
<b>Indólicos</b>	 Índigo	El compuesto progenitor del grupo de colorantes indigoides, es el índigo, es un colorante de uso común desde tiempos prehistóricos. El índigo natural se obtiene de una planta, la indigofera. Puede reducirse por fermentación, así como, por medio de hidrosulfito de sodio, una vez reducido puede aplicarse a fibras celulósicas para después oxidarlo y obtener teñidos azules de gran brillantez	 Púrpura de tiro
<b>Trihalometanos</b>	 Cation trifenilmetilo	Estos colorantes están caracterizados por un grupo cromóforo altamente estabilizado por resonancia, son uno de los colorantes más intensos y brillantes que existen, pero generalmente exhiben poca solidez a la luz	 Violeta de cristal

**Tabla 2.2.** Clasificación de colorantes de acuerdo a su forma de aplicación (Li *et al.*, 2010; Pricelius *et al.*, 2007; Zaharia y Seteu, 2012)

Clase	Aplicaciones	Categoría química	Grado de fijación (%)	Pérdida en aguas residuales (%)
<b>Ácidos</b>	Nylon, lana, seda, papel, cuero, tintas.	Azo, antraquinona, triarilmetano, azina, xanteno, nitro y nitroso.	80 – 90	5 - 20
<b>Básicos</b>	Papel, poliacrilonitrilo, nylon, poliéster modificado, polietileno, originalmente fueron usados en lana, Seda y algodón.	Triarilmetano, cianina, tiazina, hemicianina, oxazina y acridina.	95 - 100	0 - 5
<b>Dispersos</b>	Poliéster y en cierta medida de nylon, celulosa, Acetato de celulosa y fibras acrílicas.	Azo, antraquinona, estirilo, nitro.	90 - 100	0 - 10
<b>Directos</b>	Algodón, papel, cuero y en cierta medida nylon.	Estilbenos, oxaninas y phtalocianinas.	70- 95	5 – 30
<b>Reactivos</b>	Algodón y en cierta parte en lana y nylon.	Azo, antraquinona, triarilmetano, ftalocianina(ftalocyanina) y oxidina	50 – 90	10 - 50
<b>Solventes</b>	Plásticos, gasolina, lubricantes, aceites y ceras.	Azo, antraquinona, triarilmetano y (ftalocyanina).	90 – 98	2 - 10
<b>Sulfurosos</b>	Algodón, rayón y en uso limitado seda, cuero, papel y madera.	Estructuras intermedias y grupos relativamente pequeños.	60 – 90	10 - 40
<b>A la tina</b>	Algodón, sales solubles, lana y rayón.	Antraquinona y (indigoids).	80 – 95	5 - 20

### 2.1.3 Impacto ambiental de los colorantes

El efecto de los efluentes textiles puede ser dividido de manera arbitraria según el impacto estético y/o tóxico causado sobre los cuerpos de agua. El primero de ellos, el cual resulta más evidente, no implica de manera general el impacto más adverso sobre la calidad de los cuerpos de agua. Sin embargo, es reconocido que los efectos negativos sobre los cuerpos de agua y las plantas de tratamiento está asociado a los subproductos del enlace azo y a los agentes de tinción (Sponza, 2002). Las industrias relacionadas con el giro textil representa una de las más grandes y complicadas cadenas productivas debido a la heterogeneidad de los productos y de las formas productivas. No obstante, pueden ser agrupadas genéricamente como productos de materias primas y de manufactura de fibra.

El mayor impacto ambiental se asocia a las emisiones de contaminantes tanto al agua como al aire (Bechtold *et al.*, 2002). Se debe destacar que más del 90% de la carga orgánica utilizada durante la preparación y tinción de la fibra es arrojada al medio ambiente. Los datos reportados para la Zona Metropolitana del Valle de México señalan que las empresas textiles representan 14% de las empresas instaladas a nivel nacional, los residuos generados por dichas empresas corresponden a 1,600,901 (m<sup>3</sup>/año) de aguas de los cuales el 54% (861,937 m<sup>3</sup>/año) son arrojados sin previo tratamiento (Prato, 2009).

En 1995 la producción total de colorantes en México ascendió a 16,000 ton con una tendencia al crecimiento (Bandala *et al.*, 2008). Este hecho representa un foco adicional para la generación de efluentes complejos para las plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas. Los procesos con lodos activados comprenden 47% de las 1833 plantas de tratamiento de aguas residuales municipales instalados en México (CONAGUA, 2009). Bajo las condiciones operativas encontradas en tales sistemas, los efluentes coloreados podrían pasar inalterados o ser adsorbidos por los lodos (Shaul *et al.*, 1991; Ekici *et al.*, 2001). En relación con el efecto directo sobre ecosistemas y los seres humanos, la EEA (European Environmental Agency) y la UNEP (United Nations Environment Programme) mencionan que se están proponiendo normas más rigurosas para el tratamiento de colorantes debido a su potencial de contaminación (Steinle *et al.*, 1992; Zerbinati *et al.*, 1997; Hao *et al.*, 2000; Sponza, 2006).

El primer efecto que causa el vertido de las aguas residuales con colorantes es el visual, aun a concentraciones muy bajas, en la (Figura 2.2) se muestra la contaminación de cuerpos receptores a causa de efluentes industriales con alto contenido de colorantes.



**Figura 2.2.** Efectos ecológicos a cuerpos receptores (Chung *et al.*, 1992)

El principal problema ambiental derivado del aporte de color a las aguas de los ríos y lagos se debe a la reducción de la transparencia y la disminución del oxígeno disuelto, debido a que altas cargas de color dificultan la función fotosintética de las plantas. Adicionalmente algunos problemas asociados a los efluentes textiles son debidos a la presencia de metales pesados o azufre, que producen problemas ambientales debido a su naturaleza tóxica.

#### **2.1.4 Efectos tóxicos**

Los riesgos toxicológicos de los colorantes sobre la salud humana están relacionados con el modo y tiempo de exposición. Esto es debido a que los colorantes tienen una baja solubilidad en fluidos corporales (Christie, 2003), y una alta solubilidad en agua, de manera que estos compuestos suministrados oralmente son metabolizados en la microflora intestinal y excretados más rápidamente que los compuestos menos solubles (Guaratini, 2000). Estos compuestos únicamente producen efectos de poca gravedad, tales como dermatitis o sensibilización respiratoria.

La toxicidad crónica debida a exposición continua a los colorantes es baja, se ha comprobado que al menos 3,000 colorantes azo comerciales han sido catalogados como cancerígenos (Guaratini, 2000). Su toxicidad radica en que pueden dar lugar a las aminas aromáticas de las cuales derivan debido a procesos de oxidación, hidrólisis o reducción del enlace azo. Algunas aminas aromáticas utilizadas en la fabricación de los colorantes son carcinógenos reconocidos (Wesenberg *et al.*, 2003), aun así, el análisis del grado de toxicidad de los colorantes, medido a partir de 50% de la dosis letal (LD<sub>50</sub>) ha demostrado que apenas un número reducido de colorantes presenta toxicidad aguda (LD<sub>50</sub><5 g/kg) y son principalmente colorantes diazos y básicos (Shore, 1996).

#### **2.1.5 Normatividad relativa**

En México, las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores de las industrias de colorantes y pigmentos, tanto de la fabricación como de la utilización no están regidas por la norma. Que establece los límites máximos permisibles de pH, DBO<sub>5</sub>, grasas y aceites, sólidos sedimentables y sólidos suspendidos totales (DOF, 2006). En cuanto a las descargas de colorante sólo indica que se establecerán condiciones particulares a la industria cuando se considere necesario.

Comparando con las normativas de otros países se sabe que la comisión de la Unión Europea emitió en el año 2002 una directiva que prohíbe a partir de junio de 2004 la distribución y empleo de los colorantes textiles azo, pues en el año 2002 se demostró su carácter cancerígeno, evidenciando también que estas sustancias son dañinas para el medio ambiente, en especial el agua, en la que es una amenaza para los peces y otros organismos. En Estados Unidos algunos colorantes están clasificados como sustancias peligrosas entre éstos encontramos a los colorantes del tipo azo como más peligrosos (EPA, 2003).

---

El color que presentan los efluente en los proceso de teñido han sido uno de los principales problemas ambientales que enfrenta la industria textil ya que contienen colorantes reactivos, en particular, los cuales son altamente resistentes a los procesos de tratamiento convencionales (Beltrame, 2006). Han sido explorados otros tipos de tratamiento para estos efluentes textiles como son los procesos biotecnológicos en los cuales se están utilizando microorganismos, hongos y enzimas para este tipo de efluentes textiles.

## 2.2 *Enzimas*

El nombre de enzima es de origen griego (en: dentro y zima: fermento). Básicamente una enzima es una molécula de proteína cuya estructura le permita ligarse a una clase específica de compuestos denominados sustratos y modificarlos, permaneciendo ella con la misma estructura una vez que se ha finalizado la reacción. Durante la transformación del material biológico, las enzimas no se consumen y, como consecuencia de ello, al final de la reacción la enzima se mantiene en su forma original, ellas aumentan la velocidad con la que las reacciones alcanzan el equilibrio, es decir, disminuyen la energía de activación ( $E_a$ ) de las reacciones catalizadas, con lo que la ruta de acceso para la reacción se reduce.

Otra definición de las enzimas dice que son biocatalizadores enzimáticos, debido a su eficiencia y excelente especificidad al sustrato, se utilizan en diversas aplicaciones industriales, incluyendo fabricación de productos químicos y purificación de los contaminantes (Ogushi *et al.*, 2007). Las enzimas utilizadas en la biodegradación de compuestos orgánicos han sido las peroxidasas que catalizan la oxidación del donante de electrones en presencia de peróxido (por lo general el peróxido de hidrógeno,  $H_2O_2$ ).

Cuando se lleva a cabo la reacción enzimática en un reactor discontinuo, en general, se inicia la operación y se completa con la adición de  $H_2O_2$ , la exposición a largo plazo a la solución de  $H_2O_2$  induce la desnaturalización irreversible de la peroxidasa.

### 2.2.1 *Clasificación de las enzimas*

Las enzimas se clasifican de acuerdo al tipo de reacción y sustrato. Hay seis tipos principales de reacciones catalizadas por enzimas:

- ✚ **Oxidoreductasas:** Estas enzimas catalizan la transferencia de electrones desde una molécula que va a ser el agente reductor hasta otra molécula receptora y esta será el agente oxidante.

- ✚ **Transferasas:** Transfieren grupos activos (obtenidos de la ruptura de ciertas moléculas) a otras sustancias receptoras. Suelen actuar en procesos de interconversión de monosacáridos, aminoácidos, etc. Ejemplos: transaminasas, quinasas.
- ✚ **Hidrolasas:** Llevan a cabo reacciones de hidrólisis con la consiguiente obtención de monómeros a partir de polímeros. Actúan en la digestión de los alimentos, previamente a otras fases de su degradación. Ejemplos: glucosidasas, lipasas, esterasas.
- ✚ **Isomerasas:** Actúan sobre determinadas moléculas obteniendo de ellas sus isómeros de función o de posición, es decir, catalizan la racemización y cambios de posición de un grupo en determinada molécula obteniendo formas isoméricas. Suelen actuar en procesos de interconversión. Ejemplo: epimerasas (mutasa).
- ✚ **Liasas:** Catalizan reacciones en las que se eliminan moléculas ( $H_2O$ ,  $CO_2$  y  $NH_3$ ) para formar un doble enlace o añadirse a un doble enlace, capaces de catalizar la reducción en un sustrato. El sustrato es una molécula, la cual, se une al sitio activo de la enzima para la formación del complejo enzima-sustrato. El mismo, por acción de la enzima, es transformado en producto y es liberado del sitio activo, quedando libre para recibir otro sustrato. Ejemplos: descarboxilasas, liasas.
- ✚ **Ligasas:** Realizan la degradación o síntesis de los enlaces denominados "fuertes" mediante el acoplamiento a sustancias de alto valor energético (como el ATP).

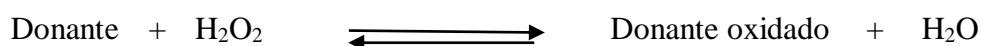
### 2.2.2 *Peroxidasas*

Dentro de la familia de las oxidoreductasas se encuentran las peroxidasas, estas enzimas se producen de forma natural en casi todas las plantas (principalmente en las raíces) y microorganismos. La literatura indica que también están presentes en leguminosas como: soya, rábano, nabo, papa, tomate, zanahoria, trigo, plátanos, etc. Se conoce que la peroxidasa de soya ha sido utilizada para la decoloración de colorantes textiles, principalmente los colorantes azo (Husain, 2006).

Las peroxidasas presentan múltiples formas isoenzimáticas que difieren tanto en la secuencia de sus aminoácidos como en sus propiedades químicas (Grambow, 1986). Los resultados de numerosos estudios realizados con diferentes especies, determinaron que las peroxidasas están involucradas en procesos fisiológicos relevantes de las plantas superiores tales como lignificación (Gaspar *et al.*, 1982), catabolismo de auxinas (Grambow, 1986),

resistencia a patógenos, así como en diversos mecanismos de respuesta que éstas presentan a diferentes situaciones de estrés (Tarragó *et al.*, 2003).

Las peroxidasas se emplean como biocatalizadores para la generación de productos de interés biotecnológico e industrial como resinas fenólicas, adhesivos, antioxidantes, antiestáticos y protectores de radiación magnética, colorantes alimentarios y componentes bioactivos de detergentes (Rodríguez Couto *et al.*, 2002). La peroxidasa es una enzima que cataliza la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el poder oxidante del peróxido de hidrógeno.



Estas enzimas están siendo investigadas por su potencial degradación de colorantes ya que están implicadas en las reacciones de transferencia de electrones. En el caso de reacciones en la que el contaminante objetivo se oxida, la enzima recibe uno o más electrones desde el sustrato y dona estos electrones a un receptor. Por lo tanto, al final de la reacción, ella se regenera y está disponible para el próximo ciclo catalítico (Maddhinni *et al.*, 2006). Las enzimas que han presentado mayor utilidad en el tratamiento de compuestos recalcitrantes y de efluentes coloreados son: peroxidasa, lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa, lacasa y azo reductasa (Husain, 2006).

La peroxidasa extraída de la raíz del rábano picante (HRP) es la más usada. Las peroxidasas son utilizadas en laboratorios clínicos y en la industria. Así, las pruebas para la determinación y cuantificación de metabolitos como glucosa, ácido úrico, colesterol o triglicéridos en fluidos biológicos usan peroxidasas como enzima acoplada. También se aplican en inmunoensayos para la detección de virus conocidos como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) causante del SIDA o herpesvirus (Moschos, 2007).

La Comisión Científica de la Unión Europea ha definido a las peroxidasas como una de las proteínas con mayor interés biotecnológico para el siglo XXI, por su aplicación en la conservación del ambiente. En esta línea estas enzimas pueden sustituir a algunos reactivos y catalizadores químicos usados hoy en día en cierto tipo de industrias, además facilitan la remoción de compuestos orgánicos contaminantes. Las principales fuentes portadoras de enzimas son los hongos y raíces de rábano, actualmente se está prestando atención a la extracción de enzimas de plantas, vegetales y leguminosas entre las cuales destacan la del frijol de soya y chayote (Moschos, 2007).



Hay un creciente reconocimiento de que las enzimas se pueden utilizar en muchos procesos para dar un tratamiento a contaminantes específicos. En este sentido, los recientes avances biotecnológicos han permitido la producción de enzimas utilizando procesos más económicos y fácilmente disponibles a través de un mejor aislamiento y purificación. Las ventajas potenciales del tratamiento enzimático en comparación con tratamiento convencionales incluyen: aplicación a materiales recalcitrantes, el funcionamiento a altas concentraciones de contaminantes y bajo una amplia gama de pH y temperatura, entre otros (Durán y Esposito, 2000). En años recientes, el uso de los sistemas vivos, tales como microorganismo y plantas para degradar contaminantes recalcitrantes están ganando importancia como una alternativa viable a los métodos existentes. Los altos costos de los tratamientos químicos especializados para la eliminación de contaminantes y el hecho de que algunos de estos tratamientos crean residuos sólidos adicionales han conducido al desarrollo de métodos biológicos más eficientes y simples.

Los sistemas biológicos son capaces de provocar la degradación de las sustancias químicas, debido principalmente a sus enzimas. Por lo tanto, ambas enzimas intracelulares y extracelulares, se están explorando como medios bioquímicos de tratamiento de aguas residuales. En general, las enzimas son catalizadores altamente específicos y extremadamente eficientes las cuales pueden degradar un contaminante sin afectar a los otros componentes en el efluente. Por lo tanto, el tratamiento enzimático es adecuado para los efluentes que contienen cantidades relativamente grandes de contaminantes denominados recalcitrantes (Mugdha y Usha, 2012).

Las principales investigaciones realizadas en este campo se encuentran en la India lideradas por los investigadores Mahreen Matto, Anirban Bhunia y Qayyum Husain del Departamento de Bioquímica y Facultad de Ciencias de la vida en la Universidad Aligarh Muslim. Los estudios se centran en la aplicación potencial de enzimas oxidorreductasas en la decoloración y detoxificación de colorantes sintéticos presentes en las aguas residuales. Las limitantes en estas investigaciones son la pérdida de enzima en los tratamientos y los bajos rendimientos de las enzimas inmovilizadas, aunado a esto todas las pruebas realizadas se llevan a cabo utilizando un efluente sintético únicamente con colorante como sustrato.

### ***2.2.3 Fuentes de obtención de las peroxidasas***

Las peroxidasas se encuentran en animales (ratas, conejos, cerdos), plantas superiores (rábano picante, mango, arroz, soya, piña, pera, papa, tabaco, maíz, maní, caña de azúcar, tomate, remolacha, nabo), levaduras, hongos y bacterias. En los mamíferos se hallan principalmente en leucocitos, hígado, útero, leche y tiroides; por tanto la enzima puede ser aislada de diferentes fuentes. Las especies vegetales más ricas en peroxidasas son las higueras y el rábano picante, las enzimas con actividad peroxidásica se encuentran



---

principalmente en la savia y en la raíz, respectivamente (Shaffiqu *et al.*, 2002). Las principales fuentes portadoras de enzimas son los hongos y raíces de rábano, sin embargo actualmente se está prestando más atención a la extracción de enzimas de plantas, vegetales y leguminosas entre las cuales destaca el frijol de soya y chayote.

#### **2.2.4 Descripción de la soya**

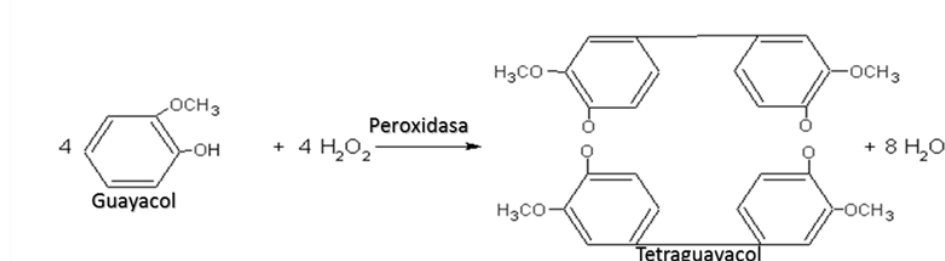
La soya o soya (*Glycine max*) es una especie de la familia de las leguminosas (Fabaceae) cultivada por sus semillas de medio contenido en aceite y alto de proteína. El grano de soja y sus subproductos (aceite y harina de soja, principalmente) se utilizan en la alimentación humana y del ganado. Se comercializa en todo el mundo, debido a sus múltiples usos. El cultivo de soja, además de ser un factor muy valioso, ayuda al ser humano si se efectúa en el marco de un cultivo por rotación estacional, ya que fija el nitrógeno en los suelos, agotados tras haberse practicado otros cultivos intensivos. En cambio, el monocultivo de soja, acarrea desequilibrios ecológicos y económicos si se mantiene prolongadamente y en grandes extensiones (INTA, 2003). En México en el 2009 se produjeron 153,000 ton de soya. El 87% de la producción se concentró en los estados de Tamaulipas (58%), Chiapas (16%) y San Luis Potosí (13%). En el país hay una gran variedad de especies de soya que se cultivan, pero es la variedad de Tapachula 86 y UFV-1 las que más se producen ocupando un 60% en los cultivos, debido a que poseen mayor capacidad de rendimiento y estabilidad (SAGARPA, 2009).

#### **2.2.5 Descripción del chayote**

El chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) o también conocido como erizo, es un fruto que presenta una impresionante variación fenotípica. La palabra chayote deriva de la palabra Nahuatl “Chayotli” y es uno de los nombres más frecuentes con el que se le designa. Se considera que en México y Centro América tuvo lugar el origen de la especie según (Welinder, 1985). Este fruto pertenece a la familia de las Cucurbitáceas, es una planta trepadora, con zarcillos, hojas lobuladas, flores pequeñas y blanquizas, comúnmente es un fruto ovoide con espinas o bien sin ellas. La variación fenotípica en el producto se presenta en el tamaño, ya que existen frutos que tienen unos cuantos centímetros y otros más de 20 cm, existiendo una estrecha relación con el peso. El color varía formando un continuo desde el verde oscuro hasta el blanco amarillento, en donde los más abundantes son las tonalidades verdes. Por lo que respecta a la forma, pueden agruparse en periforme, alargada y redonda, misma que se presenta indistintamente en tamaño, color y número de espinas (Welinder, 1985). Además existe la variedad no espinosa con características similares en forma, tamaño y color a la espinosa.

### 2.2.6 Actividad enzimática peroxidasa

La peroxidasa es una hemoproteína (presenta como grupo prostético un grupo Hemo) que cataliza la oxidación de compuestos danadores de hidrógeno, como o-fenilendiamina (aminas aromáticas), guayacol y pirogalol (fenoles) por medio de peróxidos (de ahí el nombre peroxidasa). El guayacol es el sustrato oxidable más usado para determinar la actividad de ésta enzima (Figura 2.3), dicho sustrato es oxidado a un complejo coloreado de tetraguayacol (color rojo ladrillo) en presencia de peroxidasa, la velocidad de formación de coloración, es utilizada como medida de la actividad enzimática por lecturas espectrofotométricas de las absorbancias en relación con el tiempo (Fernández *et al.*, 2003; Araujo *et al.*, 2006).



**Figura 2.3.** Estructura en la cual se observa la reacción entre 4 moléculas de guayacol y 4 moléculas de peróxido de hidrógeno, gracias a la catálisis de la peroxidasa se obtiene un producto de tetraguayacol y 8 moles de agua. (Fernández *et al.*, 2003; Araujo *et al.*, 2006).

### 2.2.7 Importancia de las peroxidases vegetales

Las peroxidases llevan a cabo reacciones de deshidrogenación oxidativa. El mecanismo de esta reacción comienza cuando una molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  hace que el  $\text{Fe}^{3+}$  pase a  $\text{Fe}^{4+}$  generando un derivado oxo-ferril (IV) con un radical libre en la porfirina, al cual se le llama compuesto I. La histidina y la arginina facilitan el rompimiento del  $\text{H}_2\text{O}_2$  para que el  $\text{Fe}^{3+}$  acepte el protón que el rompimiento le proporciona, donando un electrón. En el segundo paso del mecanismo y gracias a la presencia de un agente reductor externo, se forma un oxo-ferril (IV) porfirina catiónica o compuesto II. La catálisis oxidativa de la peroxidasa en solución acuosa da un incremento en la formación de compuestos oligoméricos, estos tienen baja solubilidad hacia el solvente, de tal modo que se forman polímeros de alto peso molecular que tienden a precipitarse (Akhatar *et al.*, 2006; Buchanan y Nicell, 1997; Ghioureliotis y Nicell, 1999; Wright y Nicell, 1999; Kobayashi, *et al.*, 2001; Singh, *et al.*, 2006; Bayramoglu y Arica, 2008).

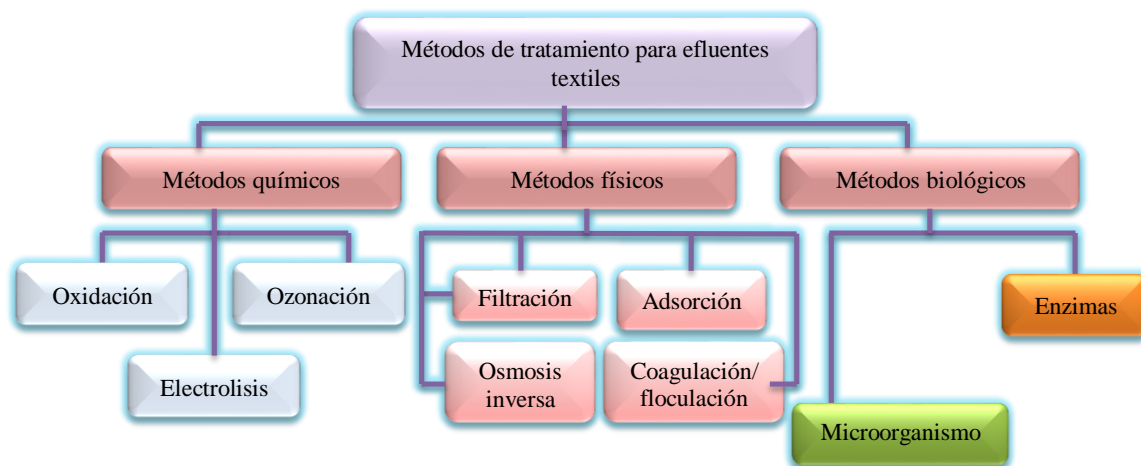
La peroxidasa del rábano europeo puede catalizar la formación de radicales libres por medio de la polimerización de una variedad de compuestos aromáticos incluyendo al fenol (Cheng *et al.*, 2006; Cooper y Nicell, 1996; Tatsumi, *et al.*, 1994), clorofenoles (Tatsumi *et al.*, 1994) y otros compuestos fenólicos (Zhang *et al.*, 2007). El uso de materiales vegetales

como el rábano europeo (*Armoracia rusticana L.*) puede ser una alternativa viable para la desodorización de estiércol (Govere *et al.*, 2007).

Específicamente las peroxidadas y lacasas/polifenoloxidasas de las plantas son consideradas como buenas candidatas para la decoloración de colorantes textiles, por ejemplo, se ha demostrado que la peroxidasa del rábano europeo (horseradish peroxidase) cataliza la formación de radicales libres seguida de su polimerización espontánea de una variedad de compuestos aromáticos incluyendo al fenol, 2 y 4- clorofenol y otros compuestos del fenol (Dec y Bollag, 1994), en la degradación de colorantes azo de importancia industrial (Souza de Ulson y Forgiarini, 2007).

### 2.3 Métodos de tratamiento para efluentes textiles

El desarrollo de una tecnología adecuada para el tratamiento de efluentes textiles es objeto de gran interés en los últimos años debido a un aumento de la mentalización y la rigidez de la reglamentación ambiental. Las principales técnicas disponibles para la decoloración de este tipo de aguas se pueden agrupar en tres grandes grupos: tratamientos químicos, físicos y biológicos (Vandevivere *et al.*, 1998; Robinson *et al.*, 2001; Forgacs *et al.*, 2004) (Figura 2.4)



**Figura 2.4.** Tecnologías para el tratamiento de colorantes azo modificado (Vandevivere *et al.*, 1998; Robinson *et al.*, 2001; Forgacs *et al.*, 2004).

#### 2.3.1 Métodos químicos

Según Deshpande *et al.* (2011) los procesos de oxidación avanzada son una clase importante de los procesos de tratamiento para la eliminación de colorantes y residuos orgánicos en los efluentes que se originan en las industrias textiles. Si bien los procesos tales como la adsorción, y el tratamiento biológico son aplicables para el tratamiento de

efluentes con altas concentraciones de productos químicos, la foto-catálisis se puede utilizar para eliminar las trazas finales de productos químicos peligrosos.

### *2.3.1.1 Oxidación química*

La oxidación es un método para el tratamiento de aguas residuales mediante el uso de agentes oxidantes, siendo el más comúnmente utilizado para los procesos de decoloración es el cloro, peróxido de hidrógeno, fenton, ozono y permanganato de potasio (Metcalf y Eddy, 2004).

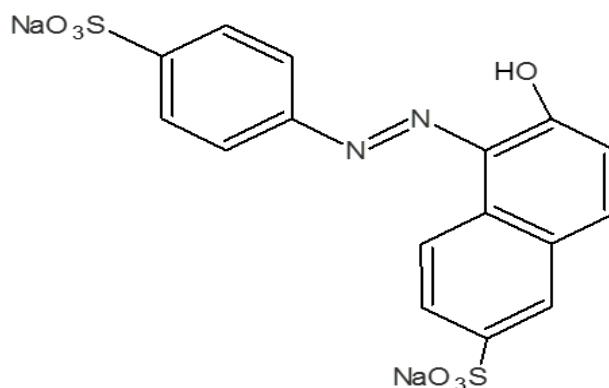
Estos métodos han sido ampliamente utilizados para los procesos de decoloración parcial o totalmente, ya que requieren bajos tiempos de reacción. Sin embargo, una oxidación completa de colorante, teóricamente, puede reducirse a moléculas más complejas. (Gupta y Suhas, 2009). Dentro de los tratamientos de oxidación avanzada se encuentra el tratamiento foto-fenton, el cual utiliza peróxido de hidrógeno y sales ferrosas para la generación de radicales OH, donde éste tiene un alto potencial redox. En este proceso, la tasa de degradación se incrementa significativamente, en comparación con el proceso Fenton tradicional.

