



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
Ingeniería Ambiental – Agua

**TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES PROVENIENTES
DE LA INDUSTRIA TEXTIL UTILIZANDO PEROXIDASAS
DEL FRIJOL DE SOYA**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN INGENIERÍA

PRESENTA:
M. I. Erika Viviana Miranda Mandujano

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Gabriela E. Moeller Chávez - Facultad de Ingeniería

COMITÉ TUTORAL
Dr. Germán Buitrón Méndez – Instituto de Ingeniería
Dr. Marco Antonio Garzón Zúñiga – Instituto Politécnico Nacional CIIDIR-Durango

CIUDAD DE MÉXICO, Febrero 2018



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.

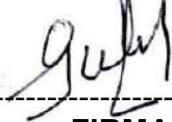
JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Germán Buitrón Méndez
Secretario: Dr. Marco Antonio García Zúñiga
Vocal: Dra. Maria del Carmen Durán Domínguez
1^{er}. Suplente: Dra. Georgina Fernández Villagómez
2^{do}. Suplente: Dra. Gabriela Eleonora Moeller Chávez

Lugar donde se realizó la tesis: Instituto Mexicano de Tencología del Agua **(IMTA)**

TUTOR DE TESIS:

NOMBRE



FIRMA

(Segunda hoja)

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (**UNAM**), a la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería (**DEPFI, UNAM**) Campus Morelos y al Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (**IMTA**), por las facilidades otorgadas para realizar este trabajo de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**), por el apoyo otorgado a través de la beca de posgrado para concluir mis estudios de Doctorado.

A mi **familia** por su amor y apoyo incondicional para superarme cada día.

A mi tutora, por su enseñanza, dedicación y el más sincero apoyo para concluir esta etapa de mi desarrollo profesional, así como a cada uno de los integrantes del comité tutorial y sinodales por sus comentarios y aportaciones para la realización de esta tesis.

A todos y cada uno de mis compañeros y amigos que aportaron un pedacito de este trabajo, mi más sincera gratificación por su apoyo incondicional.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
GLOSARIO DE TÉRMINOS	x
RESUMEN /ABSTRACT	xi
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Hipótesis.....	3
1.2 Objetivo.....	3
1.3 Objetivos específicos.....	3
1.4 Alcances.....	3
2 INDUSTRIA TEXTIL.....	4
2.1 Generación de aguas residuales de la industria textil.....	5
2.2 Impacto ambiental de los efluentes textiles.....	7
2.3 Colorantes empleados en la industria textil	8
2.3.1 Colorantes azo.....	12
2.4 Legislación y normatividad para las descargas de aguas residuales	13
2.5 Tecnologías para el tratamiento de colorantes presentes en efluentes de la industria textil.....	13
2.5.1 Tratamiento de colorantes mediante procesos biológicos	16
2.5.1.1 Proceso aerobio	16
2.5.1.2 Proceso anaerobio.....	17
2.5.1.3 Proceso acoplado anaerobio-aerobio.....	17
2.5.2 Tratamiento de colorantes mediante procesos físico/químicos	18
2.5.2.1 Adsorción.....	18
2.5.2.2 Membranas de filtración.....	19
2.5.2.3 Coagulación-Floculación.....	19
2.5.2.4 Ozonación.....	20
2.5.2.5 Reactivo de Fenton.....	21
2.5.2.6 Procesos electroquímicos.....	21
2.6 Métodos enzimáticos para el tratamiento de efluentes coloreados	23
2.6.1 Peroxidasas	27
2.6.1.1 Clasificación de las peroxidasas.....	28
2.6.1.1.1 Estructura de las peroxidasas.....	29
2.6.1.2 Mecanismo de reacción	32
2.6.1.3 Factores que influyen sobre la actividad de la peroxidasa	33
3 MATERIALES Y MÉTODOS	34

3.1 Reactivos químicos y estándares	36
3.2 Extracto crudo y enzimas con actividad peroxidasa	36
3.3 Valoraciones enzimáticas	36
3.3.1 Valoración de la proteína total	36
3.3.2 Determinación de la actividad enzimática	37
3.4 Métodos analíticos	38
3.4.1 Determinación de la concentración del AD2 por espectrofotometría.....	38
3.4.2 Determinación de las concentraciones por cromatografía de líquidos (<i>HPLC</i> , en inglés).....	39
3.4.3 Pruebas de toxicidad.....	41
4 OBTENCIÓN DE EXTRACTO PARCIALMENTE PURIFICADO	42
4.1 Soya (<i>Glycine max</i>)	43
4.1.1 <i>OKARA</i> , residuo de soya procesada.....	44
4.2 Metodología	45
4.2