La electroquímica es utilizada como un tratamiento terciario para eliminar el color, la decoloración se puede lograr ya sea por oxidación electroquímica con ánodos no solubles o por electro-coagulación. Esta técnica es eficaz en la decoloración de colorantes solubles e insolubles con la reducción de DQO. Sin embargo, los principales inconvenientes son el costo elevado de electricidad y producción de lodos, así como la contaminación de productos orgánicos clorados, metales pesados, debido a la oxidación indirecta. (Gupta y Suhas, 2009).

Al igual que los procesos de oxidación avanzada implican el uso de más de uno de los procesos de oxidación, ya que un solo sistema no es suficiente para la descomposición total de los colorantes. Estas reacciones, involucran la producción acelerada de radicales hidroxilo libre, que es muy reactivo.

Una amplia variedad de procesos de oxidación avanzada están disponibles como los procesos de oxidación química con ozono, ozono y peróxido, tales como UV/peróxido de hidrógeno, UV/ozono. En un estudio, se mostró que cuando el proceso de UV se utiliza solo, únicamente se obtiene el 10-20% de eficiencia de decoloración, pero cuando se usa en combinación con peróxido, la eliminación de color aumenta a un 90%. (Gupta y Suhas, 2009).

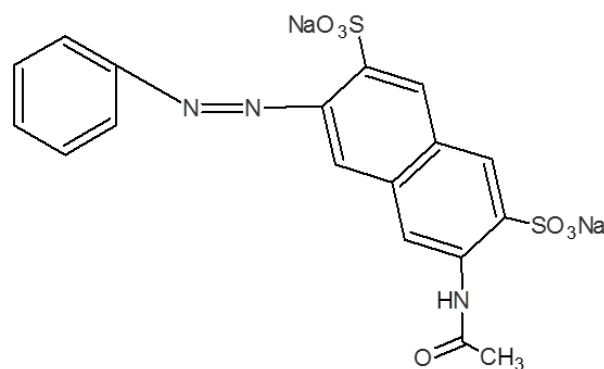
Fragoso *et al.* (2009) estudiaron la degradación de colorante amarillo 3, utilizando peróxido de hidrógeno al 30%. Se dieron cuenta de que es necesario la adición de hidróxido de sodio para el comienzo del proceso de oxidación y estos colorantes se optimiza para el proceso cuando el pH se estabiliza en 8.0. En esta condición, la degradación alcanzó el 90% en la (Figura 2.5), se muestra la estructura del colorante.



**Figura 2.5.** Colorante amarillo 3 (Fragoso, 2009).

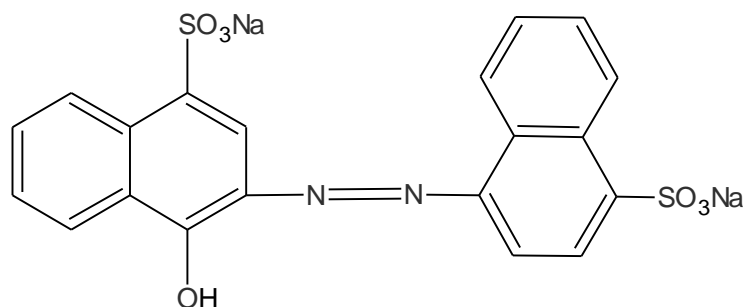
Daud *et al.* (2010) estudiaron el proceso oxidativo en la decoloración del colorante rojo ácido 1 (RA1) utilizando óxido de hierro (III) inmovilizado sobre montmorillonita K10 (Fe-MK10) en presencia de peróxido de hidrógeno. Los resultados obtenidos fueron del 99% del colorante en 150 min de reacción.

Hassan *et al.* (2011) obtuvieron el mismo resultado del 99% en la decoloración del colorante rojo ácido en 60 min de reacción utilizando Fe-zeolita como catalizador, lo que confirma que el Fe-zeolita es un catalizador prometedor para el sistema heterogéneo de Fenton en la (Figura 2.6), se muestra la estructura del colorante (RA1).



**Figura 2.6.** Estructuras del colorante rojo ácido 1 (RA1) (Hassan *et al.*, 2011).

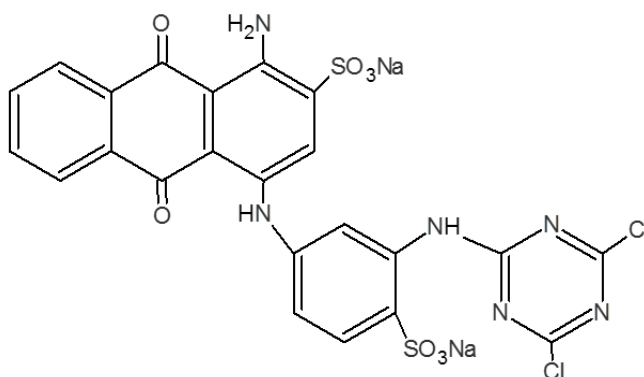
Idel-Aouad *et al.* (2011), estudió la decoloración del colorante azoico rojo ácido 14 (Figura 2.7). por el proceso Fenton a 80°C, utilizando Fe (II) como catalizador soportado sobre zeolita tipo Fe (II), con peróxido de hidrógeno y obtuvieron el 99.3% de decoloración en solo 6 min de contacto con la solución.



**Figura 2.7.** Estructuras del colorante rojo ácido 14 (Idel-Aouad *et al.*, 2011)

### 2.3.1.2 Foto- oxidativos

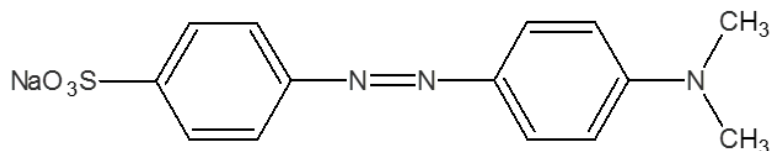
Zhou *et al.* (2009) estudiaron la fotodegradación del colorante azul reactivo 4. (Figura 2.8) usando zinc (ZnO) nanopartículas dopadas con neodimio (Nd) de óxido, alcanzando una decoloración 91.25% en 90 min cuando la concentración del catalizador fue de 0.1 g / L.



**Figura 2.8.** Estructuras del colorante azul reactivo 4 (Zhou *et al.*, 2009).

Haji *et al.* (2011) estudió la degradación del colorante anaranjado de metilo (Figura 2.9) en solución acuosa por oxidación avanzada (POA) utilizando el proceso de asociación  $H_2O_2/UV$ . Se encontró que la solución de colorante expuesto a la luz UV alcanza la degradación sólo el 26% en 4 h, mientras que la solución de colorante se añadió  $H_2O_2$  y se expone a la luz UV su degradación completa se obtuvo en sólo 3 min. Llegaron a la

conclusión de que el  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$  proceso se presenta como una alternativa viable para la degradación de dicho colorante.



**Figura 2.9.** Estructuras del colorante anaranjado de metilo (Haji *et al.*, 2011).

### 2.3.1.3 Ozonación

Las técnicas de ozonización consisten en la destrucción de compuestos en base a la elevada capacidad oxidativa del ozono. La reacción de oxidación es rápida, se pueden tratar altos caudales, no se generan residuos ni lodos y se obtiene un efluente incoloro y con baja DQO, de manera que es apto para su vertido al medio ambiente (Soares *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2008b). Reportaron en sus investigaciones que la aplicación de ozono para la remoción de colorantes reactivos amarillo y azul brillante remazol se puede lograr en 5 min de tiempo de reacción y el consumo de ozono es de 37.5 y 36 mg/L respectivamente. La decoloración del azul reactivo 15 fue estudiado por Wu *et al.*, 2008b en un reactor semicontinuo, encontrando que las reacciones llevadas a cabo fueron de primer orden. Los autores observaron que la ozonización es efectiva para remover DQO. Algunos autores sugieren que este proceso puede ser utilizado para el reúso del agua ya que puede llegar a remover el color en su totalidad y la DQO hasta cierto punto, incluso en condiciones críticas como el teñido con tonos claros. Sin embargo debe comprobarse la toxicidad de cada efluente concreto, pues en algunos casos los compuestos generados tienen mayor carácter tóxico que los colorantes de partida (Gutiérrez, 1999). Otra gran desventaja de la ozonización es su corto tiempo de vida media, aproximadamente de 20 min, lo cual repercute fuertemente en el costo del proceso (Robinson *et al.*, 2001).

## 2.3.2 Métodos físicos

### 2.3.2.1 Adsorción

El proceso de adsorción ha sido ampliamente utilizado para la eliminación de color. Éste que además de ser ampliamente utilizado para la eliminación de colorantes también tiene una amplia aplicabilidad en el tratamiento de aguas residuales (Gupta y Suhas, 2009). Se ha encontrado que el uso de carbón activado es eficaz como adsorbente, pero sólo tiene éxito en algunas clases de colorantes y se sabe que es un material costoso (Gupta y Suhas, 2009; Azbar *et al.*, 2004). Por tal motivo se hicieron investigaciones para la búsqueda de otros

---

adsorbentes a menor costo como la turba, la bentonita, escorias de acero, plantas, cenizas, mazorca de maíz, virutas de madera, caolín, y sílice, sin embargo, estos adsorbentes de bajo costo tienen capacidades de adsorción generalmente bajas y requieren grandes cantidades de ellos. La adsorción del colorante dependerá del tipo y estructura molecular del colorante (Srinivasan y Viraraghavan, 2010). No obstante, esta técnica no es destructiva, ya que sólo transfiere en contaminante del agua a la matriz sólida. Por consiguiente, las operaciones costosas tales como la regeneración de los materiales adsorbentes y post-tratamiento de desechos sólidos son necesarias (Azbar *et al.*, 2004).

#### 2.3.2.2 *Coagulación – floculación*

Este proceso se basa en la adición de polielectrolitos o floculantes inorgánicos (sales de hierro o aluminio), que forman flóculos con las moléculas de colorante facilitando su eliminación por sedimentación (Mishra, 2006). Es un proceso eficiente al tener altos porcentajes de remoción de color sin embargo se generan lodos que deben ser eliminados. Además los mejores rendimientos se logran al aplicar un exceso de coagulante, que aumenta la concentración de contaminante en el efluente. El proceso en sí es efectivo, sin embargo el principal inconveniente es que al final del tratamiento hay una alta generación de lodos concentrados (Lee *et al.*, 2006), sin embargo no es eficiente para colorantes altamente solubles y el resultado con colorantes azoicos, ácidos, reactivos generalmente no son muy eficientes (Hai *et al.*, 2013).

#### 2.3.2.3 *Filtración por membrana*

La tecnología de filtración es un componente integral de agua potable y aplicaciones de tratamiento de agua residuales que incluye microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa. Esto ha sido investigado para la eliminación de color; cada proceso de la membrana será más adecuado de acuerdo a la función en particular del tratamiento de aguas. Entre ellos, la microfiltración no es de mucho uso para el tratamiento de aguas residuales debido al tamaño de poro, sin embargo la ultrafiltración y nanofiltración son técnicas usadas para el retiro de color en las aguas teniendo como desventaja que las moléculas de los colorantes crean frecuentes obstrucciones en el poro de la membrana. Los principales inconvenientes de estos tratamientos son altas presiones de trabajo, el consumo de energía significativo, el elevado costo de membrana y su uso de vida relativamente corto, que hace que su uso sea limitado para el tratamiento de aguas residuales textiles. (Gupta y Suhas, 2009).



### 2.3.3 Métodos biológicos

El tratamiento biológico es la técnica más común para el tratamiento de aguas residuales con contenido de colorantes. Existen varios tratamientos de este tipo que se han utilizado para la decoloración y mineralización de estos compuestos. Los tratamientos biológicos ofrecen ventajas por ser relativamente baratos (Gupta y Suhas, 2009). Un proceso biológico puede ser aerobio (con oxígeno), anaerobio (sin oxígeno) y facultativo (aerobio - anaerobio) y por métodos enzimáticos combinados con peróxido de hidrógeno, enzima/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 2.3.3.1 Sistemas aerobios

Los hongos y las bacterias son los dos grupos de microorganismos que se han estudiado lo más extensamente posible en relación al tratamiento de aguas residuales con colorantes. No obstante cabe señalar que en el caso de colorantes sintéticos no son uniformemente susceptibles a su degradación por procesos aerobios convencionales (Gupta y Suhas, 2009), y los productos de biodegradación pueden ser de naturaleza tóxica (Azbar *et al.*, 2004).

González-Martínez *et al.* (2010) emplearon agua residual municipal como cosustrato para el tratamiento del colorante azul directo 2 (AD2 – 50 mg/L) en un biofiltro aireado usando tezontle como soporte para la biomasa. Estos autores sugieren que con estrategias de operación tales como aireación alternada (12 h anaerobio, 12 h aerobio) y aireación combinada (parte inferior del filtro anaerobia y parte superior aerobia), el agua residual municipal actuó como un buen donador de electrones en la reducción del colorante. La mejor remoción de color se obtuvo bajo condiciones anaerobias/aerobias a diferentes profundidades 61% que bajo aireación intermitente 45%.

#### 2.3.3.2 Sistemas anaerobios

Los tratamientos anaerobios son utilizados como pre-tratamiento para la degradación de colorantes sintéticos ya que son una alternativa económica comparada con los sistemas aerobios ya que utilizan aireación y generan una gran cantidad de lodos de desecho (Gupta y Suhas, 2009). Los colorantes azo pueden reducirse fácilmente bajo condiciones anaerobias, sin embargo generan pequeñas moléculas tales como las aminas aromáticas que son altamente tóxicas (Mohan *et al.*, 2007). Bajo condiciones anaerobias, Işık y Sponza (2007) observaron la degradabilidad de los metabolitos producto de la reducción de los colorantes negro reactivo 5, rojo directo 20, negro directo 38, marrón directo 2 y amarillo directo 12, en concentraciones que variaron entre 200 y 1800 mg/L con un tiempo de incubación de 72 días. Estos autores encontraron que bajo largos tiempos de retención se puede lograr la mineralización de metabolitos de algunos colorantes, tales como el negro

---

reactivo 5 y el amarillo directo 12. Para el colorante rojo directo 20 (1800 mg/L) se recuperaron 247.5 mg bencidina/L al inicio, mientras esta concentración disminuyó a 142.6 mg bencidina/L al finalizar los 72 días. Los porcentajes de recuperación de aminas (medidas como aminas totales) para los colorantes rojo directo 20, negro directo 38, marrón directo 2 y el amarillo directo 12, fueron 57.6, 69.4, 66.5 y 77.1%, respectivamente. Estos autores atribuyen los bajos porcentajes de recuperación de aminas, procedentes de la reducción de los colorantes azo, a la mínima transformación anaerobia resultante del rompimiento del anillo aromático de la estructura de los colorantes y sugieren que los metabolitos de los colorantes azo analizados son persistentes bajo condiciones anaerobias. Investigaciones realizadas acerca de la degradación de aminas sugieren que estos metabolitos son degradados bajo condiciones aerobias; sin embargo, alguno no lo son; especialmente los metabolitos generados en la transformación de colorantes reactivos tales como el negro reactivo 5 y el violeta reactivo 5, que a menudo se reporta que no fueron degradados bajo condiciones aerobias (Libra *et al.*, 2004; Supaka *et al.*, 2004).

#### 2.3.3.3 *Sistemas anóxicos*

El sistema anóxico es una combinación de un tratamiento aerobio y un anaerobio. La ventaja que presenta este sistema es una mineralización completa de los contaminantes que es a menudo alcanzada por la acción sinérgica de diversos organismos. La reducción de los colorantes azo se puede lograr bajo condiciones reductoras en biorreactores anaerobios y las aminas aromáticas resultantes de este proceso pueden ser mineralizadas bajo condiciones aerobias. El pH inicial, la concentración del colorante y la temperatura del efluente son factores que influyen en el proceso de decoloración. A pesar de que este sistema es competitivo, tiene inconvenientes ya que presenta baja biodegradabilidad en colorantes solubles y los tiempos de reacción suelen ser muy largos (5 a 30 días) (Gupta y Suhas, 2009). Debido a la naturaleza recalcitrante e inhibitoria de los colorantes, un tratamiento biológico convencional no es eficiente para su tratamiento, debido a esta problemática en la actualidad se están empleando procesos enzimáticos para su tratamiento.

#### 2.3.3.4 *Sistemas enzimáticos*

En los últimos años se han realizado estudios de métodos enzimáticos para la remoción de compuestos recalcitrantes, cuando no pueden ser eliminados por tratamientos biológicos o físicos, (Villalobos y Buchanan 2002; Villegas *et al.*, 1993), ya que presentan ventajas por ser altamente selectivas (Aitken, 1993), son menos probables a que se inhiban por sustancias que pueden ser tóxicas para los organismos vivos y su costo podría llegar a ser inferior al de otros métodos. Además, se requieren bajos tiempos de retención con respecto a otros tratamientos (Siddique *et al.*, 1993).

---

Venkata *et al.* (2005) utilizaron la peroxidasa del rábano picante libre e inmovilizada en gel de acrilamida en la degradación del colorante ácido negro 10 observado que la mejor condición de reacción para la enzima libre fue de (concentración de colorante de 20 mg/L<sup>-1</sup>, pH 2.0 temperatura 25 ° C; tiempo de contacto de 45 min; concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 0.6 µl/L<sup>-1</sup> y la cantidad de 2205 enzima/mL) y con la enzima inmovilizada se obtuvo 79% de decoloración.

Maddhinni *et al.* (2006) estudió la degradación del colorante amarillo directo 12 utilizando la peroxidasa extraída de rábano picante y peróxido de hidrógeno, y observó que la capacidad de decoloración aumento con el incremento de las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y enzima HRP, alcanzando el 78% a pH 4.0.

Pirillo *et al.* (2010) estudió la degradación del colorante alizarina utilizando HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, logrando un 88% de decoloración de la solución con una concentración de 50 mg/L en 2 h de reacción. También observó que la temperatura tiene un efecto importante en la actividad de la enzima cuando se elevó la temperatura de 25 a 45 ° C, sin embargo no se observó ningún cambio significativo cuando se incremento la temperatura de 45 a 65°C. El intervalo de pH fue de 7 a 8.

Según Terrés, (2009) estudió la biodegradación de añil catalizada por la peroxidasa de rábano picante, la desaparición del color en la solución se presentó entre 30 y 60 min y el rango de pH ácido entre 4 y 5, la temperaturas de 40 a 60°C, con la concentración de peróxido de hidrógeno entre 0.3 y 0.03% y con 2 mg de enzima.

Patil *et al.* (2009) estudió la decoloración del colorante rojo reactivo 198, encontró el 99% de decoloración en 10 días de reacción. Observó que los tipos de enzimas oxidasas como son lignina peroxidasa, lacasa, manganeso peroxidasa y tirosinasa y reductasas están presentes en las raíces de *tagetes* durante la biodegradación. Estas raíces fueron capaz de eliminar concentraciones de colorante de hasta 110 mg/L.

Shaffiqu *et al.* (2002) estudio la degradación de ocho colorantes ampliamente usados en la industria textil utilizando la enzima peroxidasa extraídas de la planta *Iponema palmata* y *Saccharum spontaneum*. Los intervalos de concentración estudiada fueron de 25 a 200 mg/L, obteniendo porcentajes de decoloración del 50 al 90%.

Algunas de las enzimas que se utilizan en el tratamiento de residuos orgánicos de colorantes son lacasas, peroxidasas, monooxigenasas y dioxigenasas entre otras. Las enzimas extracelulares como las lacasas y peroxidasas generalmente se producen por hongos cuya función natural es degradar la lignina. La habilidad de los hongos de pudredumbre blanca para degradar colorantes y otros compuestos xenobióticos se debe a la naturaleza no específica de su sistema enzimático.

El uso de lacasas y peroxidasa para la degradación de compuestos xenobióticos resulta muy prometedor (Harvey y Thurston, 2001). En la (Tabla 2.3) se presenta un listado de varias enzimas y su principal aplicación en el tratamiento de sustancias orgánicas, reportados por diferentes autores.

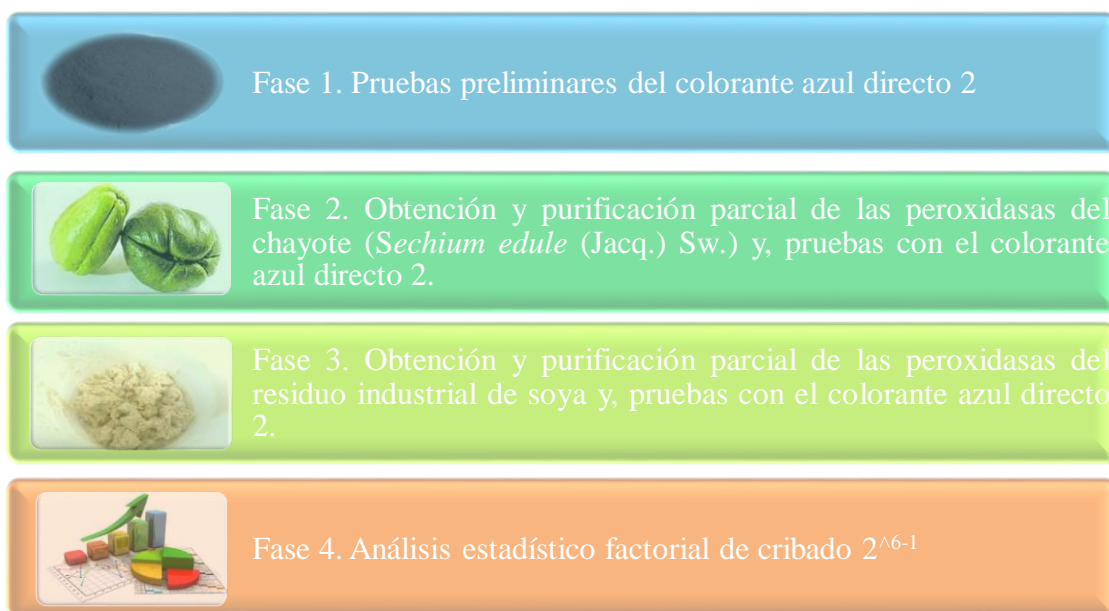
**Tabla 2.3.** Diferentes clases de enzimas y su aplicación en sustancias orgánicas

<b>Enzimas</b>	<b>Fuente</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Referencias</b>
<b>Azo reductasa</b>	<i>Pseudomonas sp.</i>	Degradación de colorantes	Husain, 2006.
<b>Cloro peroxidasa</b>	<i>Caldariomyces fumago</i>	Oxidación de compuestos fenólicos	Aitken, 1993.
<b>Cyanidasa</b>	<i>Alcaligenes denitrificans</i>	Descomposición de la cianida	Basheer <i>et al.</i> , 1992.
<b>Lacasa</b>	<i>Trametes versicolor</i> , Soya	Fenoles, aminas aromáticas, colorantes azo	Duran y Eposito 2000; Duran <i>et al</i> , 2002; Christian <i>et al</i> , 2005; Husain y Husain 2008.
<b>Lignina peroxidasa</b>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Fenoles, aminas aromáticas, colorantes azo	Christian <i>et al</i> , 2005; Husain 2006; Yu <i>et al</i> , 2006; Park <i>et al</i> , 2006 y 2007; Kalme <i>et al</i> 2007.
<b>Manganeso peroxidasa</b>	Bacterias <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>basidiomycetes</i>	Oxidación de compuestos aromáticos y fenoles, colorantes azo	Duran <i>et al</i> , 2002; Christian <i>et al</i> , 2005; Eibes <i>et al</i> , 2005; Husain 2006; Baborova <i>et al</i> , 2006.
<b>Peroxidasa</b>	Raíces de rábano, tomate, hongos blancos, soya, <i>Pleurotus ostreatus</i>	Oxidación de compuestos aromáticos y fenoles, colorantes azo	Shaffiqu <i>et al</i> , 2002; Gudelj <i>et al</i> , 2002; Mohan, 2005; Akhtar <i>et al</i> , 2005; Husain 2006 y 2008; Matto y Husain, 2007.

### 3 METODOLOGÍA

#### 3.1 Planteamiento metodológico

A diferencia de los tratamientos biológicos las enzimas son aplicables a una extensa gama de compuestos actúan en presencia de sustancias tóxicas para los microorganismos poseen un amplio rango de acción de pH y temperatura no necesitan aclimatación y no generan biomasa y, necesitan procesos de control más simples (Wagner y Nicell, 2002) en comparación con los tratamientos físicos y químicos, su funcionamiento no es corrosivo y reduce el consumo de compuestos oxidantes. El planteamiento metodológico de este trabajo se dividió en cuatro fases como se describen en la Figura 3.1.



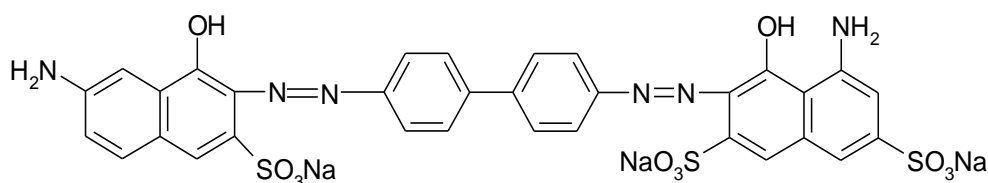
**Figura 3.1.** Planteamiento metodológico para la decoloración del colorante azul directo 2

En la fase 1, se llevaron a cabo las pruebas preliminares del colorante azul directo 2, en donde se realizó la caracterización fisicoquímica, la determinación de sus propiedades químicas, curvas de calibración del colorante, se identificaron los rangos de operación para el tratamiento del colorante y se determinó el cálculo para el porcentaje de decoloración.

### 3.2 Pruebas preliminares del colorante azul directo 2

#### 3.2.1 Caracterización fisicoquímica del colorante azul directo 2

Se evaluó la degradación del colorante azul directo 2. Este colorante es clasificado como un colorante diazo debido a la presencia de sus dobles enlaces nitrogenados (-N=N-). (Figura 3.2). Es ampliamente utilizado en la industria textil. Fue suministrado por la empresa Yucolor ubicada en CIVAC Morelos. Este compuesto se ha seleccionado ya que es uno de los colorantes más usados en la industria textil mexicana para el teñido de la mezclilla. Sus características físicas y químicas se presentan en la (Tabla 3.1).



**Figura 3.2.** Estructura química del colorante azul directo 2  
(Golka *et al.*, 2004; Morgan *et al.*, 1994)

**Tabla 3.1.** Propiedades químicas del colorante azul directo 2

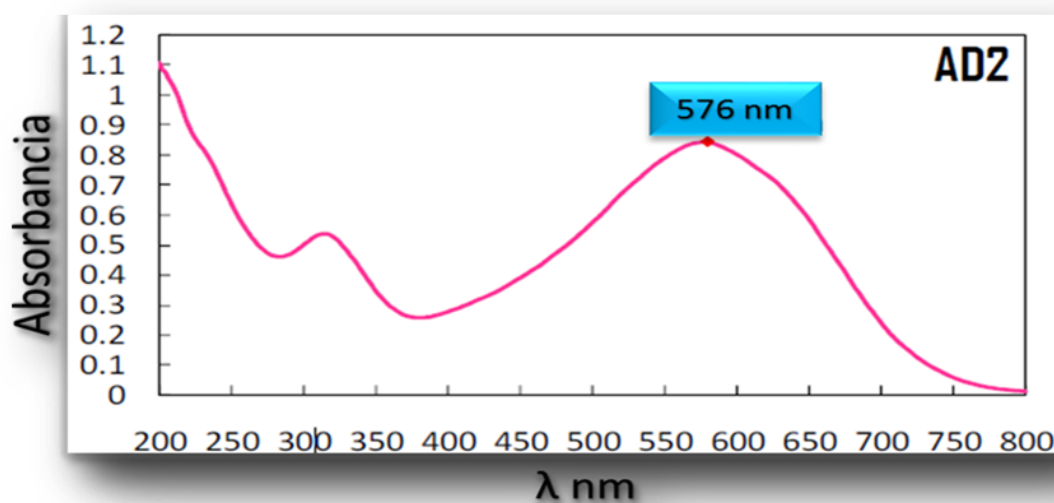
Propiedades	Valor
Nombre comercial	Chlorazol Black BH, Azul Directo 2
Fórmula molecular	C <sub>32</sub> H <sub>21</sub> N <sub>6</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>11</sub> S <sub>3</sub>
Peso molecular	830.71 g/mol
Solubilidad en agua	45 g/L (25°C)
Colour Index	22590
No. cas	2429-73-4

Los colorantes directos son moléculas relativamente grandes que tienen una alta afinidad especialmente con las fibras celulósicas. Este tipo de colorantes son aplicados directamente a las fibras, de ahí su nombre, sin la necesidad de un proceso de fijado. Son compuestos aniónicos y solubles en agua que generalmente contienen grupos ácido-sulfonados representados como sales de sodio (Van der Zee, 2002).

En la Tabla 3.2 se presentan los parámetros del colorante azul directo 2 determinadas a una solución de 100 mg/L y en la (Figura 3.3) se presenta la longitud de onda de máxima absorción.

**Tabla 3.2.** Características de una solución de colorante azul directo 2 a 100 mg/L.

Parámetro	Valor
pH	7.95
DQO	51 mg/l
DBO	< 5 mg/l
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.22 mg/l
Nitrógeno Total Kjeldahl (NTK)	5.86 mg/l



**Figura 3.3.** Espectro de absorción ultravioleta visible del colorante azul directo 2, en el intervalo de longitudes de onda de 200 a 800 nm.

Debido a la naturaleza tóxica de los compuestos químicos con los que éste colorante es fabricado, el colorante azul directo 2 no es empleado a nivel mundial y por ello, se encuentra poca información acerca de su degradación. El único trabajo que reporta resultados sobre la degradación biológica en biopelículas de este colorante es González-Martínez *et al.* (2010) adicionalmente se encontraron trabajos tales como Miranda (2009) y Hernández (2009) en donde se reporta la degradación del colorante en sistemas biológicos pero no se reporta el destino de los productos de reducción del enlace azo.

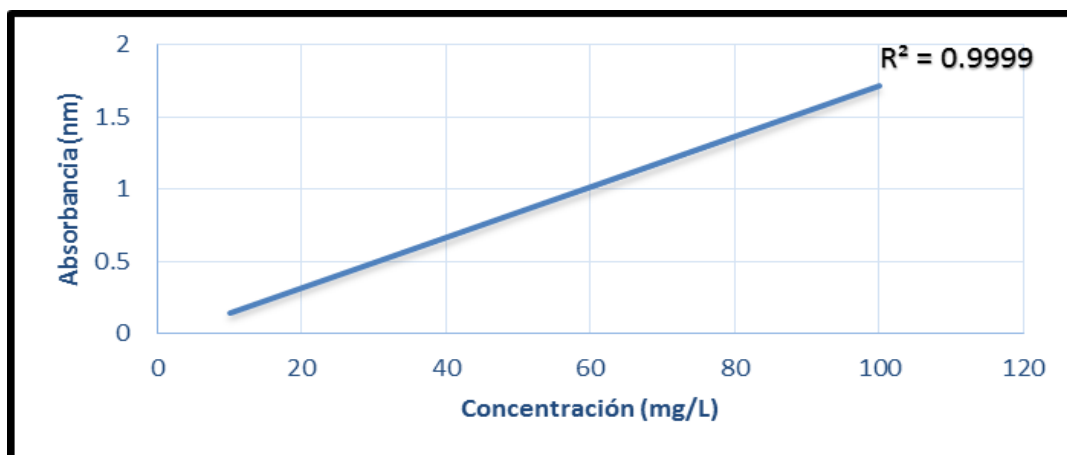
### 3.2.2 Curvas de calibración del colorante azul directo 2

En la Figura 3.4 se muestra el colorante en su forma comercial (polvo), del cual se realizaron los cálculos necesarios para pesar y aforar a concentraciones de 10 hasta 100 mg/L para realizar la curva de calibración. En la curva se obtuvo un factor de correlación del 99.9% (Figura 3.5) el cual se determinó a la longitud de onda de 576 nm, en la (Tabla 3.3) se muestran las concentraciones en mg/L del colorante a las cuales fueron determinadas y las absorbancias. Para determinar la concentración del colorante en los tratamientos de decoloración se utilizó un espectrofotómetro UV-vis Hach 2500 DR-5000. La ecuación para la determinación de la concentración del colorante fue:

$$\text{Concentración del colorante (mg/L)} = (\text{ABS}_{576\text{nm}} + 0.0.358) / (0.0175)$$



**Figura 3.4.** Colorante azul directo 2 en forma comercial y solución a las diferentes concentraciones.



**Figura 3.5.** Curva de calibración del colorante azul directo 2 (Factor de correlación absorbancia vs concentración)



**Tabla 3.3.** Valores de las concentraciones y sus absorbancias para obtener la curva de calibración del colorante azul directo 2 en el intervalo de concentraciones de 10 a 100 mg/L.

<b>Concentración (mg/L)</b>	<b>Absorbancia (λ nm)</b>
100	1.717
90	1.547
80	1.356
70	1.183
60	1.006
50	0.844
40	0.657
30	0.49
20	0.315
10	0.144

### 3.2.3 Factores de operación para el tratamiento del colorante azul directo 2.

En cuanto a la adición de enzima y peróxido de hidrógeno se estudiaron en una forma, la cual consistió en una única adición al inicio de cada tratamiento.

### 3.2.4 Cálculo para el porcentaje de decoloración (D%)

La eliminación del color se monitoreo mediante espectroscopía UV-vis por análisis de absorbancia del agua a tratar utilizando un espectrofotómetro de barrido (UV / visible), contra una línea de base definida por la absorbancia. La absorbancia de cada sobrenadante clarificado se midió a la longitud 576 nm. La concentración de colorante residual en las muestras se determinó a partir de los valores de absorbancia y utilizando la curva de calibración del mismo. El porcentaje de decoloración (D%) se calculó usando la siguiente ecuación:

**Ec. 3.1**

$$D\% = \frac{C_i - C_t}{C_i} \times 100$$

Donde  $C_i$  es la concentración inicial de la muestra y  $C_t$  es la concentración de la muestra a un determinado tiempo de reacción.

---

En la fase 2, se realizó la obtención del concentrado de peroxidasas del chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.), obtención del zumo, diálisis del zumo, cada punto se describe a detalle a continuación.

### **3.3 Obtención de un concentrado de peroxidasas de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.).**

La obtención del concentrado de peroxidasas de chayote se realizó tomando como base lo reportado por Villegas-Rosas (2003) y se describe brevemente a continuación.

#### **3.3.1 Obtención del zumo de chayote**

Un 1 kg de chayote fue lavado con agua destilada y cortado en mitades para remover la semilla. A continuación se obtuvo el zumo mediante un extractor de jugos (Turnix) y posteriormente fue centrifugado a 10,000 rpm durante 20 min a 5°C (centrífuga Sorvall RC-5). Concluido el tiempo de centrifugación el sobrenadante fue separado del sólido obtenido, el cual fue descartado. Se determinó el pH del zumo antes y después de centrifugado.

#### **3.3.2 Diálisis del zumo del chayote**

El zumo de chayote centrifugado fue dializado contra el amortiguador de acetato de sodio/ácido acético 10 mM (AcNa/HAc) a pH 5.0 y utilizando membranas de diálisis con un tamaño de corte de 12,000 daltones. Las bolsas de diálisis fueron llenadas con 200 mL del zumo y colocadas en el amortiguador en una relación de 1:50, durante 15 h, a una temperatura de 5°C y con agitación constante. Concluido el tiempo, el dializado fue centrifugado a 10,000 rpm durante 20 min a 5°C y posteriormente el sobrenadante fue separado del sólido obtenido el cual fue desechado.

#### **3.3.3 Obtención de un concentrado de peroxidasas de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.).**

Se preparó una columna cromatográfica (2.5 x 20 cm) con el intercambiador carboximetilcelulosa 52 (CM-52) previamente equilibrado con el amortiguador de AcNa/HAc 10 mM a pH 4.5 y con un volumen de lecho cromatográfico de 80 mL. A través de éste se hicieron pasar 900 mL del zumo de chayote dializado y centrifugado a una velocidad de flujo de 200 mL/h. Una vez concluida la entrada de la muestra, las proteínas retenidas fueron eluidas mediante un régimen isocrático de concentración con el amortiguador de AcNa/HAc 1 M a pH 4.5 y un volumen de 100 mL. Se tomaron alícuotas de 10 mL y se les realizó el ensayo de actividad para peroxidasas, aquellas que fueron

positivas a éste fueron unidas para constituir una sola fracción denominándosele concentrado de peroxidasas de chayote.

En la fase 3, se llevó a cabo la obtención y purificación parcial de las enzimas peroxidasas del residuo industrial de soya, obtención del zumo, diálisis del zumo, y la purificación parcial del extracto del chayote, cada punto se describe a detalle a continuación.

### ***3.4 Obtención de un concentrado de peroxidasas del residuo industrial de soya.***

Para la obtención de un concentrado de peroxidasas de un residuo de soya de origen industrial se procedió según lo reportado por Becerra-Cano (2012) y que se describe a continuación de manera resumida.

#### ***3.4.1 Obtención de un extracto acuoso del residuo industrial de soya***

Se pesaron 200 g de residuo de soya del proceso de elaboración de jugo ADES y fue homogenizado en 2000 mL de agua destilada con agitación lenta y durante 20 h a 5 °C. Transcurrido el tiempo la mezcla fue centrifugada a 10,000 rpm durante 20 min a la misma temperatura y el sobrenadante obtenido fue separado del sólido obtenido el cual fue descartado.

#### ***3.4.2 Diálisis del extracto acuoso del residuo industrial de soya***

El sobrenadante centrifugado fue dializado en el amortiguador AcNa/HAc 10 mM, pH 4.5 (en una relación de 1:66), durante 15 h a 5 °C y con agitación lenta. Las membranas de diálisis utilizadas presentaron un tamaño de corte de 12,000 daltones (Sigma-Aldrich). Concluido el tiempo, el dializado fue centrifugado en las mismas condiciones como se indicó en el párrafo anterior.

#### ***3.4.3 Obtención de un concentrado de peroxidasas del residuo industrial de soya***

Se preparó una columna cromatográfica (2.5 x 30 cm) con el intercambiador aniónico dietilaminoetil-celulosa 53 (DE-53) previamente equilibrado con amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.4 y con un volumen de lecho cromatográfico de 80 mL, a través de del cual se hizo pasar el dializado centrifugado.

Las proteínas retenidas fueron eluidas con un régimen isocrático de concentración 1M de NaCl en amortiguador de fosfatos de sodio 10 mM, pH 7.4. La velocidad de entrada de la muestra fue de 100 mL/h.

Se obtuvieron fracciones de 10 mL y posteriormente se les realizó el ensayo de actividad peroxidasa y aquellas fracciones que resultaron positivas a éste fueron unidas para constituir una nueva fracción la cual fue denominada concentrado de peroxidadas del residuo industrial de soya.

### 3.5 *Determinación de la actividad enzimática*

Para la determinación de la actividad enzimática se utilizó el mismo método para las dos fuentes de peroxidasa, en donde una unidad de actividad enzimática (AE) se define como la cantidad de enzima que produce 1 mmol en 1 min, referido a 1 mL de preparado enzimático o 1 mg de proteína (actividad específica) (Marquéz y Vázquez, 1999). La AE también se define como la cantidad de enzima que convierte 1 mol de peróxido de hidrógeno por minuto a pH 7.4 y 25°C (Pramparo, 2008). Para la determinación de la actividad enzimática se utilizó el método de la 4-aminoantipirina, la cual consiste en una valoración colorimétrica, utilizando fenol 0.2 M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2x10<sup>-2</sup> M como sustratos y 4-aminoantipirina 4.8 x 10<sup>-2</sup> M como cromógeno y una solución de buffer de fosfatos a pH 7.4. La determinación se realizó mediante un espectrofotómetro UV-vis a una longitud de onda de 510 nm. Para determinar la actividad enzimática por volumen o total se utilizó la siguiente ecuación.

$$\text{Actividad volumétrica: } (A_2 - A_1)/(t_2 - t_1) * V_e / (\epsilon)(d)(V_m) \quad \text{Ec. 3.2}$$

**Donde:**

A<sub>2</sub>: Absorbancia final

A<sub>1</sub>: Absorbancia inicial.

t<sub>2</sub>: Tiempo final

t<sub>1</sub>: Tiempo inicial

V<sub>e</sub>: Volumen de ensayo

ε: Constante molar de desaparición de la 4-aminoantipirina.

D: Distancia que atraviesa el haz de luz por la celda.

V<sub>m</sub>: Volumen de la muestra

En la Tabla 3.4 se resumen las cantidades de los reactivos utilizados para la determinación de la actividad enzimática de la peroxidasa. El cambio de absorbancia debido a la reacción se mide a una longitud de onda de 510 nm durante 1 min.

**Tabla 3.4.** Cantidades de los reactivos utilizados para la determinación de la actividad peroxidasa mediante el método de 4-aminoantipirina a una  $\lambda$  de 510 nm

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración de ensayo (M)</b>	<b>Cantidad (mL)</b>
<b>Amortiguador de fosfato 0.1 M, pH 7.0</b>	0.1 M	2.100
<b>Fenol</b>	0.2 M	0.150
<b>4-Aminoantipirina</b>	$4.8 \times 10^{-2}$ M	0.150
<b>Solución de enzima</b>	-	0.200
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	$2 \times 10^{-3}$	0.300
<b>Volumen Total</b>		2.900

### 3.6 *Diseño de experimentos*

El diseño de experimentos es la aplicación del método científico para generar conocimiento acerca de un sistema o proceso. Esta herramienta es un conjunto de técnicas estadísticas y de ingeniería, que permiten lograr la máxima eficiencia en los procesos con el mínimo costo. El diseño de experimentos consiste en planear un conjunto de pruebas experimentales, de tal manera que los datos generados puedan analizarse estadísticamente para obtener conclusiones válidas y objetivas acerca del sistema o proceso en estudio (Gutiérrez y Salazar, 2004).

En la fase 4, se llevó a cabo un análisis estadístico factorial de cribado  $2^6$ , mediante el programa Statgraphics para optimizar el proceso. Se realizaron 70 pruebas experimentales incluyendo 6 puntos centrales, con 6 factores experimentales temperatura, pH, tiempo de contacto, dosis de enzima, dosis de peróxido de hidrógeno, y concentración del colorante. Las pruebas fueron totalmente aleatorias. En la Tabla 3.5 se muestran los factores que intervienen en el análisis factorial como son la temperatura, pH, tiempo de contacto, dosis de la enzima, dosis de peróxido y la concentración del colorante fueran las mismas condiciones para las dos fuentes de peroxidasa del residuo industrial de soya y para la peroxidasa del chayote.

**Tabla 3.5.** Factores de operación para el tratamiento del colorante azul directo 2 para las dos fuentes de peroxidasa

<b>Factores</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Unidades</b>	<b>Continuo</b>
<b>Temperatura</b>	25.0	50.0	°C	Si
<b>pH</b>	3.5	7.5	Unidades	Si
<b>Tiempo de contacto</b>	2.0	6.0	Horas	Si
<b>Dosis de enzima</b>	1000.0	2000.0	microlitros	Si
<b>Dosis de peróxido</b>	1000.0	2000.0	microlitros	Si
<b>Colorante</b>	10.0	60.0	mg/L	Si

### 3.7 Pruebas de toxicidad Microtox®

Las prueba de toxicidad se llevó a cabo empleando Microtox® Azure Ambiental. El reactivo es una preparación liofilizada de un cepa especialmente seleccionada de la bacteria marina *Vibrio fischeri* (antes conocido como *Photobacterium phosphoreum*, NRRL número B-11177). En la prueba se utilizó Fenol como compuesto de referencia (Fenol 100 mg/L; UT=3; EC<sub>50</sub>= 23 mg/L). La prueba de toxicidad se llevó a cabo de las muestras al inicio y final de la cinética para obtener la EC<sub>50</sub>. La toxicidad se expresa en unidades de toxicidad (UT), en donde  $UT = 100/EC_{50}$ . (Blaise y Férard, 2005; Lapertot, 2008).

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Obtención de las enzimas peroxidasas de las fuentes a estudiar

#### 4.1.1 Obtención de un concentrado de peroxidasas de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.).

La variedad no espinosa del chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) fue la utilizada para la obtención de las peroxidasas. El tamaño promedio de los frutos fue entre los 10 y 20 cm de longitud, cuidando que no presentarán manchas de color café o daño en los mismos. En la (Figura 4.1) se presentan ejemplares de dicho fruto.



**Figura 4.1.** Fruto de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) variedad no espinosa.

#### 4.1.2 Obtención del zumo de chayote

Para la obtención del zumo de chayote a los frutos se les removió la semilla (Figura 4.2) y una vez obtenido éste fue licuado y centrifugado, presentó un color verde y después de centrifugado se tornó verde claro transparente. El pH determinado fue de 6.8.



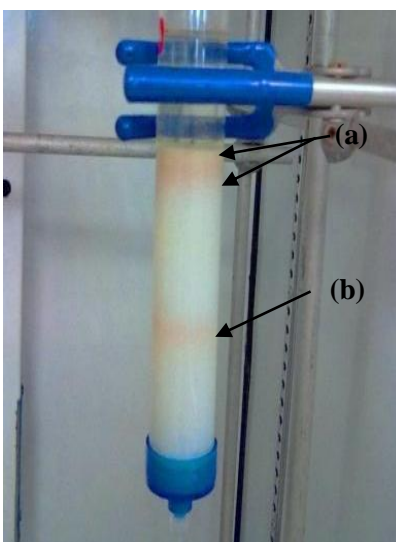
**Figura 4.2.** Cortes del fruto del chayote para la remoción de la semilla para la obtención del zumo

### 4.1.3 Diálisis del zumo del chayote

Después de centrifugado el dializado presentó un color amarillo-verdoso y se estabilizó el pH a 4.5.

### 4.1.4 Obtención de un concentrado de peroxidasa del chayote

Una vez concluida la entrada de los 900 mL del extracto de chayote dializado y centrifugado al intercambiador, se obtuvieron tres bandas cromatográficas, dos de ellas de color café localizadas en la parte superior del intercambiador (a) CM-52 y otra de color rojiza en la parte inferior (b) (Figura 4.3). Durante el desarrollo de la elución isocrática con el amortiguador de AcNa/HAc 1M las bandas se fueron desplazando hasta unirse. A las fracciones colectadas una vez realizado el ensayo de actividad enzimática para peroxidasa se descartados los 50 mL iniciales y las que fueron positivas a éste se unieron para así obtener el concentrado de peroxidasa de chayote. Dicho concentrado presentó un color amarillo-rojizo (Figura 4.4), un volumen de 60 mL y una actividad enzimática entre los 20 a 30 U/L.



**Figura 4.3.** Cromatografía de intercambio catiónico en CM-52 del zumo de chayote dializado y centrifugado durante el proceso de elución con el amortiguador AcNa/HAc 1M, pH 5.0.





**Figura 4.4.** Concentrado de peroxidasas de chayote obtenido de la cromatografía de intercambio catiónico en CM-52, eluída con el amortiguador 1M de AcNa/HAc pH 5.0 y con una actividad entre 20 y 30 U/L

## ***4.2 Obtención de un concentrado del residuo industrial de soya***

### ***4.2.1 Descripción del residuo industrial de soya***

Se realizó una investigación de qué industrias utilizan soya en sus procesos de producción, con el objetivo de utilizar sus residuos como fuente de peroxidasa. La industria que se seleccionó fue UNILEVER ya que cuenta con una planta para la producción del jugo ADES el cual es elaborado con jugo de soya. En este proceso se genera un residuo con aspecto de masa y alto contenido fibroso el cual se estima que aún tiene un alto contenido de proteínas (Figura 4.5).



**Figura 4.5.** Residuo industrial de soya

Los resultados obtenidos para la obtención del concentrado de peroxidasas del residuo industrial de soya tomando como base lo reportado por Becerra-Cano (2012) se presentan a continuación.

#### ***4.2.2 Obtención del extracto enzimático del residuo industrial de soya***

Transcurrido el tiempo de agitación del residuo acuoso la muestra fue ligeramente densa de fácil manipulación, color amarillento. Después de centrifugado el sobrenadante presentó un color lechoso y una actividad de 0.11 U/mL, mientras que el sólido obtenido fue descartado.

#### ***4.2.3 Diálisis del zumo del residuo industrial de soya***

El extracto acuoso del residuo de soya después de dializado presentó un sedimento de color blanquizco en el fondo de la bolsa de la membrana de diálisis (Figura 4.6) y una vez centrifugado el sólido obtenido presentó una consistencia viscosa que fue separado del sobrenadante y descartado

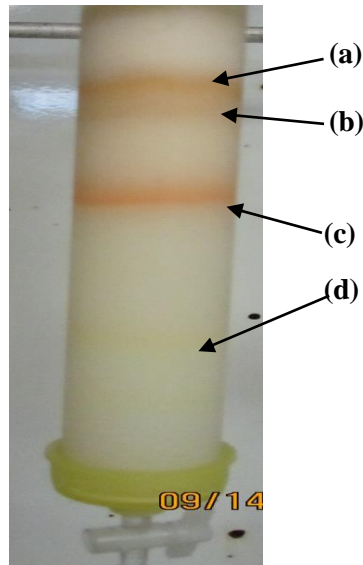


**Figura 4.6.** Extracto acuoso del residuo de soya industrial dializado en amortiguador de AcNa/HAc 10 mM, pH 4.5 durante 20 h a 4 °C.

#### ***4.2.4 Obtención de un concentrado de peroxidasas del residuo industrial de soya***

Después de haber entrado 200 mL del extracto acuoso dializado a través del intercambiador DE-53, se observó la formación de una banda cromatográfica, y concluidos los 500 mL, finalmente se obtuvieron 4 bandas cromatográficas (Figura 4.7). En la parte superior de la

cama del intercambiador se obtuvo una de color café intenso (a), otra muy cercana a ésta de tonalidad rosa claro (b), una tercera banda en color salmón rojizo (c), y en la parte inferior de la columna una de color amarillo muy tenue (d).

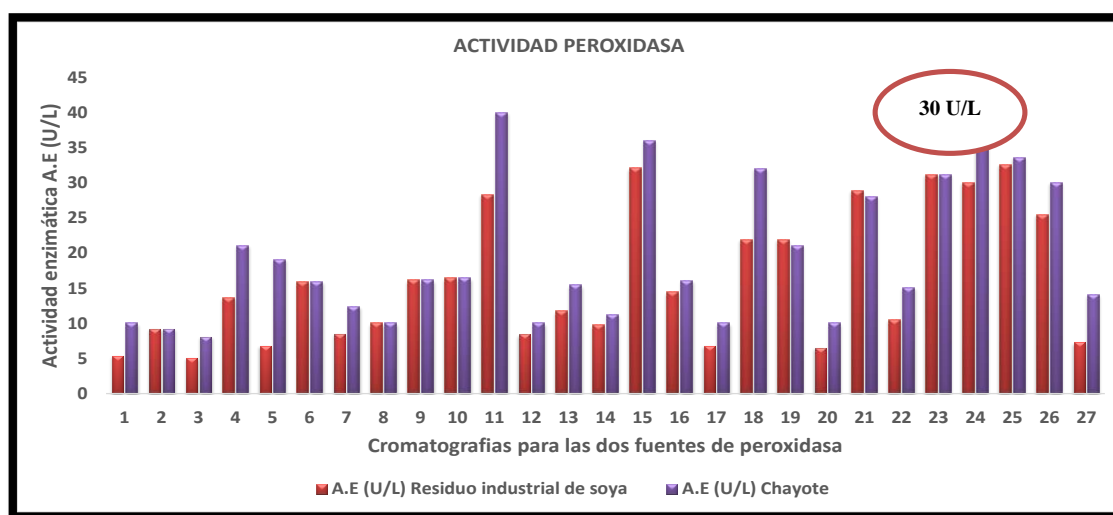


**Figura 4.7.** Bandas cromatográficas obtenidas del extracto acuoso del residuo de soya industrial dializado y centrifugado: (a) café intenso (b) rosa claro (c) salmón rojiza (d) amarillo muy tenue

Durante la elución isocrática las bandas se fueron desplazando hasta unirse en una sola y de las fracciones obtenidas aquellas que resultaron positivas al ensayo de actividad peroxidasa y con mayor valor fueron unidas para constituir el concentrado de peroxidasa del residuo industrial de soya. Éste presentó un color amarillo claro, la actividad determinada fue entre 20 y 30 U/L.

#### 4.2.5 Actividades enzimáticas para las dos peroxididas

Una unidad de actividad enzimática (símbolo U) es la cantidad de enzima que en una reacción enzimática cataliza la conversión de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto. Se utiliza también en combinación con otras unidades (U/mg de proteína o U/mL) para señalar, respectivamente, la actividad enzimática específica o la concentración de actividades, se obtuvieron actividades enzimáticas de 20 a 30 U/L. Se realizaron 27 cromatografías hasta encontrar la actividad enzimática deseada de 20 a 30 U/L en promedio ya que los primeros lotes de soya tenían actividad enzimática relativamente bajas entre 8 a 12 U/L para poder realizar la parte del tratamiento con el colorante como se describe en la (Figura 4.8).



**Figura 4.8.** Actividad enzimática para las dos fuentes de peroxidasa

En la Figura 4.9 se presenta el vire de la actividad enzimática para la peroxidasa de la soya teniendo entre 8 a 12 U/L de actividad peroxidasa y en la (Figura 4.10) el vire de la actividad enzimática del chayote de 20 a 30 U/L de actividad enzimática.



**Figura 4.9.** Actividad enzimática entre 8 a 12 U/L para la peroxidasa de soya



**Figura 4.10.** Actividad enzimática de 20 a 30 U/L para la peroxidasa del chayote

### 4.3 Resultados del diseño estadístico

#### 4.3.1 Diseño experimental para la decoloración del colorante azul directo 2 con tratamiento enzimático.

El diseño estadístico analizado por el programa Statgraphics es una herramienta que nos muestra las diferentes formas de evaluar el análisis. Mediante este diseño de experimentos se pueden contrastar todas las posibles combinaciones de los factores que se van a evaluar, para así reducir el tiempo de experimentación. La metodología de este diseño experimental es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas para modelar y analizar problemas en los que una variable de interés es influenciada por otras. El diseño arroja el siguiente análisis de trabajo (Anexo 1). En donde se tienen 70 bloques con distintas combinaciones en donde el programa estadístico evalúa todos los factores como son: temperatura, pH, tiempo de contacto, dosis de enzima, dosis de peróxido y concentración del colorante azul directo 2. Las pruebas se realizaron en matraces erlenmeyer de 50 mL con un volumen útil de 30 mL de agua artificialmente preparada con el colorante azul directo 2 en concentraciones de 10 a 60 mg/L. En la (Figura 4.11), se presenta el colorante antes del tratamiento enzimático y en la (Figura 4.12), se presenta después del tratamiento enzimático, en la mezcla de la reacción se realizó utilizando un agitador magnético a 150 rpm. De acuerdo al tiempo de reacción cada 10 min fueron tomadas las muestras para realizar un monitoreo con un espectrofotómetro de absorción UV-vis.



**Figura 4.11.** Colorante azul directo 2 antes del tratamiento enzimático.



**Figura 4.12.** Colorante azul directo 2 después del tratamiento enzimático.

Después de las pruebas realizadas se obtuvieron los siguientes resultados con las posibles combinaciones de los factores evaluados, siendo cinco los tratamientos experimentales, en resumen del diseño experimental con la enzima peroxidasa del residuo industrial de soya en la Tabla 4.1 se obtuvo un 78.8% de decoloración para el colorante azul directo 2, a una temperatura de 25°C, con un pH de 7.5, con un tiempo de contacto de 6 h, con 2000 y 2000 µL de enzima y de peróxido de hidrógeno al 12 mM, a una concentración de colorante de 60 mg/L. Con la enzima peroxidasa del chayote se obtuvo un 85.4% de decoloración para el colorante azul directo 2, a una temperatura de 25°C, con un pH de 3.5, con un tiempo de contacto de 6 h, con 1000 y 1000 µL de enzima y de peróxido de hidrógeno al 12 mM, a una concentración de colorante de 10 mg/L.

**Tabla 4.1.** Primera posible solución de tratamiento a 25°C con 6 h de tiempo de contacto enzima- peróxido

<b>Bloques</b>	<b>Temperatura</b>	<b>pH</b>	<b>Tiempo de contacto</b>	<b>Dosis de enzima</b>	<b>Dosis de peróxido</b>	<b>Colorante</b>	<b>Decoloración enzima (soya)</b>	<b>Decoloración enzima (chayote)</b>
	°C	unidades	horas	µL	µL	mg/L	%	%
<b>1</b>	25	7.5	6	1000	2000	60	41.9	61.3
<b>3</b>	25	7.5	6	2000	1000	60	50.6	67
<b>9</b>	25	3.5	6	2000	1000	10	42.8	46.3
<b>14</b>	25	7.5	6	2000	2000	60	<b>78.8</b>	81.5
<b>17</b>	25	3.5	6	1000	2000	10	46.9	52.9
<b>18</b>	25	7.5	6	2000	1000	10	51.9	82.6
<b>19</b>	25	3.5	6	2000	2000	10	46	80.5
<b>24</b>	25	7.5	6	1000	2000	10	40.8	52.4
<b>28</b>	25	3.5	6	1000	2000	60	40.8	67.5
<b>31</b>	25	7.5	6	2000	2000	10	43.7	44
<b>40</b>	25	3.5	6	2000	2000	60	47.4	81.8
<b>43</b>	25	3.5	6	1000	1000	10	56.2	<b>85.4</b>
<b>46</b>	25	7.5	6	1000	1000	10	41.6	84.7
<b>54</b>	25	7.5	6	1000	1000	60	54.3	70.6
<b>69</b>	25	3.5	6	1000	1000	60	35.7	56.2
<b>70</b>	25	3.5	6	2000	1000	60	62.7	56.2

Con la enzima peroxidasa del residuo industrial de soya se obtuvo un 50.4% de decoloración para el colorante azul directo 2, a una temperatura de 25°C, con un pH de 7.5, con un tiempo de contacto de 2 h, con 2000 y 2000 µL de enzima y de peróxido de hidrógeno al 12 mM, a una concentración de colorante de 60 mg/L. Con la enzima peroxidasa del chayote se obtuvo un 86.1% de decoloración para el colorante azul directo 2, a una temperatura de 25°C, con un pH de 3.5, con un tiempo de contacto de 2 h, con 1000 y 2000 µL de enzima y de peróxido de hidrógeno al 12 mM, a una concentración de colorante de 60 mg/L. Se resumen en la (Tabla 4.2).

**Tabla 4.2.** Segunda posible solución de tratamiento a 25°C con 2 h de tiempo de contacto enzima- peróxido

Bloques	Temperatura	pH	Tiempo de contacto	Dosis de enzima	Dosis de peróxido	Colorante	Decoloración enzima (soya)	Decoloración enzima (chayote)
	°C	unidades	horas	µL	µL	mg/L	%	%
<b>6</b>	25	3.5	2	2000	2000	10	38.5	76.6
<b>8</b>	25	3.5	2	1000	1000	60	36.7	83.2
<b>13</b>	25	7.5	2	2000	2000	10	35.2	77.3
<b>15</b>	25	7.5	2	1000	2000	10	46.2	15
<b>21</b>	25	3.5	2	1000	2000	60	33.2	<b>86.1</b>
<b>22</b>	25	3.5	2	1000	1000	10	43.4	82.2
<b>23</b>	25	7.5	2	2000	1000	10	11.2	31.4
<b>29</b>	25	7.5	2	1000	1000	10	46	40.5
<b>32</b>	25	3.5	2	2000	1000	10	47	45
<b>42</b>	25	3.5	2	1000	2000	10	44.3	33.4
<b>48</b>	25	7.5	2	1000	1000	60	39.7	33
<b>49</b>	25	7.5	2	1000	2000	60	41.4	28.7
<b>55</b>	25	3.5	2	2000	2000	60	31.9	62.1
<b>66</b>	25	7.5	2	2000	2000	60	<b>50.4</b>	17.6
<b>68</b>	25	3.5	2	2000	1000	60	29.7	62.3

Con la enzima peroxidasa del residuo industrial de soya se obtuvo un 55.0% de decoloración para el colorante azul directo 2, a una temperatura de 50°C, con un pH de 3.5, con un tiempo de contacto de 2 h, con 2000 y 1000 µL de enzima y de peróxido de hidrógeno al 12 mM, a una concentración de colorante de 60 mg/L, estas mismas condiciones fueron también para la enzima del chayote con la cual se obtuvo un mayor porcentaje 85.9%. (Tabla 4.3).

**Tabla 4.3.** Tercera posible solución de tratamiento a 50°C con 2 h de tiempo de contacto enzima- peróxido

Bloques	Temperatura	pH	Tiempo de contacto	Dosis de enzima	Dosis de peróxido	Colorante	Decoloración enzima (soya)	Decoloración enzima (chayote)
	°C	unidades	horas	µL	µL	mg/L	%	%
<b>7</b>	50	3.5	2	2000	2000	10	47.7	36.4
<b>20</b>	50	3.5	2	2000	1000	60	<b>55</b>	<b>85.9</b>
<b>25</b>	50	3.5	2	1000	1000	10	45.7	76.6
<b>30</b>	50	3.5	2	1000	2000	60	51.7	59.0
<b>38</b>	50	7.5	2	2000	1000	10	54.4	31.8
<b>41</b>	50	3.5	2	1000	1000	60	48.5	70.4
<b>47</b>	50	7.5	2	1000	2000	10	51.4	64.8
<b>52</b>	50	3.5	2	2000	2000	60	51.6	84.2
<b>57</b>	50	7.5	2	2000	2000	10	48.8	43.5
<b>58</b>	50	3.5	2	2000	1000	10	53.3	50.3
<b>59</b>	50	3.5	2	1000	2000	10	39.4	50.7
<b>61</b>	50	7.5	2	2000	1000	60	45.3	57.4
<b>62</b>	50	7.5	2	2000	2000	60	43.9	69.1
<b>63</b>	50	7.5	2	1000	1000	60	42.6	81
<b>64</b>	50	7.5	2	1000	2000	60	44.9	56.9



Con la enzima peroxidasa del residuo industrial de soya se obtuvo un 67.4% de decoloración para el colorante azul directo 2, a una temperatura de 50°C, con un pH de 7.5, con un tiempo de contacto de 6 h, con 1000 y 2000 µL de enzima y de peróxido de hidrógeno al 12 mM, a una concentración de colorante de 10 mg/L. Con la enzima peroxidasa del chayote se obtuvo un 89.6% de decoloración para el colorante azul directo 2, a una temperatura de 50°C, con un pH de 3.5, con un tiempo de contacto de 6 h, con 1000 y 2000 µL de enzima y de peróxido de hidrógeno 12 mM, a una concentración de colorante de 10 mg/L. Si bien se puede observar que es muy importante para las dos enzimas el ajuste del pH ya que se aplicaron los mismos factores solo el cambio de pH fue modificado dando mayores porcentajes de remoción la peroxidasa del chayote que trabajó con pH de 3.5. Los diferentes factores que intervienen se resumen en la (Tabla 4.4).

**Tabla 4.4.** Cuarta posible solución de tratamiento a 50°C con 6 h de tiempo de contacto enzima- peróxido

Bloques	Temperatura	pH	Tiempo de contacto	Dosis de enzima	Dosis de peróxido	Colorante	Decoloración enzima (soya)	Decoloración enzima (chayote)
	°C	unidades	horas	µL	µL	mg/L	%	%
<b>2</b>	50	3.5	6	1000	2000	10	48.1	<b>89.6</b>
<b>4</b>	50	7.5	6	2000	2000	10	49.6	60.7
<b>5</b>	50	3.5	6	2000	1000	10	50	87
<b>16</b>	50	3.5	6	1000	1000	10	44.3	87.7
<b>26</b>	50	7.5	6	1000	2000	60	43.6	53.6
<b>27</b>	50	7.5	6	2000	1000	60	51.1	51.1
<b>33</b>	50	3.5	6	2000	2000	10	56.2	89.2
<b>35</b>	25	7.5	2	2000	1000	60	50.8	73.9
<b>39</b>	50	3.5	6	2000	2000	60	55.5	55.5
<b>45</b>	50	7.5	6	1000	1000	10	58.5	72.2
<b>50</b>	50	7.5	6	1000	2000	10	<b>67.4</b>	70.9
<b>51</b>	50	3.5	6	1000	2000	60	55.4	80.6
<b>53</b>	50	3.5	6	2000	1000	60	55.3	82.2
<b>56</b>	50	3.5	6	1000	1000	60	50.3	84.2
<b>60</b>	50	7.5	6	2000	2000	60	66.5	85.8

Con la enzima peroxidasa del residuo industrial de soya se obtuvo un 38.9% de decoloración para el colorante azul directo 2, a una temperatura de 37.5°C, con un pH de 5.5, con un tiempo de contacto de 4 h, con 1500 y 1500 µL de enzima y de peróxido de hidrógeno al 12 mM, a una concentración de colorante de 35 mg/L, estas mismas condiciones fueron también para la enzima del chayote con la cual se obtuvo un mayor porcentaje 87.4%. (Tabla 4.5).

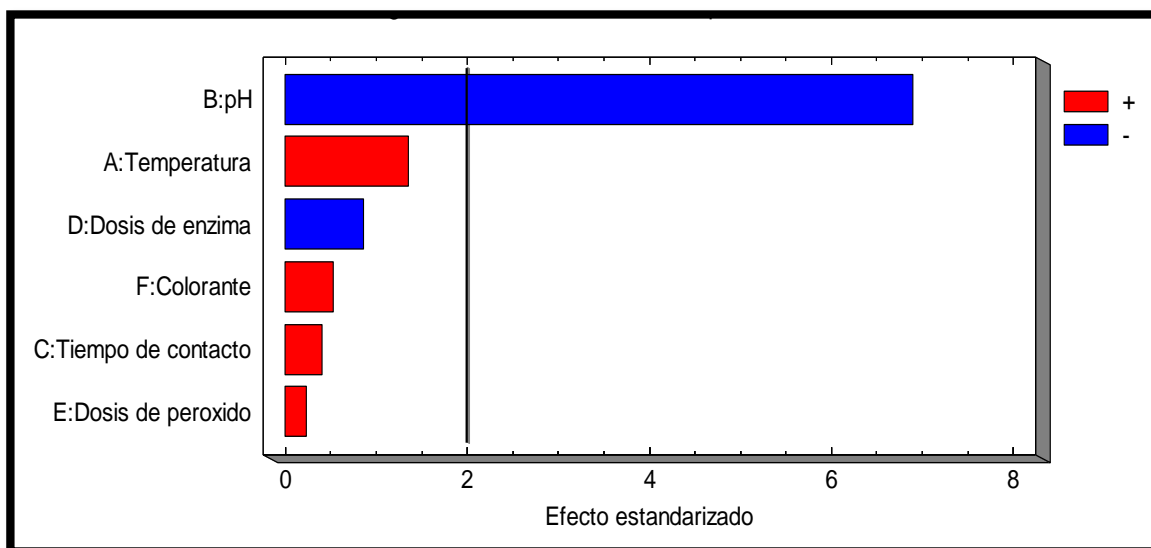
**Tabla 4.5.** Quinta posible solución de tratamiento a 37.5°C con 4 h de tiempo de contacto enzima- peróxido

<b>Bloques</b>	<b>Temperatura</b>	<b>pH</b>	<b>Tiempo de contacto</b>	<b>Dosis de enzima</b>	<b>Dosis de peróxido</b>	<b>Colorante</b>	<b>Decoloración enzima (soya)</b>	<b>Decoloración enzima (chayote)</b>
	°C	unidades	horas	µL	µL	mg/L	%	%
<b>11</b>	37.5	5.5	4	1500	1500	35	36.1	78.4
<b>12</b>	37.5	5.5	4	1500	1500	35	<b>38.9</b>	70.5
<b>34</b>	37.5	5.5	4	1500	1500	35	37.1	73.5
<b>36</b>	37.5	5.5	4	1500	1500	35	36	80.6
<b>37</b>	37.5	5.5	4	1500	1500	35	34	<b>87.4</b>
<b>65</b>	37.5	5.5	4	1500	1500	35	32.6	80.2

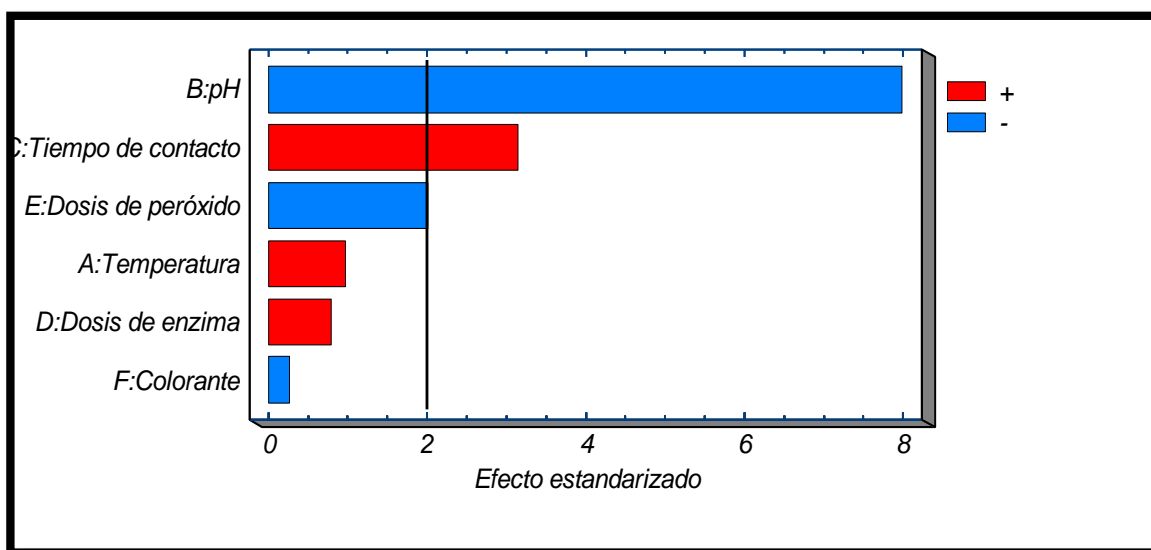
Una vez concluidas las lecturas de las pruebas experimentales para las dos fuentes de peroxidasa se calculó el porcentaje de decoloración que es la variable de interés obteniéndose los siguientes resultados:

#### 4.3.2 Diagrama de Pareto estandarizado para las dos fuentes de peroxidasa.

De acuerdo a la gráfica de Pareto estandarizado, la longitud de cada barra es proporcional al valor del estadístico-t calculado para el efecto correspondiente. Cualquier barra más allá de la línea vertical es estadísticamente significativa en el nivel de significancia, establecido en 5%. De acuerdo al análisis, solo uno fue el factor que causó efecto significativo en el tratamiento, el pH (Figura 4.13). Los factores y sus interacciones se encuentran graficados en orden descendente con relación al impacto con que estos afectan al porcentaje de decoloración. El diagrama de Pareto muestra, que el pH tiene efecto significativo para la enzima del residuo industrial de soya. En la (Figura 4.14) se presenta el diagrama de Pareto estandarizado para la peroxidasa del chayote el cual resultó que son dos los factores significativos el efecto del pH, y el tiempo de contacto son los factores que afectan el porcentaje de decoloración del colorante azul directo 2.



**Figura 4.13.** Diagrama de Pareto estandarizado para la decoloración del azul directo 2 con la enzima del residuo industrial de soya.

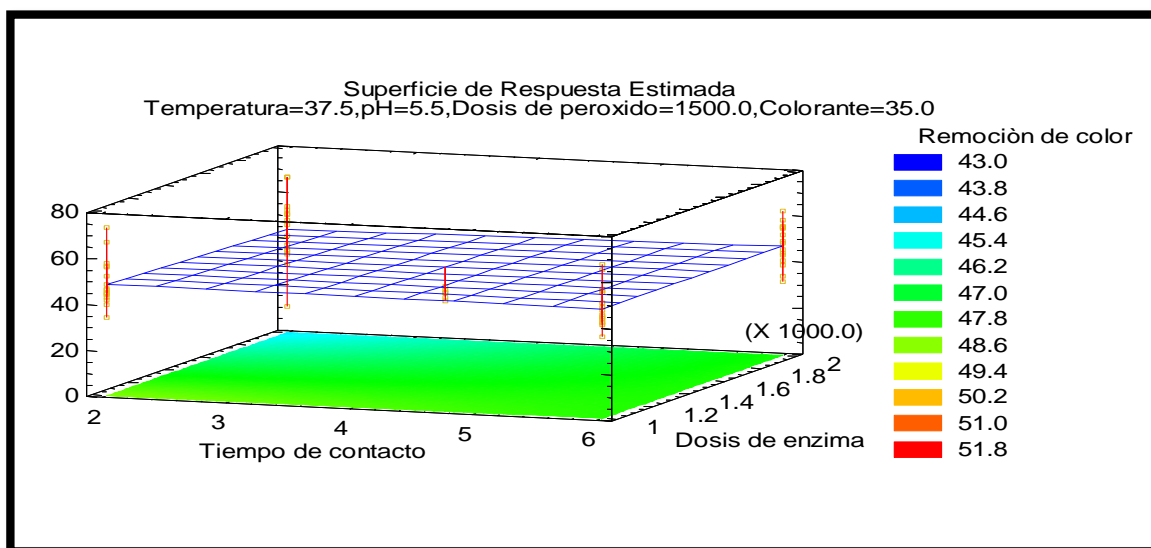


**Figura 4.14.** Diagrama de Pareto estandarizado para la decoloración del azul directo 2 mediante la enzima del chayote.

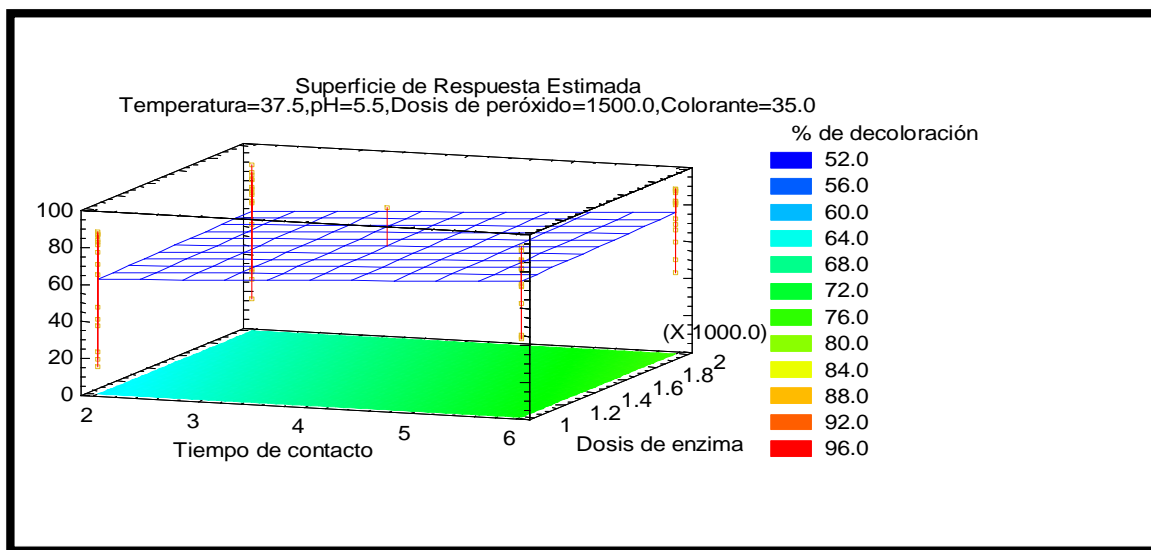
### 4.3.3 Optimización del tiempo de reacción

La eficiencia de decoloración del azul directo 2 está en función del tiempo de contacto con la enzima, como se observa en la (Figura 4.15). De acuerdo al diseño estadístico el tiempo óptimo para alcanzar la mayor eficiencia de decoloración para la peroxidasa del residuo industrial de soya es de 2 h alcanzando una eficiencia de 48.6%. (Marchis *et al.*, 2011) reportaron que utilizando la peroxidasa de soya en la degradación del colorante azul reactivo 21 (reactive blue 21), en un tiempo de reacción de 4 h obtuvieron porcentajes de remoción del 95-96%.

Sin embargo De Souza *et al.* (2007) reportaron que utilizando la peroxidasa del rábano picante (HRP) en el colorante (reactive blue 21), se obtienen porcentajes de remoción del 59% en solo 50 min del tiempo de reacción. Sin embargo para la peroxidasa del chayote de acuerdo al diseño estadístico el tiempo de contacto es de 6 h logrando porcentajes de decoloración hasta en un 64%. (Figura 4.16) (Villegas Rosas *et al.*, 1993) reporta que para los colorantes azul cibanon, azul cibracon, solofenil, azul erionyl y azul mariposa se lograron porcentajes de decoloración entre el 91 y 98.3% en un tiempo de contacto de 45 a 60 min. Además, se estudiaron muestras de aguas residuales provenientes de diferentes etapas del teñido de mezclilla, en las cuales se logró remover el colorante negro directo en porcentajes entre el 83.32 y el 92.83% durante un tiempo de contacto de 60 min, porcentajes muy similares en los encontrados en este trabajo para el colorante azul directo 2.



**Figura 4.15.** Optimización del tiempo de reacción para la decoloración del azul directo 2 con la enzima del residuo industrial de soya.



**Figura 4.16.** Optimización del tiempo de reacción para la decoloración del azul directo 2 con la enzima del chayote.

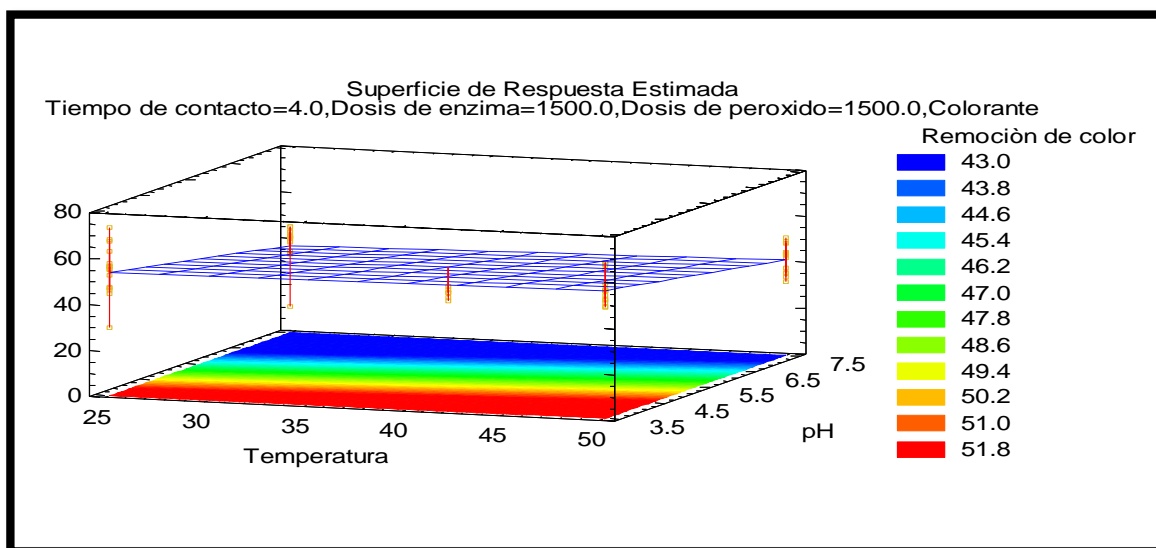
#### 4.3.4 Optimización de pH y temperatura óptima

La eficiencia de decoloración del azul directo 2 para la enzima peroxidasa del residuo industrial de soya está en función del pH y la temperatura, el diseño estadístico mostró que el proceso de decoloración es estrictamente dependiente del pH de la solución acuosa del colorante. El pH para obtener la mayor decoloración del colorante azul directo 2 fue de 3.5 logrando un porcentaje de decoloración del 73%. (Kalsoom *et al.*, 2013) reporta el pH óptimo para obtener la mayor decoloración es de 4 unidades y (Marchis *et al.*, 2011) 3.9 unidades lo cual pone de relieve la utilidad de esta enzima para degradar efluentes industriales que pueden ser muy ácidos de acuerdo a sus procesos de producción. Con respecto a la temperatura existen pocas investigaciones que estudien la temperatura óptima de una enzima específica, sin embargo es bien sabido que las proteínas y enzimas son sensibles a altas temperaturas ya que pueden desnaturalizarse y desactivarse, (Kalsoom *et al.*, 2013).

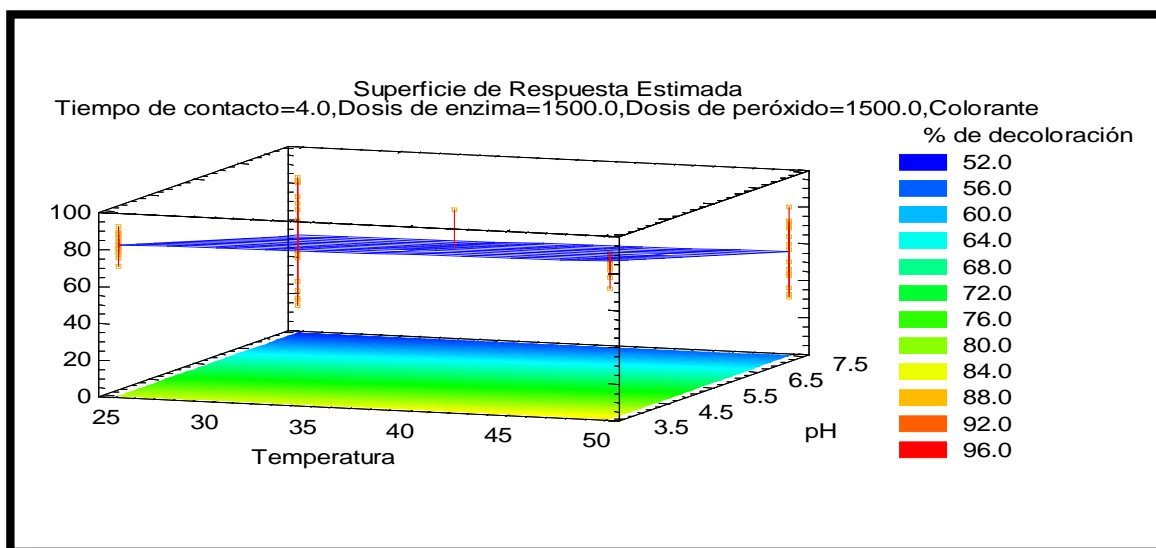
De acuerdo al diseño estadístico la temperatura óptima para alcanzar porcentajes de decoloración del 51 al 51.8% fue de 25°C, como se muestra en la (Figura 4.17). Estos resultados coinciden con (Kalsoom *et al.*, 2013), en donde logró decolorar en un 60% al colorante azul tripano a una temperatura de 25°C. Para la peroxidasa del chayote de acuerdo al diseño estadístico la temperatura de 50°C causa un aumento en la decoloración del 84%, con un pH de 3.5 como se muestra en la (Figura 4.18). Similares resultados fueron reportados por Kalsoom *et al.* (2013) y Marchis *et al.* (2011). En estudios anteriores han reportado que la enzima peroxidasa de soya es térmicamente estable a 90.5°C y 8 unidades de pH. (Villegas Rosas, 1993) reporta que para los colorantes azul cibanon, azul cibracon, solofenil, azul erionyl y azul mariposa se lograron porcentajes de decoloración entre el 91 y el 98.3% sin control del pH y a temperatura ambiente.

Además, se estudiaron muestras de aguas residuales provenientes de diferentes etapas del teñido de mezclilla, en las cuales se logró remover el colorante negro directo en porcentajes entre el 83.32 y el 92.83% sin control del pH ni temperatura. (Shi, 2007) reportan que el pH es un factor importante para la actividad de cualquier enzima y, en particular, para la peroxidasa del rábano picante logrando altos porcentajes de decoloración a pH de 6.6. La acción catalítica de las enzimas tiene lugar generalmente dentro de límites de pH relativamente estrechos. Cada reacción enzimática posee un pH óptimo, el cual depende de: los sustratos involucrados y de las condiciones de reacción. Un pH muy alto o muy bajo causará por lo general, una desnaturalización irreversible de la enzima. La actividad de las enzimas se ve afectada por la temperatura como cualquier reacción química. A temperaturas bajas, la velocidad de reacción es baja, y esta aumenta conforme aumenta la

temperatura, hasta el punto en que la enzima pueda ser desnaturalizada; entonces la velocidad baja considerablemente.



**Figura 4.17.** Optimización de temperatura y pH para la decoloración del colorante azul directo 2 con la enzima del residuo industrial de soya.

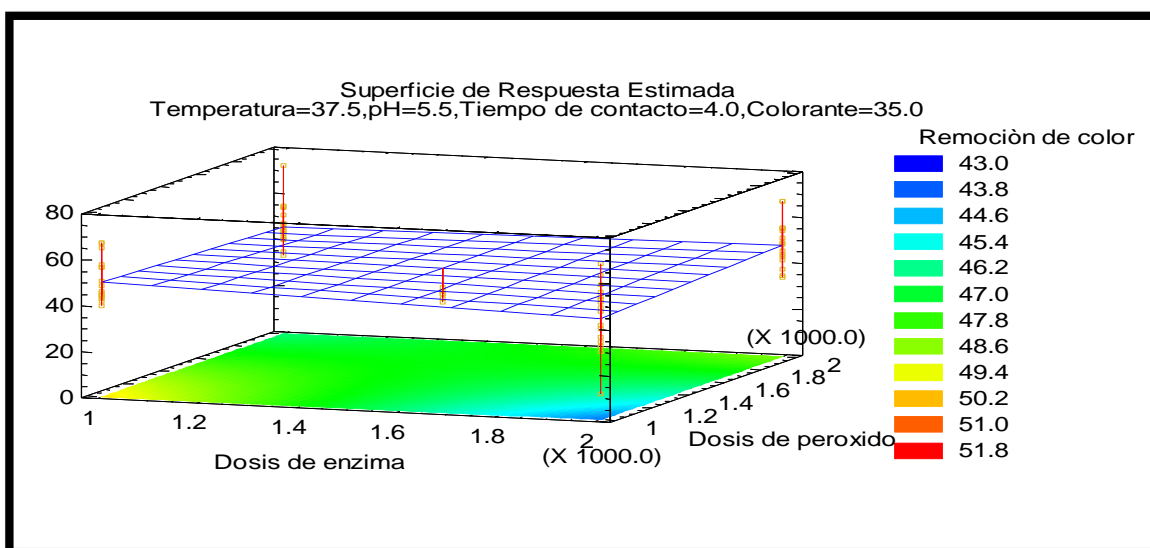


**Figura 4.18.** Optimización de temperatura y pH para la decoloración del colorante azul directo 2 con la enzima del chayote.

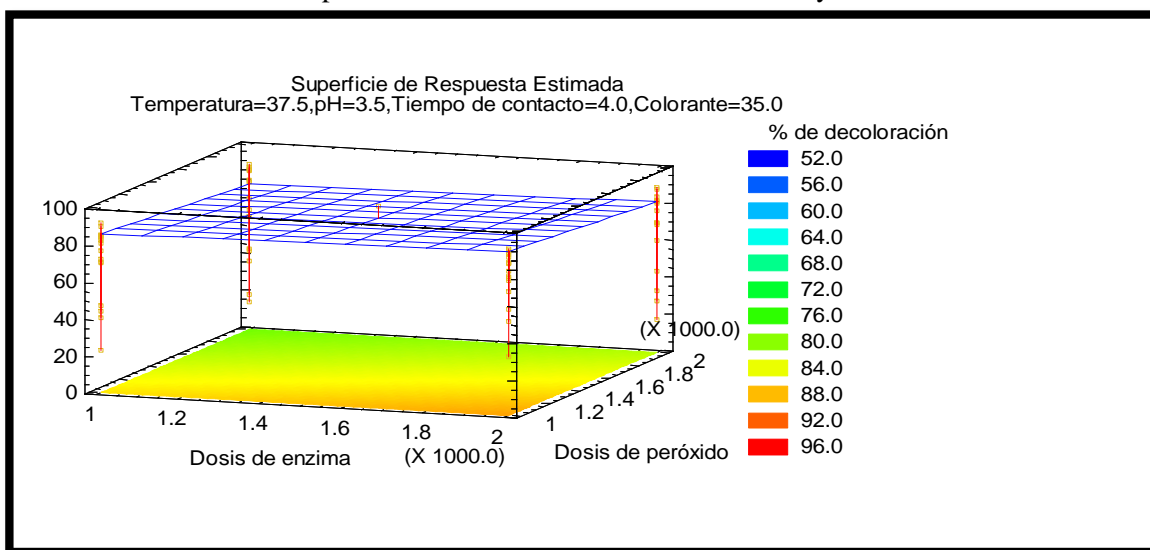
#### 4.3.5 Concentración óptima de $H_2O_2$

Habitualmente, las reacciones de oxidación con el peróxido de hidrógeno, se producen rápidamente en medio básico y de forma muy lenta si el pH es ácido. Pero debemos hacer notar que, en presencia de peroxidasas, el peróxido de hidrógeno actúa como oxidante de diferentes sustratos independientemente del pH del medio. El peróxido de hidrógeno actúa como un co-sustrato para activar la acción enzimática de la peroxidasa. Esto contribuye en el ciclo catalítico de las peroxidasas, donde inicialmente se oxida la enzima nativa para formar un intermediario enzimático el cual acepta los compuestos aromáticos para llevar a cabo su oxidación llegando a la formación de un radical libre. Por tal situación la dosis de peróxido juega un papel muy importante en las reacciones enzimáticas ya que al tener un exceso de este reactivo en la reacción puede llegar a causar inhibición en la actividad enzimática y cuando está presente en cantidades pequeñas puede ser un limitante en la velocidad de reacción muy probablemente debido a daños en la propia enzima. Esto muestra la importancia crítica de la optimización de las concentraciones de  $H_2O_2$  en estos enfoques de degradación de colorante a base de enzimas (Mohan *et al.*, 2005 y Silva *et al.*, 2012). En la (Figura 4.19) se observa que 2000  $\mu\text{L}$  es la dosis de  $H_2O_2$  en donde se obtiene la mayor actividad enzimática logrando decolorar un 50.2%. Concentraciones menores de 1000  $\mu\text{L}$  presentan una disminución en la velocidad de reacción. Por los resultados obtenidos, la concentración de  $H_2O_2$  no presenta un efecto significativo sobre la reacción catalizada por la enzima. Silva *et al.* (2012) reportan resultados similares obteniendo 100 mol/L, logrando porcentajes de decoloración del 57% utilizando peroxidasa del rábano picante en la (Figura 4.20) se observa que 1000  $\mu\text{L}$  es la dosis de  $H_2O_2$  en donde se obtiene la mayor actividad enzimática logrando decolorar al 88%. Concentraciones menores de 1000  $\mu\text{L}$  presentan una disminución en la velocidad de reacción.





**Figura 4.19.** Optimización de la dosis de enzima y peróxido para la decoloración del azul directo 2 para la enzima del residuo industrial de soya.



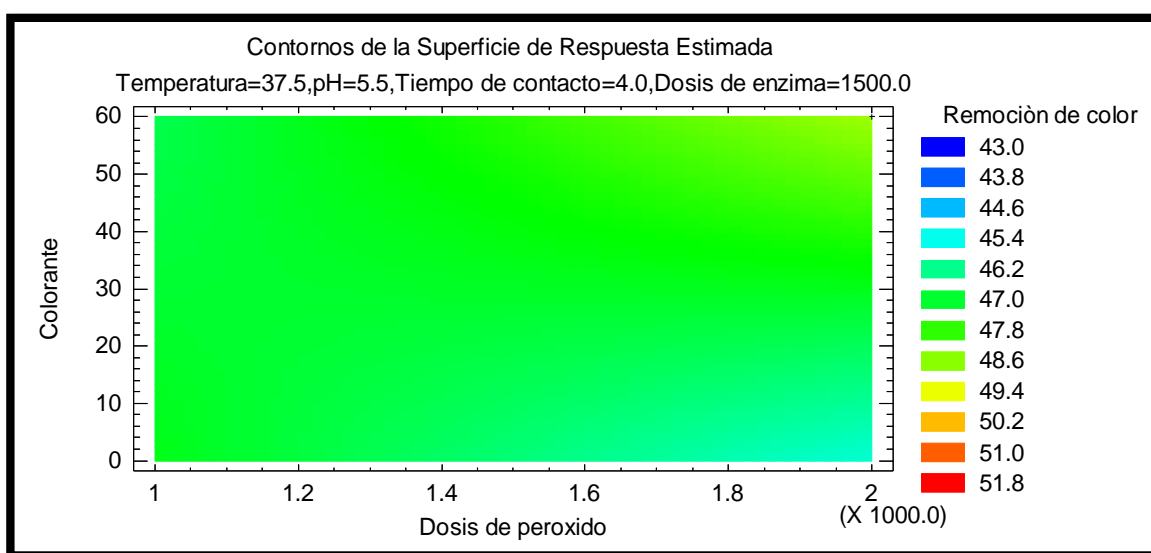
**Figura 4.20.** Optimización de la dosis de enzima y peróxido para la decoloración del azul directo 2 mediante la enzima del chayote.

#### 4.3.6 Concentración óptima de colorante

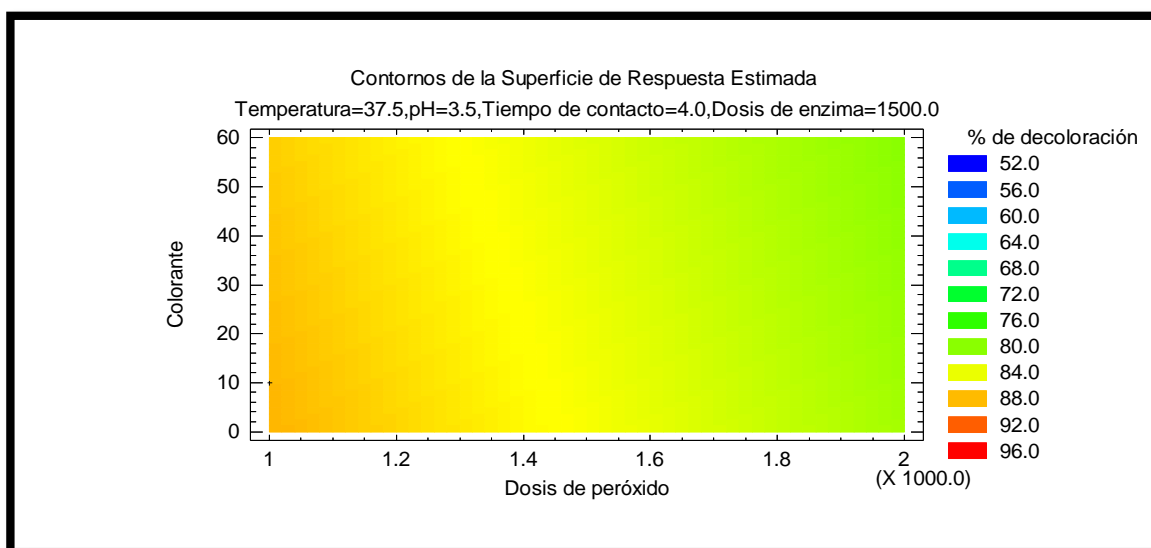
La concentración del sustrato presente en la fase acuosa es un factor clave el cual afecta la velocidad de oxidación catalizada por una enzima. (Silva *et al.*, 2012), los resultados se muestran en la (Figura 4.21) donde se observa que el mayor porcentaje de decoloración se obtiene a concentraciones mayores de 40 mg/L, logrando decolorar un 48.6% para la

peroxidasa del residuo industrial de soya resultados muy similares reporta (Marchis *et al.*, 2011) encontrando una decoloración del 85.7% del colorante reactivo azul remazol brillante (RBBR) a una concentración de 40 mg/L.

Mientras que para la peroxidasa del chayote (Figura 4.22) donde se observa que a concentraciones de colorante mayores de 50 mg/L se pueden logra una eficiencia del 88% de decoloración, ya que a concentraciones menores de 50 mg/L disminuye el porcentaje de decoloración. Silva *et al.* (2012) y Mohan *et al.* (2005) reportaron resultados similares en estudios de decoloración enzimática empleando peroxidasa del rábano picante concluyendo que a concentraciones menores de 30 mg/L la eficiencia de decoloración resulta baja. Esto es debido a la existencia de una relación óptima entre la concentración de enzima y sustrato para lograr la máxima actividad. Si la cantidad de enzima es mantenida constante y la concentración de sustrato es gradualmente incrementada la velocidad de reacción puede incrementar hasta alcanzar su máxima actividad.



**Figura 4.21.** Optimización dosis de enzima y peróxido para la decoloración del azul directo 2 mediante el residuo industrial de soya.



**Figura 4.22.** Optimización dosis de enzima y peróxido para la decoloración del azul directo 2 mediante la enzima del chayote.

#### 4.3.7 Optimización del proceso de decoloración

De acuerdo a los resultados obtenidos del diseño experimental, para lograr un porcentaje máximo de decoloración del colorante azul directo 2 del 73%, los valores óptimos encontrados para cada uno de los factores que influyen en el tratamiento se presentan en la (Tabla 4.6) para la peroxidasa del residuo industrial. Para optimizar la variable de respuesta de la peroxidasa del chayote, en la (Tabla 4.7) se muestra la combinación de los niveles y de los factores, la cual maximiza el porcentaje de decoloración para alcanzar porcentajes de remoción del 97%.

**Tabla 4.6.** Diseño óptimo del proceso de decoloración del azul directo 2 para la enzima del residuo industrial de soya.

Factores	Bajo	Alto	Sugerido por el diseño estadístico
Temperatura	25.0	50.0	25.0
pH	3.5	7.5	3.5
Tiempo de contacto	2.0	6.0	2.0
Dosis de enzima	1000.0	2000.0	1000.0
Dosis de peróxido	1000.0	2000.0	2000.0
Colorante	10.0	60.0	60.0

**Tabla 4.7.** Diseño óptimo del proceso de decoloración del azul directo 2 mediante la enzima del chayote.

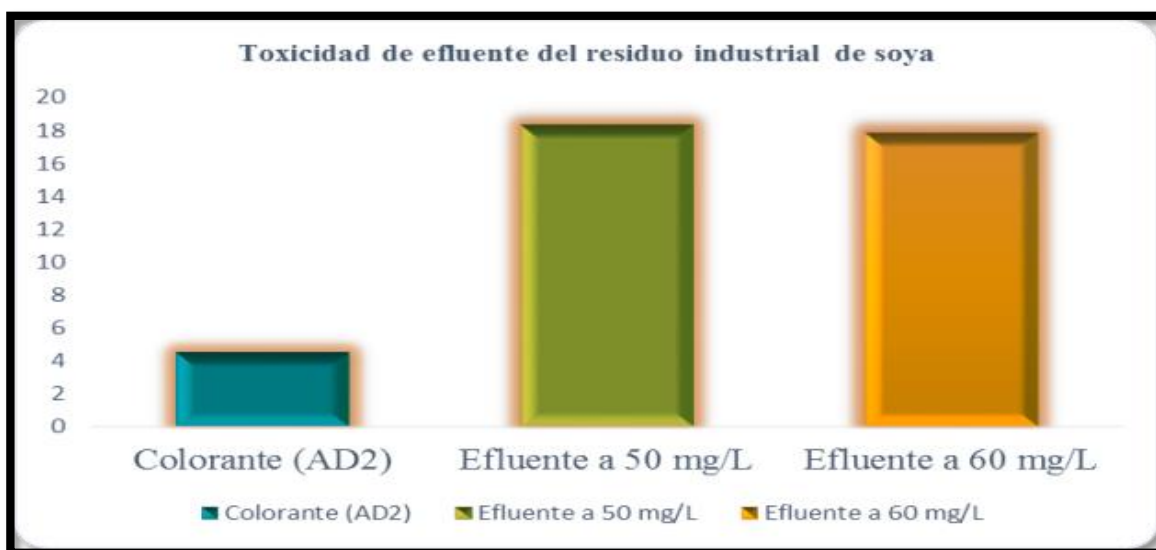
Factores	Bajo	Alto	Sugerido por el diseño estadístico
Temperatura	25.0	50.0	50.0
pH	3.5	7.5	3.5
Tiempo de contacto	2.0	6.0	6.0
Dosis de enzima	1000.0	2000.0	2000.0
Dosis de peróxido	1000.0	2000.0	1000.0
Colorante	10.0	60.0	10.0

#### 4.3.8 Pruebas de toxicidad para las dos fuentes de peroxidasa

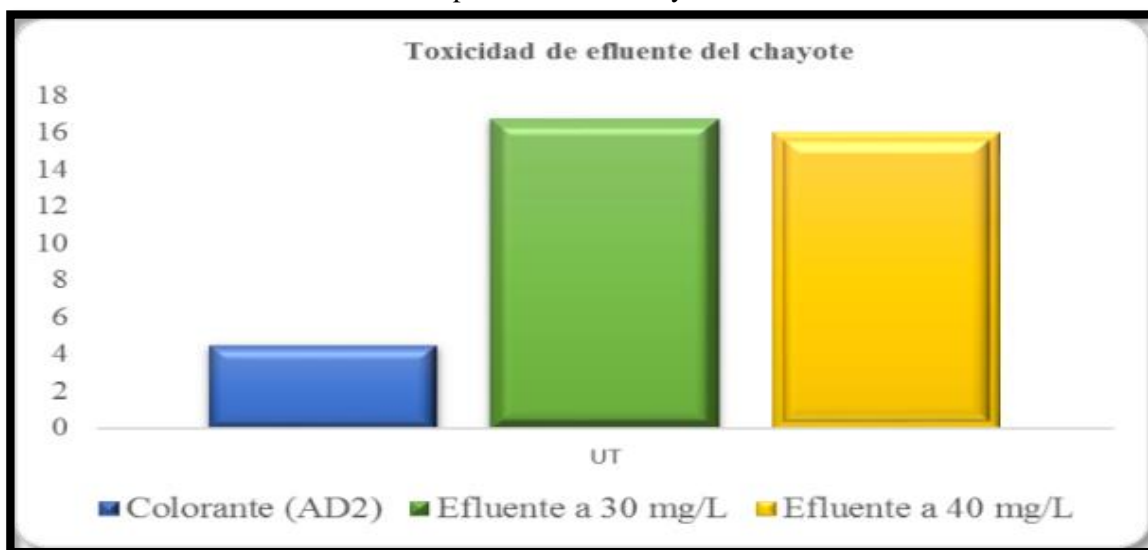
El estudio de toxicidad del antes y después del tratamiento enzimático del colorante azul directo 2 se realizó con el propósito de evaluar los productos generados de la reacción, los cuales de acuerdo al tipo de colorante, podrían resultar tóxicos. La prueba de toxicidad se realizó con el método microtox que consiste en poner en contacto a los organismos de prueba (bacterias *Photobacterium phosphoreum*, que emiten luz como parte de su metabolismo) con la muestra ambiental a diferentes concentraciones. La respuesta que se obtiene es que a mayor toxicidad de la muestra, la luz emitida por las bacterias disminuye. En la (Tabla 4.8) se presentan los resultados obtenidos de la prueba de toxicidad utilizando *Vibrio fischeri*. Se observa que el colorante sin tratamiento presenta una toxicidad de 4.4 UT. Sin embargo después del tratamiento a concentraciones de 30, 40, 50, 60 mg/L las unidades de toxicidad que presentaron un aumento 4 veces mayor que el colorante original. Este efecto puede ser atribuido a la formación de metabolitos que son más tóxicos que el propio colorante. Se conoce que los productos típicos de la degradación de los colorantes directos son bencidina y 4-aminobifenil, Sponza. (2005) que puede ocurrir en el tratamiento enzimático en las cuales son aminas aromáticas altamente tóxicas que pueden contribuir con el incremento de toxicidad. En la (Figura 4.23) se presentan los resultados de la toxicidad para la enzima peroxidasa del chayote y, en la (Figura 4.24) se presentan los resultados para la peroxidasa del residuo industrial de soya.

**Tabla 4.8.** Resultados de toxicidad utilizando (*Vibrio fischeri*)

	CE 50 (%)	Unidades de toxicidad (UT)
Colorante (AD2)	22.294	4.485
Efluente a 30 mg/L	5.297	16.758
Efluente a 40 mg/L	6.242	16.02
Efluente a 50 mg/L	5.461	18.311
Efluente a 60 mg/L	5.601	17.853



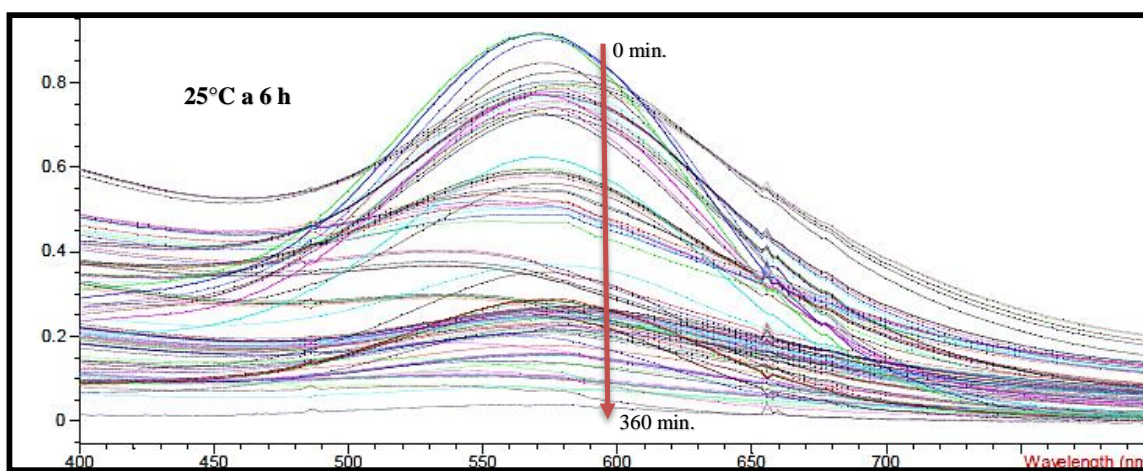
**Figura 4.23.** Toxicidad efluente de las muestras después del tratamiento enzimático con la enzima peroxidasa del chayote



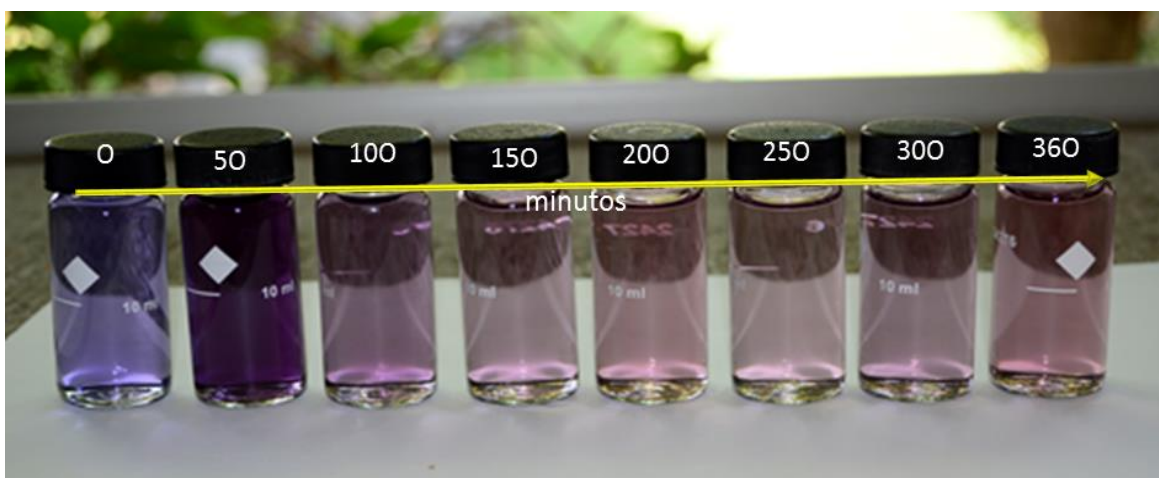
**Figura 4.24.** Toxicidad efluente de las muestras después del tratamiento enzimático con el residuo industrial de soya.

#### 4.3.9 Caracterización mediante espectroscopía UV-vis y seguimiento visual para las dos fuentes de peroxidasa

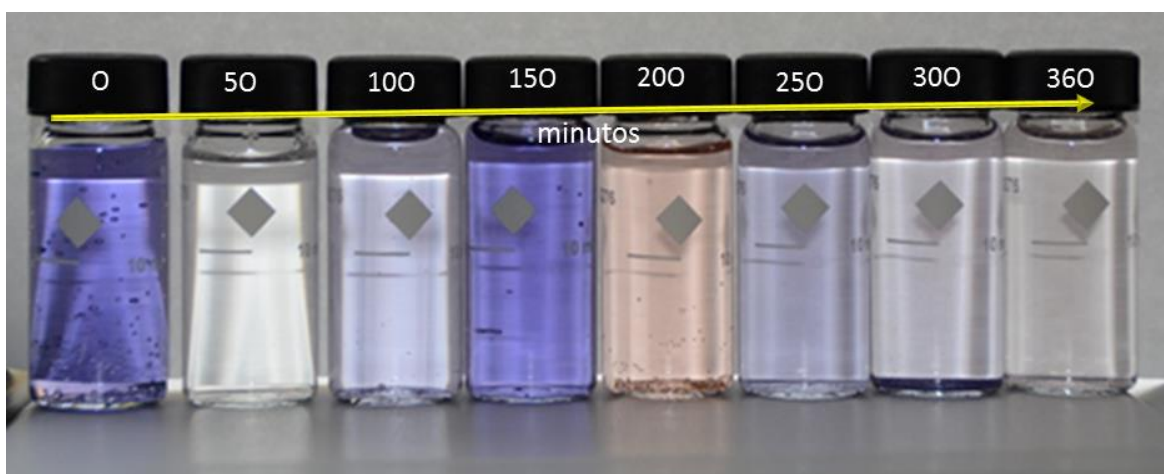
Se preparó una solución con el colorante azul directo 2 a concentraciones desde 10 hasta 60 mg/L. Posteriormente, se adicionó la cantidad de la solución de enzima y peróxido de hidrógeno necesario para lograr la máxima remoción del colorante, añadiendo alícuotas en un solo pulso al inicio del tratamiento. El monitoreo de los experimentos se realizó mediante la obtención de su espectro de absorción electrónica en el mismo intervalo de longitud de onda y cada 10 min fueron monitoreadas las pruebas experimentales durante 2, 4, y 6 h de tiempo de contacto. Una alícuota de 3.5 mL del colorante con cada uno de las concentraciones fue colocada en una celda de cuarzo y se le realizó su espectro absorción UV-vis en la región de 350 a 700 nm. Así mismo se realizó el seguimiento visual del antes y después del tratamiento enzimático. El diseño estadístico nos muestra 5 posibles soluciones para optimizar la decoloración del colorante azul directo 2. La primera fue de 6 h a 25°C, con concentración de colorante de 10 a 60 mg/L, con pH entre 3.5 a 7.5, con dosis de peróxido de hidrógeno y de enzima peroxidasa de 1000 a 2000  $\mu\text{L}$ . En la (Figura 4.25) se muestra el espectro de absorción UV-vis del colorante azul directo 2 con todos los bloques en la primera opción de tratamiento. Se puede observar que las bandas de absorción del colorante después del tratamiento enzimático ya no se observan, sin embargo, se presenta una banda muy ancha entre 500 y 650 nm lo que sugiere, que el colorante se ha transformado ya que el colorante inicialmente de color azul después del tratamiento enzimático se tornó a un color morado se toma para el seguimiento visual el bloque 43 para las dos enzimas peroxidasa (Figura 4.26) y cuenta con la presencia de partículas sólidas suspendidas, independientemente de que concentración se estaba estudiando (Figura 4.27)



**Figura 4.25.** Espectros de absorción UV-vis del tratamiento del colorante azul directo 2, al minuto 0 y al final del tratamiento enzimático de 360 min.



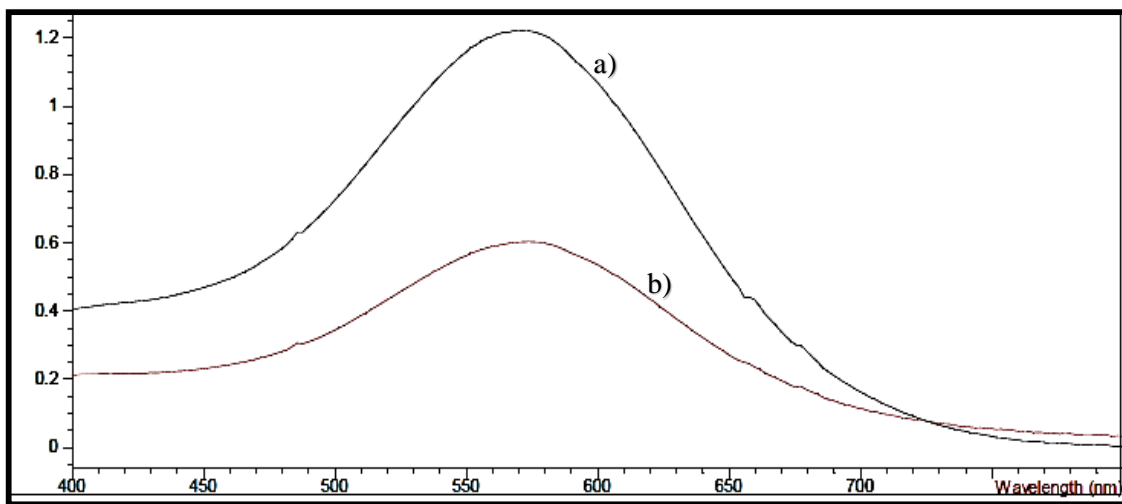
**Figura 4.26.** Seguimiento visual tomadas a diferentes intervalos de tiempos durante 360 min, (Bloque 43) para la decoloración del colorante azul directo 2 con la enzima peroxidasa del residuo industrial de soya en donde se obtuvo un 56.2% de decoloración en 6 h, con 25 °C, con una concentración de enzima y de peróxido de 2000  $\mu\text{L}$ , a pH de 3.5 con una concentración inicial de 10 mg/L de colorante.



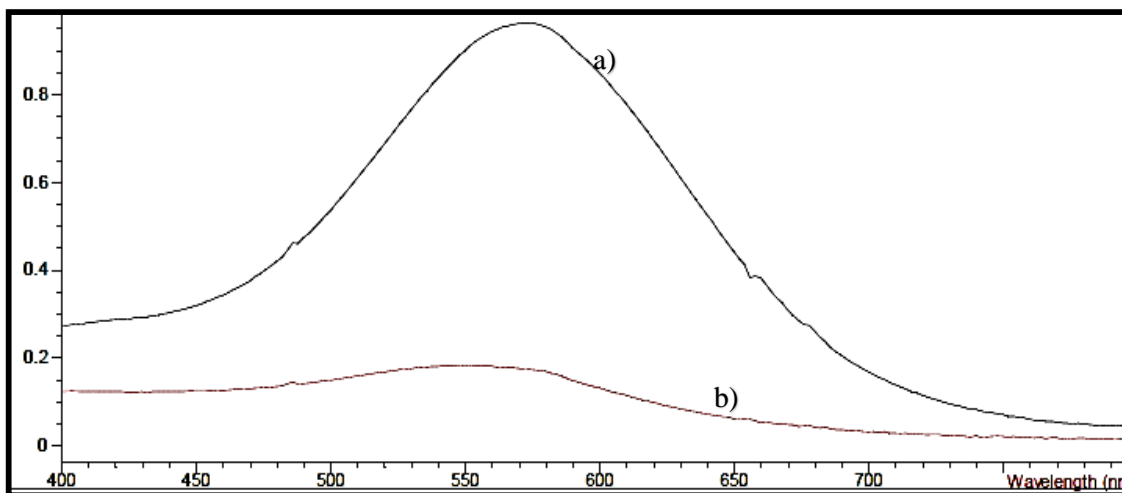
**Figura 4.27.** Seguimiento visual tomadas a diferentes intervalos de tiempos durante 360 min (Bloque 43) para la decoloración del colorante azul directo 2 con la enzima peroxidasa del chayote en donde se obtuvo un 85.4% de decoloración en 6 h, con 25 °C, con una concentración de enzima y de peróxido de 2000  $\mu\text{L}$ , a pH de 3.5 con una concentración inicial de 10 mg/L de colorante.



Las (Figura 4.28, Figura 4.29, Figura 4.30, Figura 4.31) muestran los espectros de absorción UV-vis del tratamiento enzimático del colorante azul directo 2, para los bloques 14, 19, 40, 43, los cuales se obtuvieron los mayores porcentajes de remoción para la enzima del residuo de soya entre 40 al 78% mientras que para la enzima del chayote los porcentajes de remoción se encontraron entre 80 al 81%.

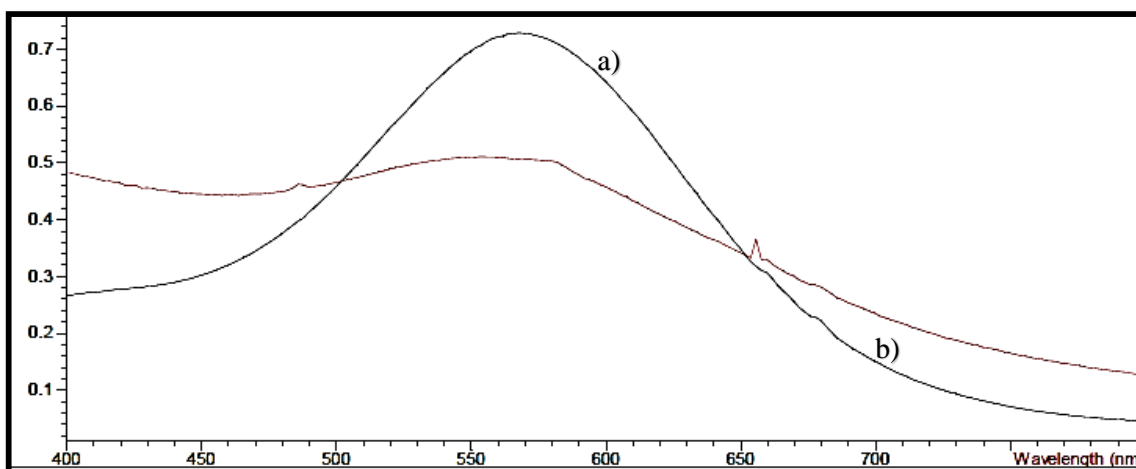


**Figura 4.28.** Colorante azul directo 2: a) sin tratamiento enzimático, y b) al término del tratamiento con un 78.8% de remoción, con la enzima de soya.

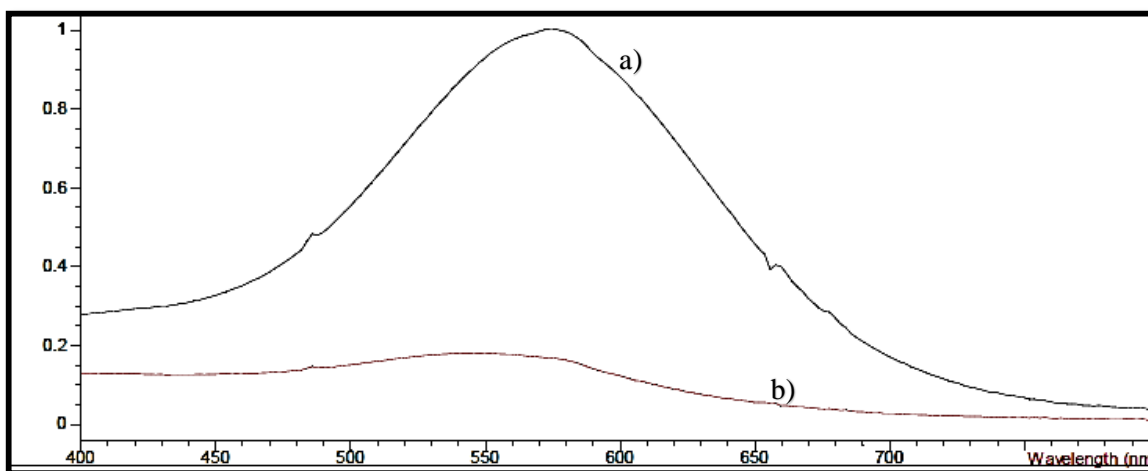


**Figura 4.29.** Colorante azul directo 2: a) sin tratamiento enzimático, y b) al término del tratamiento con un 81.5% de remoción, con la enzima del chayote.



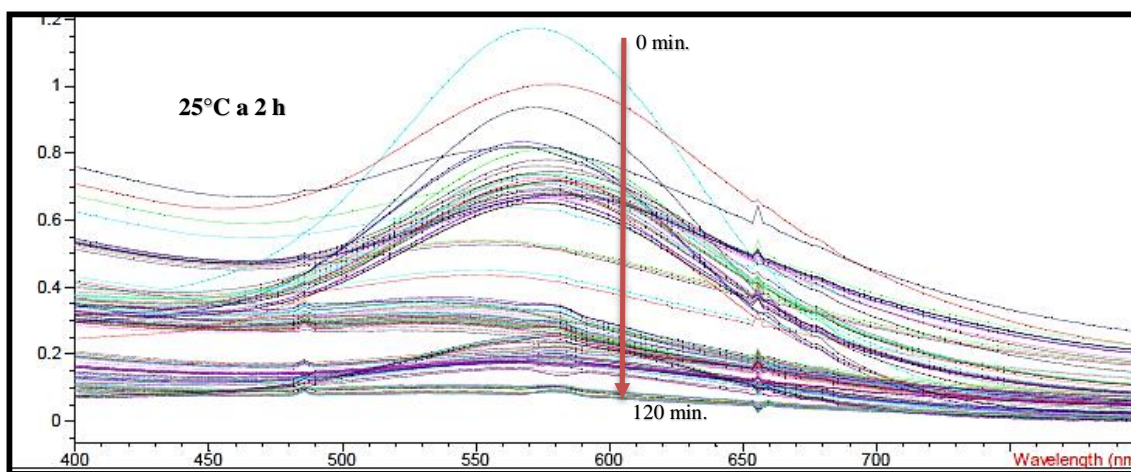


**Figura 4.30.** Colorante azul directo 2: a) sin tratamiento enzimático, y b) al término del tratamiento con un 46.0% de remoción, con la enzima de soya.

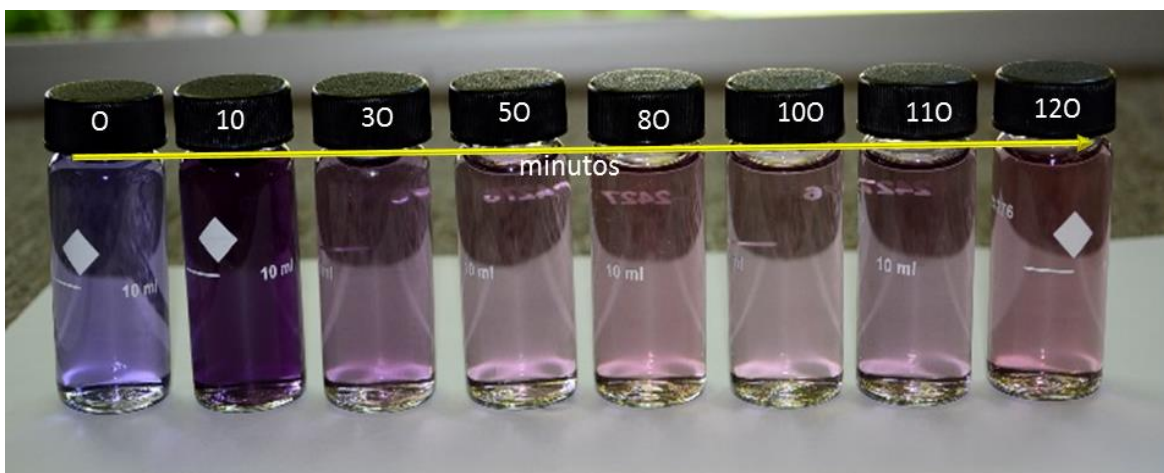


**Figura 4.31.** Colorante azul directo 2: a) sin tratamiento enzimático, y b) al término del tratamiento con un 81.8% de remoción, con la enzima del chayote.

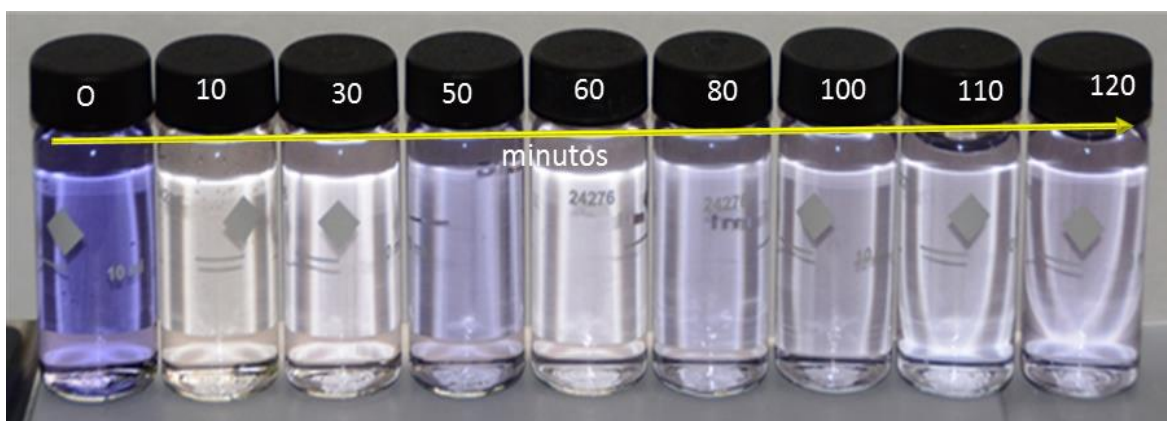
La segunda posible de solución de tratamiento fue de 2 h a 25°C, con concentración de colorante de 10 a 60 mg/L, con pH entre 3.5 a 7.5, con dosis de peróxido de hidrógeno y de enzima peroxidasa de 1000 a 2000  $\mu\text{L}$ . En (Figura 4.32) se muestra el espectro de absorción UV-vis del colorante azul directo 2 con todos los bloques de la segunda opción de tratamiento. Del cual se tomó el bloque 47 para realizar el seguimiento visual (Figura 4.33, Figura 4.34).



**Figura 4.32.** Espectros de absorción UV-vis del tratamiento del colorante azul directo 2, al min 0 y al final del tratamiento enzimático de 120 min.

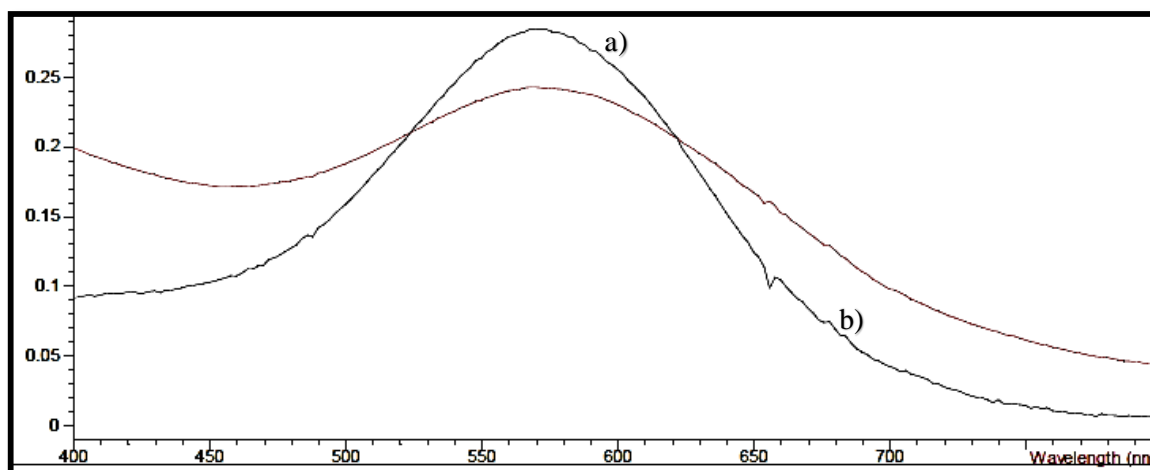


**Figura 4.33.** Seguimiento visual tomadas a diferentes intervalos de tiempos durante 120 min (Bloque 47) para la decoloración del colorante azul directo 2 con la enzima peroxidasa del residuo industrial de soya en donde se obtuvo un 51.4% de decoloración en 2 h, con 50°C, con una concentración de enzima de 1000  $\mu\text{L}$  y de peróxido de 2000  $\mu\text{L}$ , a pH de 7.5 con una concentración inicial de 10 mg/L de colorante.

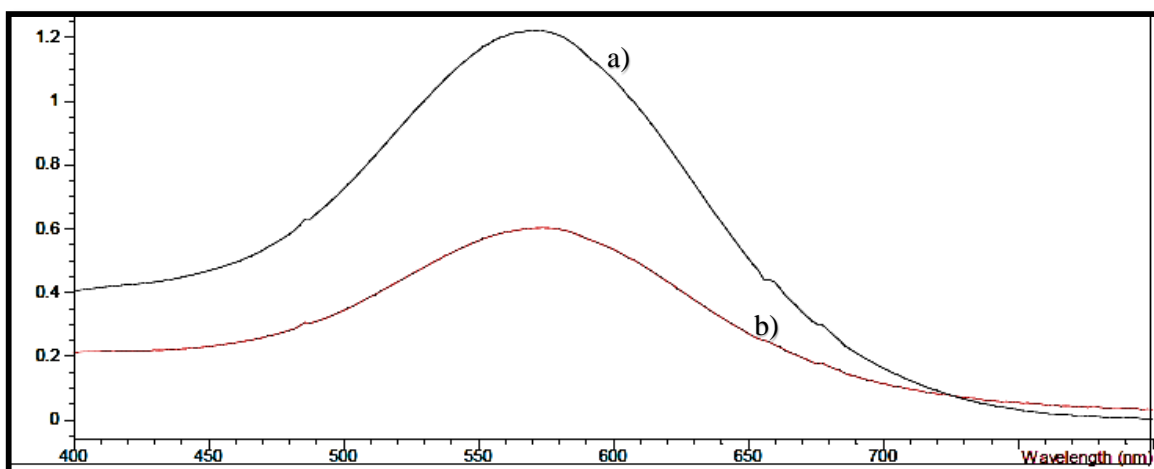


**Figura 4.34.** Seguimiento visual tomadas a diferentes intervalos de tiempos durante 120 min (Bloque 47) para la decoloración del colorante azul directo 2 con la enzima peroxidasa del chayote en donde se obtuvo un 64.8% de decoloración en 2 h, con 50°C, con una concentración de enzima de 1000  $\mu\text{L}$  y de peróxido de 2000  $\mu\text{L}$ , a pH de 7.5 con una concentración inicial de 10 mg/L de colorante.

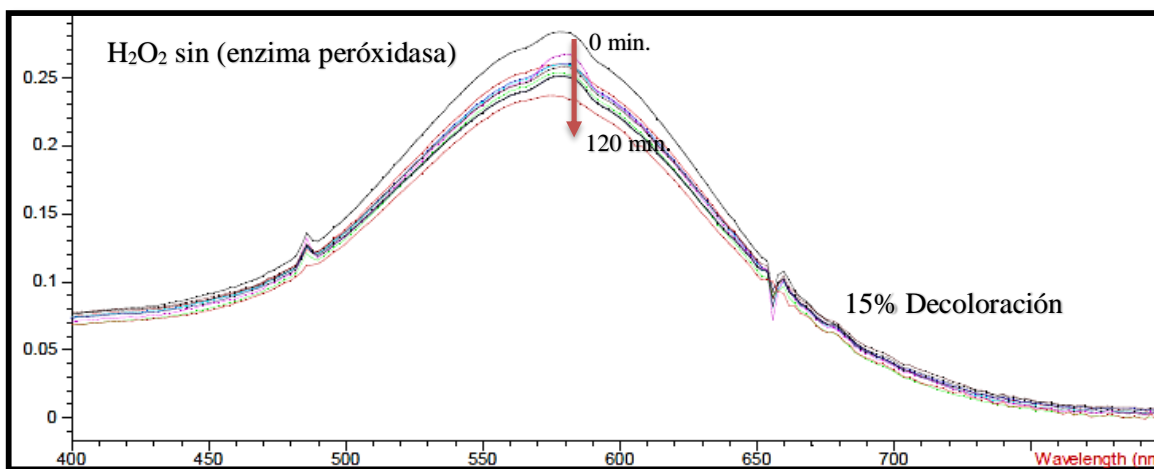
Las (Figura 4.35, Figura 4.36) muestran los espectros de absorción UV-vis del tratamiento enzimático del colorante azul directo 2, para los bloques 6, 14 los cuales se obtuvieron los mayores porcentajes de remoción para la enzima del residuo de soya entre 30 al 46% mientras que para el bloque 15 solo se adicionó peróxido de hidrógeno sin la enzima peroxidasa en el cual se obtuvo solo un 15% (Figura 4.37), para el bloque 23 se adicionó solo la enzima peroxidasa sin la adición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el cual se observó un porcentaje de decoloración del 11.2% (Figura 4.38).



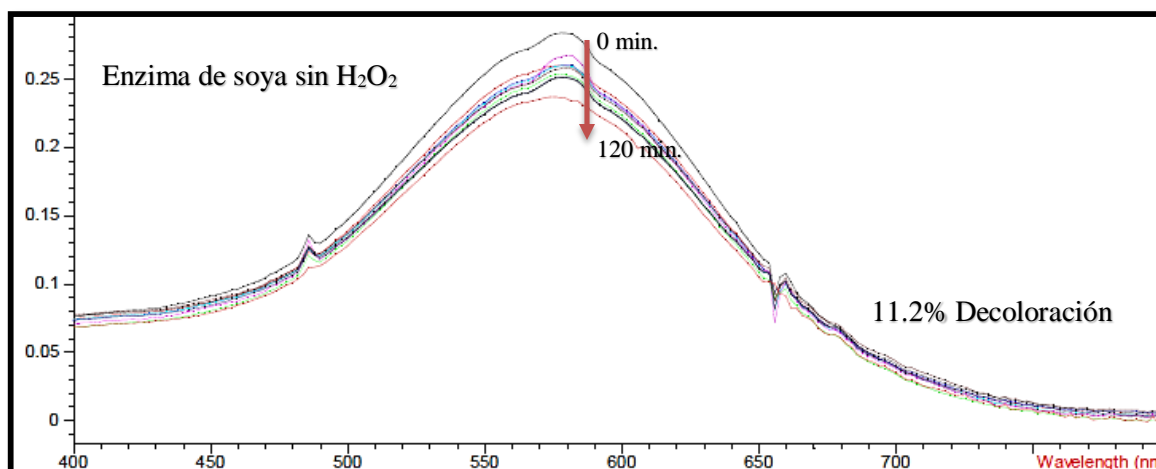
**Figura 4.35.** Colorante azul directo 2: a) sin tratamiento enzimático, y b) al término del tratamiento con un 38.5% de remoción, con la enzima del residuo industrial de soya para el bloque 6.



**Figura 4.36.** Colorante azul directo 2: a) sin tratamiento enzimático, y b) al término del tratamiento con un 81.5% de remoción, con la enzima del chayote bloque 14.

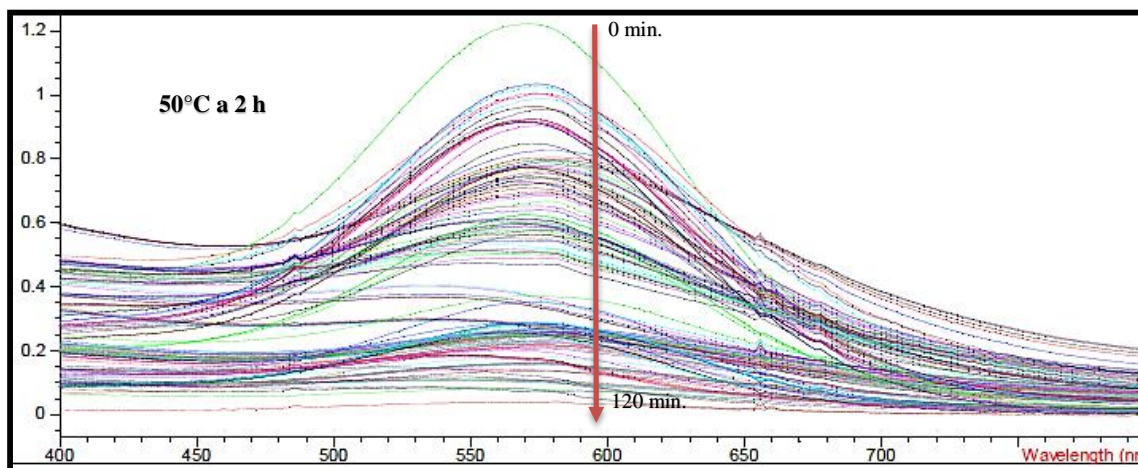


**Figura 4.37.** Colorante azul directo 2 solo con la adición del peróxido de hidrógeno sin la enzima del residuo industrial de soya sin peróxido de hidrógeno para el bloque 15.



**Figura 4.38.** Colorante azul directo 2 solo con la adición de la enzima del residuo industrial de soya sin peróxido de hidrógeno para el bloque 23.

La tercera posible solución de tratamiento fue de 2 h a 50°C, con concentración de colorante de 10 a 60 mg/L, con pH entre 3.5 a 7.5, con dosis de peróxido de hidrógeno y de enzima peroxidasa de 1000 a 2000 µL. En la Figura 4.39 se muestra el espectro de absorción UV-vis del colorante con todos los bloques de la segunda opción de tratamiento. Se tomó el bloque 30 para el seguimiento visual (Figura 4.40) para la enzima del residuo industrial y la (Figura 4.41) para la enzima del chayote.

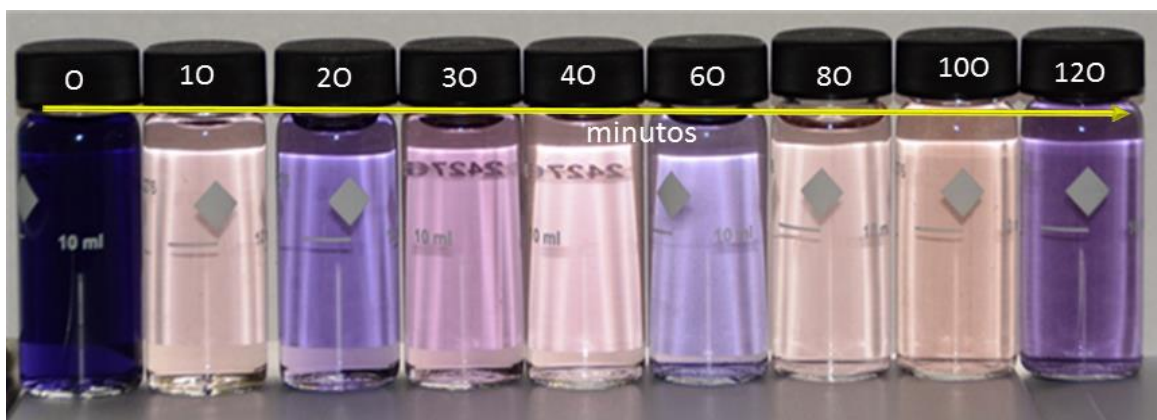


**Figura 4.39.** Espectros de absorción UV-vis del tratamiento del colorante azul directo 2, al min 0 y al final del tratamiento enzimático de 120 min.



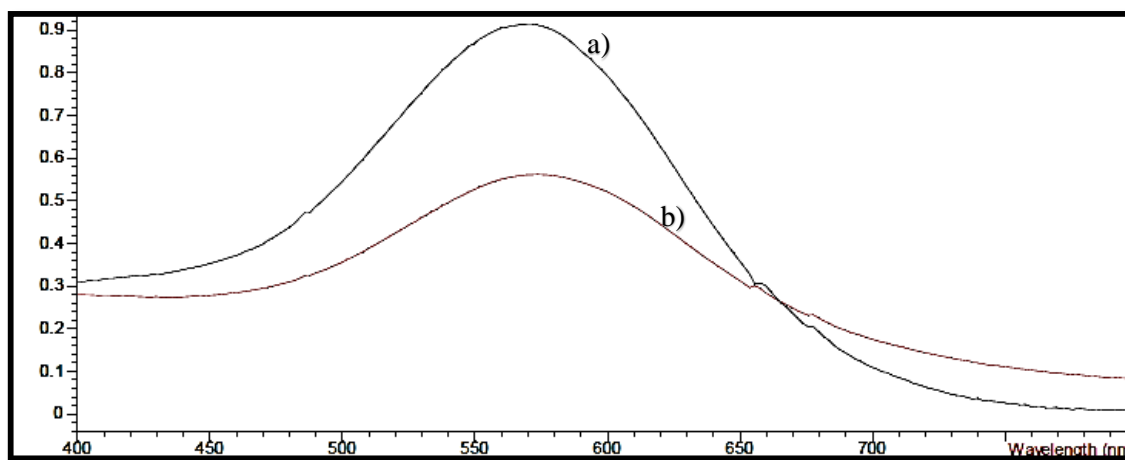


**Figura 4.40.** Seguimiento visual tomadas a diferentes intervalos de tiempos durante 120 min (Bloque 30) para la decoloración del colorante azul directo 2 con la enzima peroxidasa del residuo industrial de soja en donde se obtuvo un 51.7% de decoloración en 2 h, con 50°C, con una concentración de enzima de 1000  $\mu\text{L}$  y de peróxido de 2000  $\mu\text{L}$ , a pH de 3.5 con una concentración inicial de 60 mg/L de colorante.

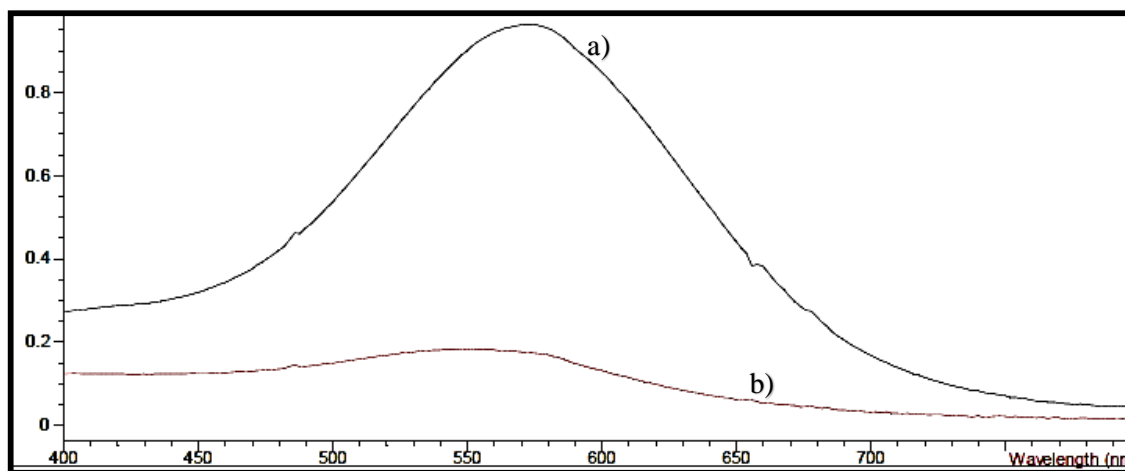


**Figura 4.41.** Seguimiento visual tomadas a diferentes intervalos de tiempos durante 120 min (Bloque 30) para la decoloración del colorante azul directo 2 con la enzima peroxidasa del chayote en donde se obtuvo un 59% de decoloración en 2 h, con 50°C, con una concentración de enzima de 1000  $\mu\text{L}$  y de peróxido de 2000  $\mu\text{L}$ , a pH de 3.5 con una concentración inicial de 60 mg/L de colorante.

Las (Figura 4.42, Figura 4.43) muestran los espectros de absorción UV-vis del tratamiento enzimático del colorante azul directo 2 los cuales se obtuvieron los mayores porcentajes de remoción para la enzima del residuo de soya entre 55%. Mientras que para la enzima del chayote se obtuvo un porcentaje de decoloración del 85.9%.

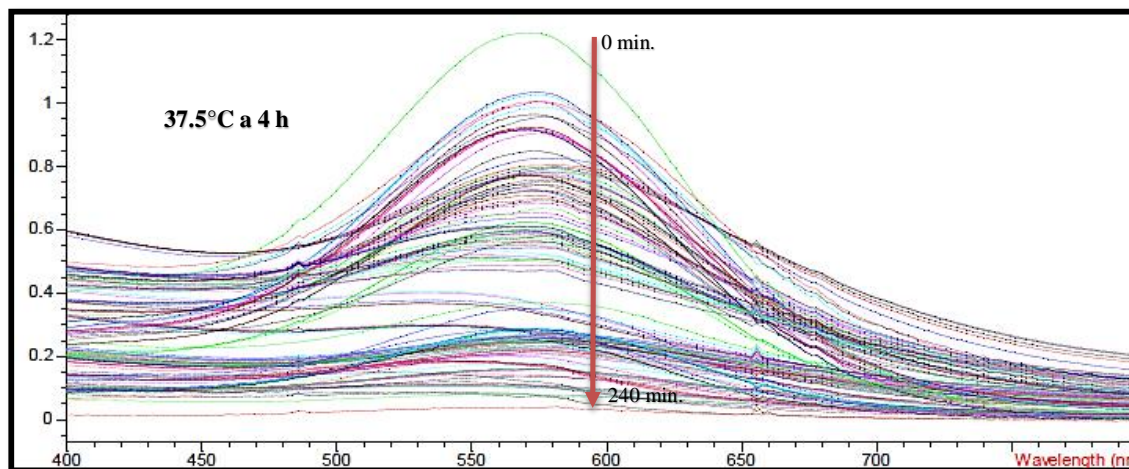


**Figura 4.42.** Colorante azul directo 2: a) sin tratamiento enzimático, y b) al término del tratamiento con un 55% de remoción, con la enzima del residuo industrial de soya bloque 20.



**Figura 4.43.** Colorante azul directo 2: a) sin tratamiento enzimático, y b) al término del tratamiento con un 85.9 % de remoción, con la enzima del chayote bloque 20.

La cuarta posible solución de tratamiento fue de 4 h a 37.5°C, con concentración de colorante de 10 a 60 mg/L, con pH entre 5.5, con dosis de peróxido de hidrógeno y de enzima peroxidasa de 1500  $\mu$ L. En la (Figura 4.44) se muestra el espectro de absorción UV-vis del colorante azul directo 2 con todos los bloques de la cuarta opción de tratamiento. Para el seguimiento visual se tomo el bloque 12 (Figura 4.45) para la peroxidasa de soya con un porcentaje de decoloración del 38.9% y el bloque 37 para la enzima del chayote con un porcentaje de 87.4% (Figura 4.46)



**Figura 4.44.** Espectros de absorción UV-vis del colorante azul directo 2, al minuto 0 y al final del tratamiento enzimático de 240 min.



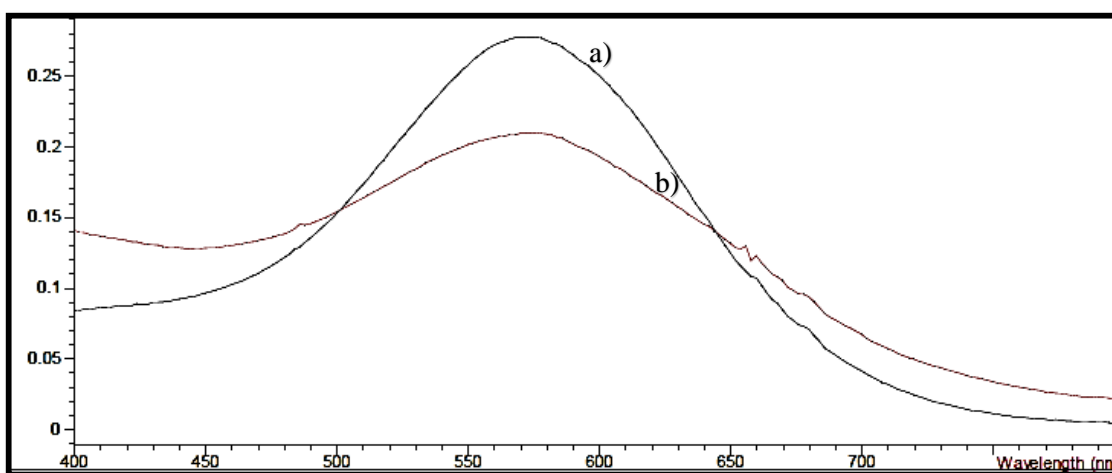
**Figura 4.45.** Seguimiento visual tomadas a diferentes intervalos de tiempos durante 240 min (Bloque 12) para la decoloración del colorante azul directo 2 con la enzima peroxidasa del residuo industrial de soya se obtuvo un 38.9% de decoloración en 4 h, con 37.5°C, con una concentración de enzima de 1500  $\mu$ L y de peróxido de 1500  $\mu$ L, a pH de 5.5 con una concentración inicial de 35 mg/L de colorante.



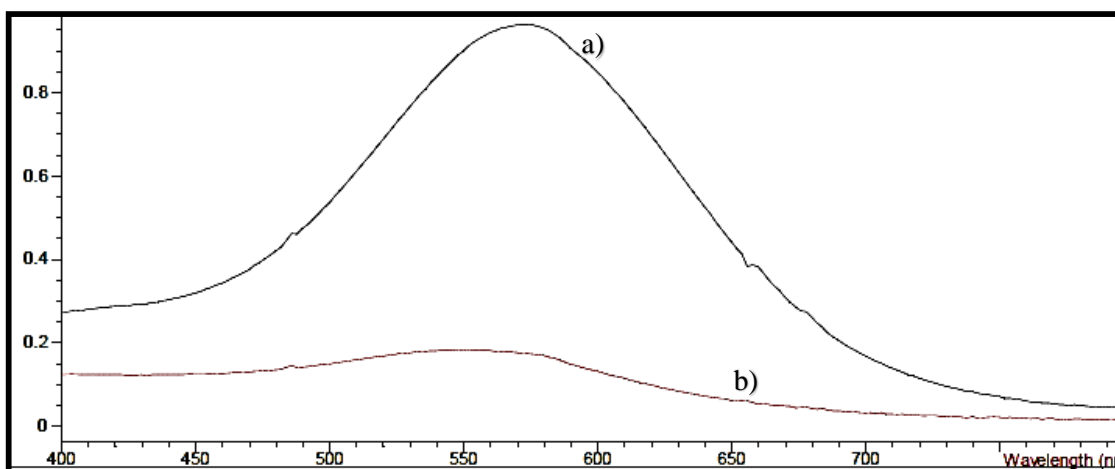


**Figura 4.46.** Seguimiento visual tomadas a diferentes intervalos de tiempos durante 240 min (Bloque 37) para la decoloración del colorante azul directo 2 con la enzima peroxidasa del residuo industrial de soja se obtuvo un 70.5% de decoloración en 4 h, con 37.5°C, con una concentración de enzima de 1500  $\mu\text{L}$  y de peróxido de 1500  $\mu\text{L}$ , a pH de 5.5 con una concentración inicial de 35 mg/L de colorante.

Las (Figura 4.47, Figura 4.48) muestran los espectros de absorción UV-vis del tratamiento enzimático del colorante azul directo 2 los cuales se obtuvieron los mayores porcentajes de remoción para la enzima del residuo de soja entre 38.9%. Mientras que para la enzima del chayote se obtuvo un porcentaje de decoloración del 87.4%.

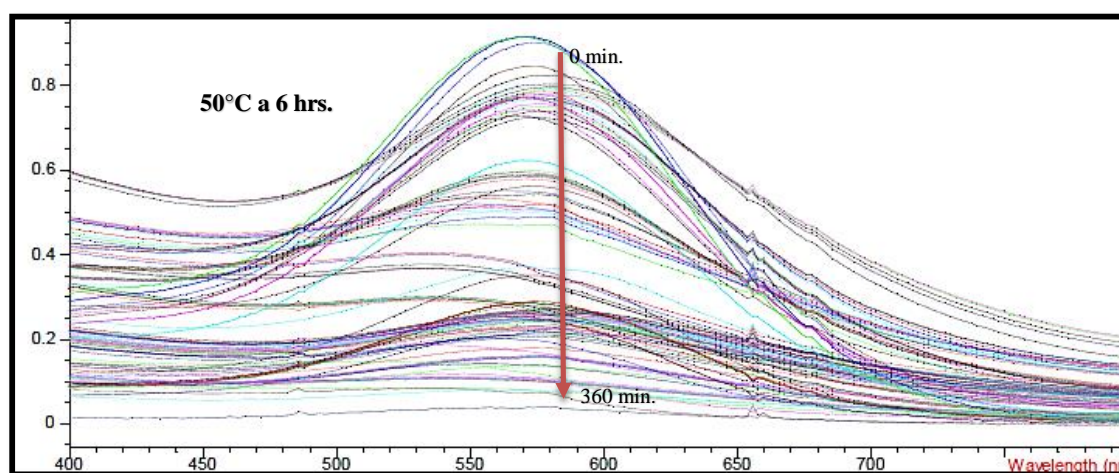


**Figura 4.47.** Colorante azul directo 2: a) sin tratamiento enzimático, y b) al término del tratamiento con un 38.9 % de remoción, con la enzima del residuo industrial de soja bloque 12.



**Figura 4.48.** Colorante azul directo 2: a) sin tratamiento enzimático, y b) al término del tratamiento con un 87.4% de remoción, con la enzima del chayote bloque 37.

La última posible solución de tratamiento fue de 6 h a 50°C, con concentración de colorante de 10 a 60 mg/L, con pH entre 3.5 a 7.5, con dosis de peróxido de hidrógeno y de enzima peroxidasa de 1000 a 2000  $\mu\text{L}$ . En la (Figura 4.49) se muestra el espectro de absorción UV-vis del colorante azul directo 2 con todos los bloques de la segunda opción de tratamiento. Para el seguimiento visual se tomo el bloque 2 (Figura 4.50) para la peroxidasa del residuo industrial de soya, para la peroxidasa del chayote se tomo el bloque 33 (Figura 4.51).



**Figura 4.49.** Espectros de absorción UV-vis del tratamiento del colorante azul directo 2, al min 0 y al final del tratamiento enzimático de 360 min.

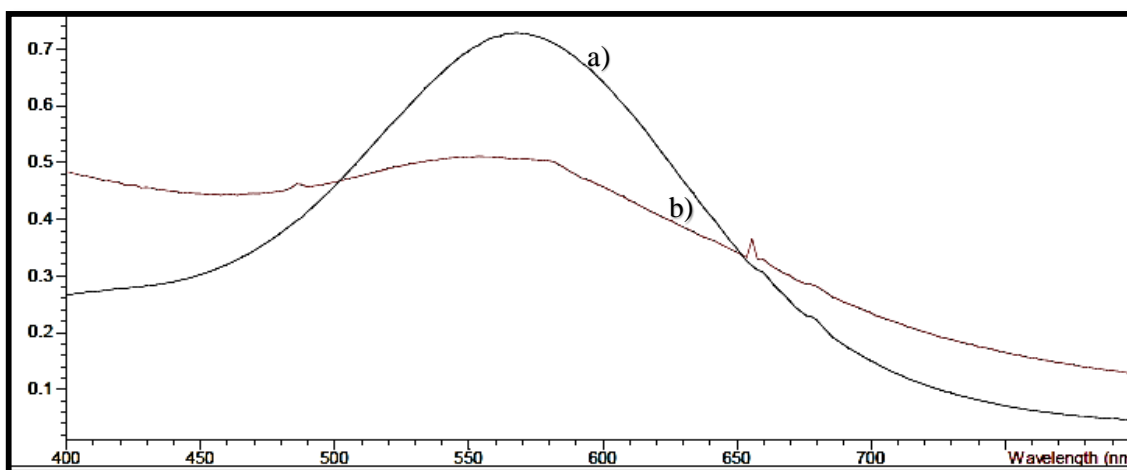


**Figura 4.50.** Seguimiento visual tomadas a diferentes intervalos de tiempos durante 360 min (Bloque 2) para la decoloración del colorante azul directo 2 con la enzima peroxidasa del residuo industrial de soya se obtuvo un 51.1% de decoloración en 6 h, con 50°C, con una concentración de enzima de 2000  $\mu\text{L}$  y de peróxido de 1000  $\mu\text{L}$ , a pH de 7.5 con una concentración inicial de 60 mg/L del colorante.

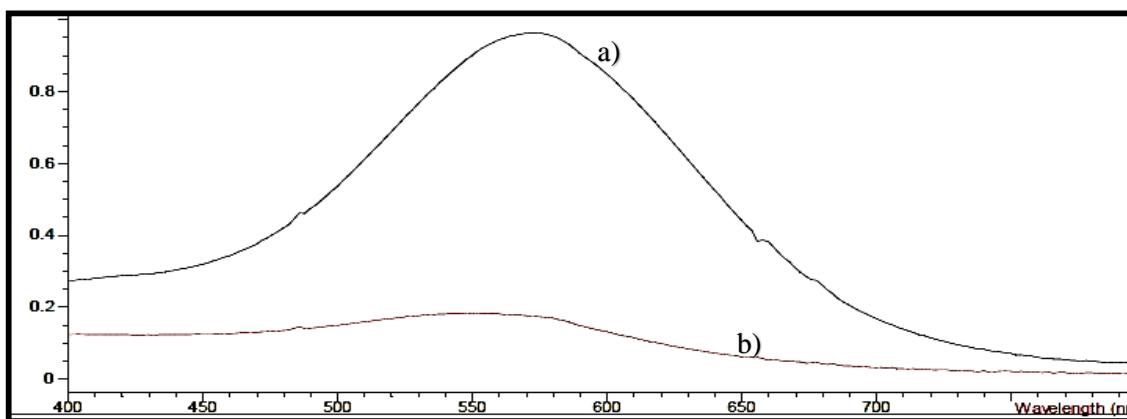


**Figura 4.51.** Seguimiento visual tomadas a diferentes intervalos de tiempos durante 360 min (Bloque 33) para la decoloración del colorante azul directo 2 con la enzima peroxidasa del residuo industrial del chayote se obtuvo un 89.6% de decoloración en 6 h, con 50°C, con una concentración de enzima de 2000  $\mu\text{L}$  y de peróxido de 2000  $\mu\text{L}$ , a pH de 3.5 con una concentración inicial de 10 mg/L del colorante.

Las (Figura 4.52, Figura 4.53) muestran los espectros de absorción UV-vis del tratamiento enzimático del colorante (AD2) los cuales se obtuvieron los mayores porcentajes de remoción para la enzima del residuo de soya entre 48.1% (Bloque 2). Mientras que para la enzima del chayote se obtuvo un porcentaje de decoloración del 89.6% (Bloque 33).

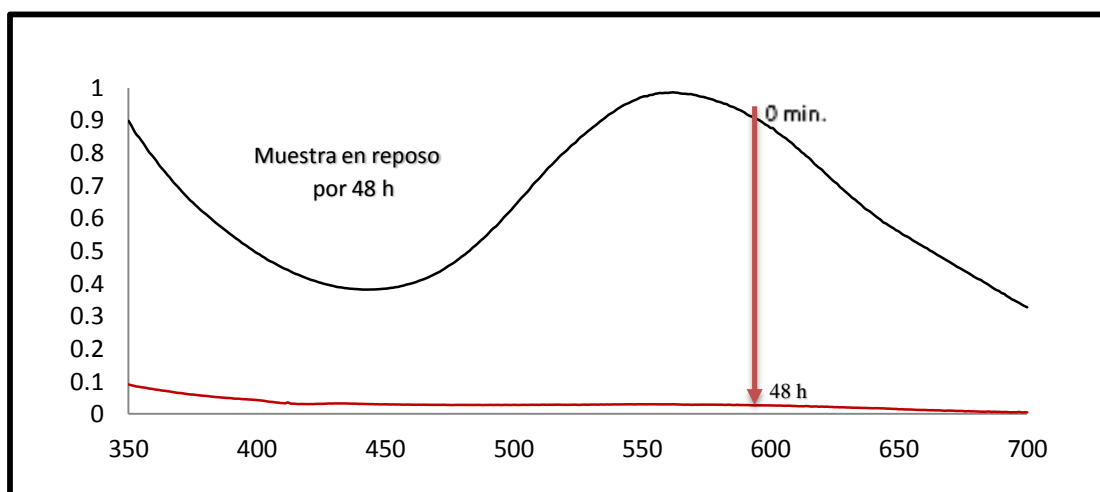


**Figura 4.52.** Colorante (AD2) a) sin tratamiento enzimático b) al término del tratamiento con un 48.1% de remoción, con la enzima de la soya (Bloque 2).



**Figura 4.53.** Colorante (AD2) a) sin tratamiento enzimático b) al término del tratamiento con un 89.6% de remoción, con la enzima del chayote (Bloque 33).

La muestra se dejó en reposo 48 horas y fue centrifugada a 12000 rpm durante 5 min y se obtuvo nuevamente su espectro de absorción (Figura 4.54). Para determinar el porcentaje de remoción del colorante azul directo 2 antes y después de su tratamiento enzimático, se monitoreo en un intervalo de tiempo de 60 min, se eliminó en un 99.9% la decoloración del colorante como se observa en el seguimiento visual no muestra color ni sedimento (Figura 4.55, Figura 4.56).



**Figura 4.54.** Espectros de absorción UV-vis del tratamiento del (AD2), al min 0 y al final del tratamiento enzimático 48 horas de reposo.



**Figura 4.55.** Seguimiento visual (Bloque 2) para la decoloración (AD2) para el residuo industrial de soja, con una concentración inicial de 10 mg/L.



**Figura 4.56.** Seguimiento visual (Bloque 33) para la decoloración (AD2) para el chayote, con una concentración inicial de 60 mg/L.

## 5 CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se concluye que:

- ✚ Inicialmente se obtuvo la enzima peroxidasa a partir de dos fuentes: el residuo industrial de soya y del fruto del chayote utilizando dos medios de soporte, anionico y catiónico obteniendo sus bandas colorimétricas mas pronunciadas con la enzima peroxidasa obtenida del fruto del chayote.
- ✚ Posteriormente se determinó la actividad enzimática de la enzima peroxidasa utilizando la técnica de la 4 amino- antipirina en donde se hallaron actividades enzimáticas mas altas que las que presenta la literatura en los últimos 10 años.
- ✚ Asimismo se determinaron las pruebas enzimáticas evaluando el efecto del pH, tiempo de reacción, concentración de peróxido de hidrógeno, concentración de enzima sobre el colorante azul directo 2, resultando 5 factores influyentes en el tratamiento: temperatura, pH, tiempo de contacto, dosis de enzima y concentración del colorante.
- ✚ En otro orden de ideas se evaluó la toxicidad antes y después del tratamiento enzimático empleando *Vibrio fisheri* los resultados mostraron que después del tratamiento la toxicidad incrementa para las dos enzimas peroxidadas, esto se puede atribuir a la formación de subproductos que pueden ser más tóxicos que el propio colorante.
- ✚ Finalmente se evaluó la decoloración del colorante azul directo 2 mediante peroxidadas y se encontraron altos porcentajes de remoción principalmente de la peroxidasa proveniente del fruto del chayote.

Por lo anterior se concluye que las peroxidadas de las dos fuentes son una alternativa de remoción para el colorante azul directo 2.



## 6 RECOMENDACIONES

- ✚ Realizar la caracterización de los subproductos obtenidos en el proceso de remoción del colorante.
- ✚ De acuerdo a los resultados encontrados se recomienda el tratamiento enzimático como un tratamiento inicial para la decoloración seguido por un tratamiento convencional para obtener además de la degradación y la eliminación total de la toxicidad.

## 7 PRODUCTOS GENERADOS EN ESTA INVESTIGACIÓN

- Trabajo aceptado como cartel con el tema “**Decoloración del colorante azul directo 2 mediante dos enzimas peroxidasa**”, en el IV Foro Ambiental en la temática Desarrollo Sustentable del Instituto Politécnico Nacional, México, 2014 en el cual se obtuvo el primer lugar.
- Trabajo aceptado como cartel con el tema “ **Decoloración del colorante azul directo 2 mediante enzimas peroxidasa**” en el 4th International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering, México, 2014.



## 8 REFERENCIAS

Abiquim, disponível em (2011): [www.abiquim.org.br/corantes/cor\\_historia.asp](http://www.abiquim.org.br/corantes/cor_historia.asp).

Ahmed Basha, C.; Selvakumar, K. V.; Sivashanmugam, P.; Lee, C. W (2011). Degradation studies for textile reactive dye by combined electrochemical, microbial and photocatalytic methods. *Separation and purification technology*, Vol. 79, P. 303-309.

Aitken, M.D (1993). Waste treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles. *The chemical engineering journal and the biochemical engineering journal*, Vol. 52, P. b49-b58.

Akhtar, S. Khan, A.A. and Husain, Q (2005a). Partially purified bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase catalyzed decolorization of textile and other industrially important dyes. *Bioresource Technology*, Vol. 96, P. 1804–1811.

Akhtar, S. Khan, A.A. and Husain, Q (2006). Partially purified bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase catalyzed decolorization of textile and other industrially important dyes. *Bioresource Technology*, Vol. 96. P.1804–1811.

al-Kassim L., Taylor K. E. J., Nicell J. A., Bewtra K. K. y Biswas N (1994). Enzymatic removal of selected aromatic contaminants from wastewater by a fungal peroxidase from (*Coprinus macrorhizus*) in batch reactors. *J. Chem. Tech. Biotechnol*, Vol. 61. P.179-182.

An, S.Y. Min, S.K., Cha, I. H., Choi, Y.L., Y.S., Kin, C.H (2002). Decolorization of triphenylmethane and azo dyes by *Citrobacter* sp. *Biotechnology Letters*. 24:1031-1040. and physiological roles in higher plants. *Université de Genève, Centre de Botanique*. P. 889-1112.

Araujo, F. V. F.; Yokoyama, L.(2006). Teixeira, I. a. c. remoção de cor em soluções de corantes reativos por oxidação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/uv. *Química nova*, Vol. 29, P. 11-14.

Azbar, N., Yonar, T. and Kestioglu, K (2004). Comparison of various advanced oxidation processes and chemical treatment methods for COD and color removal from a polyester and acetate fiber dyeing effluent. *Chemosphere*, P. 35-43.

Baborova, P. Moder, M. Baldrian, P. Cajthamlova, K. and Cajthaml, T (2006). Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Resource Microbiology*, Vol.157, P. 248-253.

Bandala, E. García, J. Moeller, G (2008). Photocatalytic decolourisation of synthetic and real textile wastewater containing benzidine based azo dyes. *Chem. Eng. Process*, Vol. 47, P. 169-176.

Basheer, S. Kut, O.M. Prenosil, J.E. and Bourne, J.I (1992). Kinetics of enzymatic degradation of cyanide. *Biotechnology. Bioengineering*, Vol. 39, P. 629-634.

Bayramoglu, G, Y Arica (2008). Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: horseradish peroxidase immobilized on magnetic bead. Doi: 10.1016/j.jhazmat.

- Bechtold, T., Mader, C. and Mader, J (2002). Cathodic decolourization of textile dyebaths: Tests with full scale plant. *Journal of Applied Electrochemistry*, Vol. 32(9), P. 943-950.
- Becerra, Cano (2012). Obtención de peroxidases de un residuo de soya y su potencial aplicación en la remoción del colorante azul erionil. (Tesis de Licenciatura) Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ingeniería Química.
- Beltrame, L. T. C (2006). Sistemas microemulsionados aplicados à remoção da cor de efluentes têxteis. UFRN, tese de doutorado, Natal-RN.
- Bishop, P.Kuppusamy, I. Briones, R (1996). The biodegradation of textiles dyes using biofilm treatment systems. Briones, R. (Eds.) *Biodegradación de compuestos orgánicos industriales.1:1-10* UNAM, Instituto de Ingeniería, Marzo 26. México, D.F. México.
- Blaise, C. y Ferard, F (2005). Microtox acute toxicity test. Small-scale freshwater toxicity investigations. Springer, The Netherlands, P. 69-105.
- Bodzek M., Bohdziewicz J. y Kowalska M. (1994). Preparation of membrane-immobilized enzymes for phenol decomposition. *J. Chem. Tech. Biotechnol*, Vol. 61, P. 231-239.
- Buchanan, y Nicell, J. A (1997). Model development for horseradish peroxidases catalizad removal of aqueous phenol. *Biotechnology and bioengineering*, Vol. 54 (3), P. 251-261.
- Buitrón, G. M (2003). Pharmaceutical wastewater treatment using an anaerobic/aerobic sequencing batch biofilter. *Journal of Environmental Science and Health. Part a- Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, Vol. 38 (10), P. 2077-2088.
- Cheng, J; Ming, S, Zuo, P (2006). Horseradish peroxidase immobilized on aluminium pillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater. *Water Research*, Vol. 40, P. 283-290.
- Christian, V. Shrivastava, R.. Shukla, D. Modi, H.A. y Vyas, B.R (2005). Degradation of xenobiotic compounds by lignin-degrading white-rot fungi: Enzymology and mechanisms involved. *Indian Journal. Exp. Biol*, Vol. 43, P. 301-312.
- Christie, R.M (2003). *La química del color*. Zaragoza (España), Editorial Acribia, S.A.
- Chung, K.T and Cerniglia, C. E (1992). Mutagenicity of azo dyes: structure activity relationships. *Mutation Research*, Vol. 277, P. 201-220.
- Chung, K.T. and Stevens, S.E.J (1993). Degradation of azo dyes by environmental microorganisms and helminthes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 12 (11), P. 2121-2132.
- CONAGUA (2009). *Estadísticas del agua en México*, Ed. 2010.
- CONAGUA (2010). *Estadísticas del agua en México*, 1ª Edición, P. 86-90. México D.F. México.

- Cooper, VA. and Nicell, JA (1996). Removal of phenol from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. *Water Research*, Vol. 30, P. 954-964.
- Daud, N. K. Ahmad, M. A. Hameed, B. H (2010). Decolorization of Acid Red 1 dye solution by Fenton-like process using Fe–Montmorillonite K10 catalyst. *Chemical Engineering Journal*, Vol. 165, P. 111-116.
- De Souza, Forgiarini, E., and De Souza (2007). Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 147, P. 1073-1078.
- Dec, J, and Bollag, J.M (1994). Use of plant material for the decontamination of water polluted with phenol. *Biotechnology and Bioengineering* Vol. 44, P. 1132-1139.
- Deshpande, P. A.; Jain, D.; Madras, G (2011). Kinetics and mechanism for dye degradation with ionic Pd-substituted ceria. *Applied Catalysis A: General*, Vol. 395, P. 39-48.
- DOF (2006). NOM-052-SEMARNAT 2005 . Norma Oficial Mexicana Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. *Diario Oficial de la Federación. Poder Ejecutivo Federal. México D.F. México.*
- Dos Santos AB, Cervantes FJ, Van Lier JB (2007). Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresour. Technol*, Vol, 98: P. 2369-2385.
- Duran, N. M.A. Rosa, A. D'annibale and L. Gianfreda (2002). Application of laccase and tyrosinase immobilized on different supports, a review. *Enzyme. Microb. Technol.*, Vol. 31, P. 07-931.
- Duran, N. and Esposito, E (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: A review. *Applied Catalysis. B: Environmental* Vol. 28, P. 83-99.
- Eibes, G. Lu-Chau, T. Feijoo, G. Moreira M.T. and Lema, J.M (2005). Complete degradation of anthracene by manganese peroxidase in organic solvent mixtures. *Enzyme Microbiology. Technology* Vol. 37, P. 365-372.
- Ekici, P. Leupold. Parlar, H (2001). Degradability of selected dye metabolites in activated sludge systems. *Chemosphere* Vol. 44, P. 721-728.
- EPA (1996). Best Management Practices for Pollution Prevention in the Textile Industry. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, USA.
- EPA (2003). Dye and Pigment production wastes listed as hazardous; proposed rule. November 25. Consulta electrónica a redes internacionales. Dirección electrónica: (<http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/id/index.htm>).
- Fernandez, A; Peteira, B, Gonzalez, M.C; Llanes, L.Y (2003). Actividad peroxidasa, polifenoloxidasas, fenilalanina Amonio Liasa y glucanasa en somaclones y mutantes de arroz. *Revista Protección Vegetal*, Vol. 18 (3), P. 183-188.

- Forgacs, Esther; Cserhádi, Tibor y Oros, Gyula (2004). Removal of synthetic dyes from wasterwaters: a review, Vol. 30, P. 953-971.
- Fragoso, C. T.; Battisti, R.; Miranda, C.; Jesus, P. C (2009). Kinetic of the degradation of C. I. Food Yellow 3, C. I. Food Yellow 4 azo dyes by the oxidation with hydrogen peroxide. Journal of Chemical Catalysis. A, Chemical, Vol. 301, P. 93-97.
- Garzón-Zúñiga, M.A., Sandoval-Villasana, A.M. and Moeller-Chávez, G.E (2011). Decolorization of the AO24 azo dye and reduction of toxicity and genotoxicity in trickling biofilters. Water Environment Reseach, Vol. 83 (2), P. 107-115.
- Gaspar, TH.C., T. Thorpe, and H. Greppin (1982). Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical.
- Ghiourelitis, M. and Nicell, J. A (1999). Assesment of soluble products of peroxidase catalyzed polymerization of aqueous phenol. Enzyme and Microbial Techbology, Vol. 25, P. 185-193.
- Golka, K. Kopps, S. and Myslak (2004). Carcinogenicity of Azo Colorants: Influence of Solubility and Bioavailability a Review. Toxicology Letters, Vol. 151, P. 203-210.
- González-Martínez, S., Piña-Mondragon, S., González-Barceló (2010). Treatment of the azo dye direct blue 2 in a biological aerated filter under anaerobic/aerobic conditions. Water Science and Technology, Vol. 61(3), P. 789 -796.
- Govere, E.M, Tonegawa, M, Bruss, M.A, Wheeler, E.F, Kephart, K.B, Voigt, J.W, Dec, J (2007). Using minced horseradish roots and peroxides for the deodorization of swine manure: a pilot scale study. Bioresourse Technology, Vol. 98, P. 1191-1198.
- Grambow, H.J (1986). Pathway and mechanism of the peroxidase-catalyzed degradation of indole-3-acetic acid. In: H. Greppin, C. Penel, and T. Gasper (eds.). Molecular and physiological aspects of plant peroxidase. Univ. of Geneva Press, Switzerland, P. 31-41.
- Guaratini, C. C (2000). Textile dyes. Química Nova, Vol. 23(1), P. 71-78.
- Gudelj, M. Fruhwirth, G.O. Paar, A. Lottspeich, F.Robra, K.H. Cavaco- Paulo, A. and Guebitz, G.M (2002). A catalase-peroxidase from a newly isolated thermoalkaliphilic Bacillus sp. with potential for the treatment of textile bleaching effluents. Extremophiles, Vol. 5, P. 423-429.
- Gupta, V. K Y Suhas (2009). Application of low-cost adsorbents for dye removal. A review. Journal of Environmental Management, Vol. 90, P. 2313-2342.
- Gutiérrez, M. C (1999). Colorantes reactivos en los efluentes textiles:nuevos tratamientos para su eliminación. Tecnología del Agua, Vol. 195, P. 42-49.
- Gutiérrez, P. y Salazar, R (2004). Análisis y diseño de experimentos. Mc Graw-Hill. Distrito Federal, México, P. 571.

- Hai, F. I., Yamamoto, K., Nakajima, F., Fukushi, K., Nghiem, L. D., Price, W. E. and Jin, B (2013). Degradation of azo dye acid orange seven in a membrane bioreactor by pellets and attached growth of *Coriolus versicolour*. *Bioresource Technology*, Vol. 141 P. 29-34.
- Haji, S.; Benstaali, B.; Al-Bastaki, N (2011). Degradation of methyl orange by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> advanced oxidation process. *Chemical Engineering Journal*, Vol. 168, P. 134-139.
- Hao, O., Kim, H., Chang, P (2000). Decolorization of wastewater. *Crit. Revs in Environ. Sci. Technol*, Vol. 30, P. 449-505.
- Harvey P. J. Thurston, C. F (2001). *The Biochemistry of Ligninolytic Fungi in Fungi in Biorremediation* ed. G. M. Gadd, Cambridge University Press, Cambridge, P. 27-51.
- Hassan, H. y Hameed, B. H (2011). Oxidative decolorization of Acid Red 1 solutions by Fe–zeolite y type catalyst. *Desalination*, Vol. 276, P. 45-52.
- Herbst W. y Hunger K (1997). *Industrial Organic Pigments: Production, Properties, Applications*, John Wiley and Sons, Inc., 2a edition.
- Hernandez, Y.S (2009). *Tratamiento de aguas residuales de la industria de síntesis de azocolorantes por medio de procesos biológicos combinados*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hunger, K. (2003). *Industrial dyes: Chemistry, Properties, Applications*. Wiley-VCH Weinheim; Cambriege.
- Husain, M., and Husain, Q (2008). Applications of redox mediators in the treatment of organic pollutants by using oxidoreductive enzymes. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol*, Vol.38, P. 1-42.
- Husain, Q (2006). *Potential Applications of the Oxidoreductive Enzymes in the Decolorization and Detoxification of Textile and Other Synthetic Dyes from Polluted Water*. *Critical Reviews in Biotechnology*, Vol. 26, P. 201-221.
- Idel-Aouad, R.; Valiente, M.; Yaacoubi, A.; Tanouti, B.; Mesas, M. L (2011). Rapid decolourization and mineralization of the azo dye C.I. Acid Red 14 by heterogeneous Fenton reaction. *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 186, P. 745-750.
- INTA Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (2003).
- Isik, M., Sponza D (2007). Fate and toxicity of azo dye metabolites under batch long.term anaerobic incubations. *Enzyme Microb. Technol*, Vol. 40, P. 934-939.
- Kalme, S.D. Parshetti, G.K. Jadhav, S.U. and Govindwar, S.P (2007). Biodegradation of benzidine based dye Direct Blue 6 by *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112. *Bioresource Technology*, Vol. 98, P.1405-1410.
- Kalsoom U, Salman As, Meetani Ma, Rauf Ma, Nawaz BH (2013). Mechanistic study of a diazo dye degradation by Soybean Peroxidase. *Chemistry Central Journal*; 7:93.

- Kayan, B. Gözmen, B. Demirel, M. Gizir, A. M (2010). Degradation of acid red 97 dye in aqueous medium using wet oxidation and electro-fenton techniques. *Journal of hazardous materials*, Vol. 177, P. 95-102.
- Kinsley Ch. y Nicell J. A. (2000). Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene glycol. *Biores. Technol*, Vol. 73, P. 139-146.
- Kirk, R. E. and Othmer, D. F. (1985) *Enciclopedia de tecnología química*, cuarta ed. Wiley, New York.
- Klibanov A. M., Tsu-Man T. Y Scott K. P. (1983). Peroxidase catalyzed removal of phenols from coal-conversion waste waters. *Science*, Vol. 221, P. 259-61.
- Kobayashi S, Uyama H, Kimura S (2001). Enzymatic Polymerization. *Chemical. Review*, Vol. 101, P. 3793-3818.
- Laguna, J (1996). *Bioquímica*. Facultad de medicina, UNAM, México D.F., Fournier S.A 2° ed.
- Lapertot, M. Oller, I. Gernjak, W. Malato, S. Pulgarín, C (2008). Evaluating Microtox® as a tool for biodegradability assessment of partially treated solutions of pesticides using Fe<sup>3+</sup> and TiO<sub>2</sub> solar photo-assisted processes. *Ecotoxicol. Environ*, Vol. 69, P. 546-555.
- Lapertot, M. y Pulgarín, C (2006). Biodegradability assessment of several priority hazardous substances: Choice, application and relevance regarding toxicity and bacterial activity. *Chemosphere*, Vol. 65, P. 682-690.
- Lee, J. Choi, S. Thiruvengkatachari, R. Shim, W. Moon, H (2006). Evaluation of the performance of adsorption and coagulation processes for the maximum removal of reactive dyes. *Dyes and Pigments*, Vol. 69, P. 196-203.
- Li, Q. Yue. Sun, H. J., Su, Y. y Gao, B.Y (2010). A comparative study on the properties, mechanisms and process designs for the adsorption of non-ionic or anionic dyes onto cationic-polymer/bentonite. *Journal of Environmental Management*, Vol. 91, P. 1601-1611.
- Libra, J. Borchert, M. Vigelahn, L. and Storm (2004). Two stage biological treatment of a diazo reactive textile dye and the fate of the dye metabolites. *Chemosphere*, P. 167-180.
- Maddhinni, L. V., Hima, B.V. Y Yerramilli, A. (2006). Degradation of azo dye with horseradish peroxidase (HRP). *Indian Institute of Science*, Vol. 86, P. 507-514.
- Mahmoodi, N.M. and Arami M. (2006). Bulk phase degradation of acid red 14 by nanophotocatalysis using immobilized titanium (IV) oxide nanoparticles. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, Vol. 182, P. 60-66.
- Maljaei, A., Arami, M. and Mohammad, N. M (2009). Decolorization and aromatic ring degradation of colored textile wastewater using indirect electrochemical oxidation method. *Desalination*, Vol. 249 (3), P. 1074 - 1078.

- Marchis T, Avetta P, Bianco Pa, Fabbri D, Viscardi G, Laurenti E (2011). Oxidative degradation of Remazol Turquoise Blue G 133 by soybean peroxidase. *J Inorg Biochem*, Vol. 105, P. 321-327.
- Marqu ez, M. y M. V azquez (1999). Modeling of enzymatic protein hydrolysis, *Process Biochemistry*, Vol. 35(1), P. 111-117.
- Masuda M., Sakura A. Y Sakakibara M (2001). Effect of reaction conditions on phenol removal by polymerization and precipitation using *Coprinus cinereus* peroxidase. *Enzyme Microbial Technol*, Vol.28, P. 295-300.
- Matto, M. and Husain, Q (2007). Decolorization of direct dyes by salt fractionated turnip proteins in the presence of hydrogen peroxide and redox mediators. *Chemosphere*, Vol. 69 (2), P. 338-345.
- Mercano, J. E. (2012). Centro virtual de información del agua. Recuperado el 28 de Noviembre de 2012, de [http://www.agua.org.mx/h2o/index.php?option=com\\_content&view=section&id=168&Itemid=300002](http://www.agua.org.mx/h2o/index.php?option=com_content&view=section&id=168&Itemid=300002).
- Metcalf & Eddy (2004). *Treatment, Disposal, Reuse. Wastewater Engineering* Ed. Mc Graw Hill, 4a. Ed. EEUU. Mexico.
- Miranda, E.V (2009). Evaluación del desempeño de dos procesos para el tratamiento del colorante azul negro directo. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de Mexico.
- Mishra, A. B (2006). Removal of dyes by biodegradable flocculants: a lab scale investigation. *Science Technology*, Vol. 41, P. 583-593.
- Moeller G.E., y Garzón M.A (2003). Desarrollo de tecnologías no convencionales para el tratamiento de efluentes de la fabricación de colorantes del tipo azo. Anuario Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, Jiutepec, Morelos. México, P. 77-85.
- Mohan S.V, Prasad K.K, Rao N.C, Sarma (2005). Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process. *Chemosphere*, Vol. 58, P. 1097-1105.
- Mohan Venkata, S., Rao Chandrasekhara, N. and Sarma, P. N (2007). Simulated acid azo dye (Acid black 210) wastewater treatment by periodic discontinuos batch mode operation under anoxic-aerobic-anoxic microenvironment conditions. *Science Direct*, P. 242-250.
- Morgan, D.L. Dunnick, J.K. Goehl, T. Jokinen, M.P. Matthews, H.B. Zeiger, E. Mennear, J.H. (1994). Summary of the National Toxicology Program Benzidine Dye Initiative. *Environmental Health Perspectives*. 102, Supplement 2, P. 63-78.
- Moschos, A (2007). Analysis of synovial fluid in the horse - in particular de activity of the enzyme myeloperoxidase in synovia from diseased joints and tendon sheats. Doctoral Thesis, FU-Berlin Germany.



- Mugdha, A. Y Usha, M (2012). Enzimatic treatment of wastewater containing dyestuffs using different delivery systems. *Scientific Reviews and Chemical Communications*, Vol. 2 (1), P. 31-40.
- Muruganandham, M. and Swaminathan, M (2004). Decolourisation of reactive orange 4 by fenton's and photo-fenton oxidation technology. *Dyes and Pigments*, Vol. 63 (3), P. 315-321.
- Nigam P., Armour G., Banat M. Singh D. Y Marchant R (2000). Physical removal of textile dye and solid state fermentation of dye- adsorbed agricultural residues. *Bioresource Technology*, Vol. 72, P. 219- 226.
- O'neill C., Hawkes F. R., Hawkes D. L., Lourenço N. D., Pinheiro H. M y Delée, W (1999). Colour in textile effluents-sources, measurement, discharge contents, and simulation: A review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Vol. 74, P. 1009-1018.
- Ogushi, y. Sakai, S. E Kawakami, K (2007). Synthesis of Enzymatically-Gellable Carboxymethylcellulose for Biomedical Applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 104, P. 30-33.
- Pandey, A., and P. Singh, A. L (2007). Bacterial Decolorization and Degradation of Azo Dyes. *Int. Biodeter Biodegrad*, P. 59-73.
- Park C., Lee M., Lee B., Kim, Chase, Lee J, Kim (2007). Biodegradation and biosorption for decolorization of synthetic dyes by *Funalia trogii*. *Biochem. Eng. J*, Vol. 36, P. 59-65.
- Park, C. Lee, B. Han, E.J. Lee, J. and Kim, S (2006). Decolorization of Acid Black 52 by fungal immobilization. *Enzyme Microbiology Technology*, Vol. 39, P. 371-374.
- Patil, P. Desai, N. Govindwar, S. Jadhav, J. P. Bapat, V (2009). Degradation analysis of Reactive Red 198 by hairy roots of *Tagetes patula* L. (Marigold). *Planta*, Vol. 230, P. 725-735.
- Pirillo, S. Einschlagb, F. S. G. Ferreira, M. L. Rueda, E. H (2010). Horseradish Peroxidase and Hematin as Biocatalysts for Alizarin Degradation Using Hydrogen Peroxide. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, Vol. 49, P. 6745-6752.
- Pramparo, L. Pruvost, J. Stüber, F. Font, J. Fortuny, A. Fabregat, A. Legentilhomme, P. Legrand, J. Bengoa, C (2008). Modeling the enzymatic elimination of phenol with CFD. *Mediterranean Congress, Barcelona, Espanya*.
- Prato, D (2009). Tratamiento de colorantes azo mediante un sistema híbrido químico biológico. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autonoma de Mexico. Mexico.
- Prazeres, D. M. F. and Cabral, J. M. S (2001). Enzymatic membrane reactors. In: . *Multiphase bioreactor design*. Cabral, J. M. S., Mota, M. and Tramper, J London, Taylor&Francis, Vol. 16, P. 135-180.



- Pricelius, S., Held, C., Sollner, S., Deller, S., Murkovic, M., Ullrich, R., Hofrichter, M., Paulo, C.A., Macheroux, P. y Guebitz, M.G (2007). Enzymatic reduction and oxidation of fibre-bound azo-dye. *Enzyme and Microbial Technology*. reactive textile dye and the fate of the dye metabolites. *Chemosphere*, 56, 167-180. *Rev. Env. Sci. Technol*, Vol. 37, P. 315-377.
- Robinson T, McMullan G, Marchant R, Nigam P (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*, Vol. 77. P. 247-255.
- Rodríguez-Couto, S., Domínguez, A. and Sanromán, A (2002). Production of manganese dependent peroxidase a new solid-state bioreactor by *Phanerochaete chrysosporium* grown on wood shavings: application to the decolorization of synthetic. *Folia Microbiology*, Vol. 47, P. 417-421.
- SAGARPA (2009). Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. Boletín de Agricultura. México D. F.
- Shaffiqu, T.S., Roy, J.J., Nair, R.A. and Abraham, T.E (2002). Degradation of textile dyes mediated by plant peroxidases. *Applied Biochemical Biotechnology*, P. 315-326.
- Shaul, G., Holdsworth, T., Dempsey, C., Dostal, K (1991). Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. *Chemosphere*, Vol. 22, P. 107-119.
- Shi X (2007). Proteome-wide Analysis in *Saccharomyces cerevisiae* Identifies Several PHD Fingers as Novel Direct and Selective Binding Modules of Histone H3 Methylated at Either Lysine 4 or Lysine 36. *J Biol Chem*, Vol. 282 (4), P. 2450-5.
- Shore, J (1996). Advances in direct dyes. *Indian Journal of Fibre and Textile Research* 21, P. 1-29.
- Silva M.C, Duarte C.A, Sousa P.M.T, Amorim Píer P.A, Arriel T.J, Batista C.P.M (2012). Decolorization of the phthalocyanine dye reactive blue 21 by turnip peroxidase and assessment of its oxidation products. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 77, P. 9-14.
- Singh N. y Singh J (2002). An enzymatic method for removal of phenol from industrial effluent. *Prep. Biochem. Biotechnol*, Vol. 32, P. 127-133.
- Singh, N.D., Arndt, P.F., Petrov, D.A (2006). Minor shift in background substitutional patterns in the *Drosophila saltans* and *willistoni* lineages is insufficient to explain GC content of coding sequences. *BMC Biol.* 40: P.37. (Export to RIS).
- Soares, G. M. B., De Amorim, M. T. P. and Costa-Ferreira, M (2001). Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. *Journal of Biotechnology* 89, 123-129. solubility and bioavailability. *Toxicology Letters*, Vol. 151 (1), P. 203-210.
- De Souza, S. M. A. G. U., Forgiarini, E., and De Souza, A. A. U (2007). Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 147, P. 1073-1078.
- Sponza D (2006). Toxicity studies in a chemical dye production industry in Turkey. *J. Hazard. Mat.*, A138, P. 438-447.

- Sponza D.T. (2002). Ultimate azo dye degradation in anaerobic/aerobic sequential processes. *Water Science and Technology*, Vol. 45 (12), P. 271-278.
- Sponza, D.T. and Isik, M (2005a). Reactor performances and fate of aromatic amines through decolorization of Direct Black 38 dye under anaerobic/aerobic sequential. *Process Biochemistry*, Vol. 40 (1), P. 35-44.
- Sponza, D.T. and Isik, M (2005b). Toxicity and intermediates of C.I. direct red 28 dye through sequential anaerobic/aerobic treatment. *Process Biochemistry*, Vol. 40, P. 2735-2744.
- Srinivasan A, Viraraghavan T (2010). Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: a review. *J. Environmental Management*, Vol. 91, P. 1915-1929.
- Steinle, D., Jung, R., and Anliker, R (1992). A compilation of genotoxicity and carcinogenicity data on aromatic aminosulphonic acids. *Food Chem. Toxicol.*, Vol. 30, P. 635-660.
- Supaka, N., Juntongjin, K., Damronglerd, S., Delia, M-L., Strehaiano, P (2004). Microbial decolorization of reactive azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system. *Chemical Engineering Journal*, Vol. 99 (2), P. 169-176.
- Sponza D.T, Isik M (2005). Reactor performances and fate of aromatic amines through decolorization of Direct Black 38 dye under anaerobic/aerobic sequential. *Process Biochemistry*, Vol. 40, P. 35-44
- Tantak, N.P. and Chaudhari, S (2006). Degradation of azo dyes by sequential fenton's oxidation and aerobic biological treatment. *Journal of Hazardous Materials B136*, P. 698-705.
- Tarragó, J. R., Faloci, M.M., Luna, C.V., Sansberro, P.A., Mroginski, L.A (2003). Determinación de enzimas peroxidadas en tejidos caulinares de *Ilex dumosa* R. e *Ilex paraguariensis* St. Hil. Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas Resumen: A-042.
- Tatsumi, K., Ichikawa, H., Wada, K (1994). Dephenolization from aqueous solution by treatment with peroxidase and a coagulant. *Water Science and Technology*, Vol. 30, P. 79-86.
- Terrés, J (2009). Estudo da degradação do corante indigotina catalisada pela peroxidase da raiz forte. Furb, dissertação de mestrado, Tesis de Maestría Universidad de Blumenau.
- Van Der Zee, F.P (2002). Anaerobic azo dye reduction. Ph.D Thesis. Wageningen University, Vandevivere, C., Phillippe, B. R., Verstraete, W. (1998). Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry. Review of emerging technologies. *Journal Chemical Technology*, Vol. 72, P. 289-302.
- Vandevivere, C. Phillippe, B. R. Verstraete, W (1998). Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry. Review of emerging technologies. *Journal Chemical Technology*, Vol. 72, P. 289-302.
- Vasantha Laxmi, M., Hima Bindu, V. and Anjaneyulu, Y (2006). Degradation of azo dye with horseradish peroxidase (HRP). *Indian Institute of Science*, P. 507-514.

- Venkata Mohan, S. Krishna Prasad, K. Chandrasekhara Rao, N. Sarma, P. N (2005). Acid Azo Dye Degradation by Free and Immobilized Horseradish Peroxidase (HRP) Catalyzed Process. *Chemosphere*, Vol. 58, P. 1097-1105.
- Villalobos D. A. y Buchanan I. D (2002). Removal of aqueous phenol by *Arthromyces ramosus* peroxidase. *J. Environ. Eng. Sci.* Vol. 1, P. 65-73.
- Villegas R.O, Geissler G, Silva H.A. y Vergara G, E (2003). Inmovilización de una peroxidasa de chayote (*sechium edule* (jacq) sw) y su potencial aplicación en la remoción de sustancias fenólicas en aguas contaminadas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, Vol. 19 (2), P. 73-81.
- Villegas-Rosas M. L. O (1993). Aislamiento, purificación y caracterización mediante espectroscopía ultravioleta-visible de las isoenzimas de la peroxidasa de chayote (*Sechium edule* (Sw)). Tesis de Maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
- Villegas-Rosas M. L. O., Geissler G., Handall-Silva A. Y González-Vergara E (2002). Isolation, partial purification and immobilization of peroxidases from chayote (*Sechium edule* (Sw)) and their potential application in the removal of phenolic compounds from waste waters. *Memorias del VI International Plant Peroxidases Symposium*, Vol. 3-7, P. 146.
- Wada S., Ichikawa H. Y Tatsumi K (1995). Removal of phenols and aromatic amines from wastewater by a combination treatment with tyrosinase and a coagulant. *Biotechnol. Bioengineer*, Vol. 45, P. 304-309.
- Wagner . Y Nicell J. A (2002). Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Resource*. 36, P. 4041-4052.
- Welinder (1985). Bacterial catalase-peroxidases are gene duplicated members of the plant peroxidase superfamily. *Biochim Biophys Acta* 1080, P. 215-220.
- Wesenberg, D, Kyriakides, I. and Agathos, S. N (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*, Vol. 22, P. 161-187.
- Wright, H. Y Nicell, J, A (1999). Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenol. *Bioresource Technology*, Vol. 70, P. 69-79.
- Wu, C. H (2008). Decolorization of C.I. Reactive Red 2 in O<sub>3</sub>, Fenton-like and O<sub>3</sub>/Fenton-like hybrid systems. *Dyes and Pigments*, Vol. 77, P. 24-30.
- Yu, G., Wen, X., Li, R. and Qian, Y (2006). In vitro degradation of a reactive azo dye by crude ligninolytic enzymes from nonimmersed liquid culture of *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry*, Vol. 41, P. 1987-1993.
- Zaharia., C Y Seteu, D (2012). Textile Organic Dyes- Characteristics, Polluting Effects and Separation/Elimination Procedures from Industrial Effluents- A Critical Overview. En Puzyn, T y Szlichtyng /Ed.), *A. Organic Pollutans Ten Years After the Stockhol Convention*, P. 58-64.

- Zerbinati, O., Vincenti, M., Pittavino, S., Gennaro, M (1997). Fate of aromatic sulfonates in fluvial environment. *Chemosphere*, Vol. 35, P. 2295-2305.
- Zhang, J. Ye, P, Chen, S, Wang, W (2007). Removal of pentachlorophenol by immobilized horseradish peroxidases. *International Biodeteriorology and Biodegradation*, Vol. 59, P. 307-314.
- Zhou, Y. Lu, S. X. Xu, W. G (2009). Photocatalytic Activity of Nd-Doped ZnO for the Degradation of C.I. Reactive Blue 4 in Aqueous Suspension. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, Vol. 28, P. 226-233.
- Zollinger H (2001). *Color Chemistry: Syntheses, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments*. John Wiley and Sons, 3a edición.

## 9 ANEXOS

### ANEXO 1 MODELO ESTADÍSTICO QUE SE UTILIZÓ PARA LAS DOS FUENTES DE PEROXIDASA

25 °C 6 h	25 °C 2 h	50 °C 2 h	37.5 °C 4 h	50 °C 6 h	BLOQUE	Temperatura		pH	Tiempo de contacto horas	Dosis de enzima µl	Dosis de peróxido µl	Colorante mg/L	Decoloración (soya)		Decoloración (chayote)
						°C	unidades						%	%	
1					1	25	7.5	6	1000	2000	60	41.9		61.3	
					2	50	3.5	6	1000	2000	10	48.1		89.6	
2					3	25	7.5	6	2000	1000	60	50.6		67	
					4	50	7.5	6	2000	2000	10	49.6		60.7	
					3	50	3.5	6	2000	1000	10	50		87	
1					6	25	3.5	2	2000	2000	10	38.5		76.6	
	1				7	50	3.5	2	2000	2000	10	47.7		36.4	
2					8	25	3.5	2	1000	1000	60	36.7		83.2	
3					9	25	3.5	6	2000	1000	10	42.8		46.3	
					4	50	7.5	6	2000	1000	10	48.8		73.1	
			1		11	37.5	5.5	4	1500	1500	35	36.1		78.4	
			2		12	37.5	5.5	4	1500	1500	35	38.9		70.5	
			3		13	25	7.5	2	2000	2000	10	35.2		77.3	
4					14	25	7.5	6	2000	2000	60	78.8		81.5	
					15	25	7.5	2	1000	2000	10	46.2	15 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		
					16	50	3.5	6	1000	1000	10	44.3		87.7	
5				5	17	25	3.5	6	1000	2000	10	46.9		52.9	
6					18	25	7.5	6	2000	1000	10	51.9		82.6	
7					19	25	3.5	6	2000	2000	10	46		80.5	
					20	50	3.5	2	2000	1000	60	55		85.9	
	2				21	25	3.5	2	1000	2000	60	33.2		86.1	
					22	25	3.5	2	1000	1000	10	43.4		82.2	
					23	25	7.5	2	2000	1000	10	11.2 Enzima		31.4	
8					24	25	7.5	6	1000	2000	10	40.8		52.4	
					25	50	3.5	2	1000	1000	10	45.7		76.6	
					6	26	50	7.5	6	1000	2000	60	43.6		53.6
					7	27	50	7.5	6	2000	1000	60	51.1		51.1
9					28	25	3.5	6	1000	2000	60	40.8		67.5	
					29	25	7.5	2	1000	1000	10	46		40.5	
8					30	50	3.5	2	1000	2000	60	51.7		59	
	4				31	25	7.5	6	2000	2000	10	43.7		44	
10					32	25	3.5	2	2000	1000	10	47		45	
					8	33	50	3.5	6	2000	2000	10	56.2		89.2
					3	34	37.5	5.5	4	1500	1500	35	37.1		73.5
					9	35	25	7.5	2	2000	1000	60	50.8		73.9
					4	36	37.5	5.5	4	1500	1500	35	36		80.6
					5	37	37.5	5.5	4	1500	1500	35	34		87.4
					5	38	50	7.5	2	2000	1000	10	54.4		31.8
					10	39	50	3.5	6	2000	2000	60	55.5		55.5
11					40	25	3.5	6	2000	2000	60	47.4		81.8	
					6	41	50	3.5	2	1000	1000	60	48.5		70.4
					10	42	25	3.5	2	1000	2000	10	44.3		33.4
12					43	25	3.5	6	1000	1000	10	56.2		85.4	
					11	44	50	7.5	6	1000	1000	60	43.6		44.2
					12	45	50	7.5	6	1000	1000	10	58.5		72.2
13					46	25	7.5	6	1000	1000	10	41.6		84.7	
					7	47	50	7.5	2	1000	2000	10	51.4		64.8
					11	48	25	7.5	2	1000	1000	60	39.7		33
					12	49	25	7.5	2	1000	2000	60	41.4		28.7
					13	50	50	7.5	6	1000	2000	10	67.4		70.9
					8	51	50	3.5	6	1000	2000	60	55.4		80.6
					8	52	50	3.5	2	2000	2000	60	51.6		84.2
					15	53	50	3.5	6	2000	1000	60	55.3		82.7
14					54	25	7.5	6	1000	1000	60	54.3		70.6	
					13	55	25	3.5	2	2000	2000	60	31.9		62.1
					16	56	50	3.5	6	1000	1000	60	50.3		84.2
					9	57	50	7.5	2	2000	2000	10	48.8		43.5
					10	58	50	3.5	2	2000	1000	10	53.3		50.3
					11	59	50	3.5	2	1000	2000	10	39.4		50.7
					17	60	50	7.5	6	2000	2000	60	66.5		85.8
					12	61	50	7.5	2	2000	1000	60	45.3		57.4
					13	62	50	7.5	2	2000	2000	60	43.9		69.1
					14	63	50	7.5	2	1000	1000	60	42.6		81
					15	64	50	7.5	2	1000	2000	60	44.9		56.9
					6	65	37.5	5.5	4	1500	1500	35	32.6		80.2
					14	66	25	7.5	2	2000	2000	60	50.4		17.6
					16	67	50	7.5	2	1000	1000	10	44		47.2
15					68	25	3.5	2	2000	1000	60	29.7		62.3	
					69	25	3.5	6	1000	1000	60	35.7		56.2	
16					70	25	3.5	6	2000	1000	60	62.7		56.2	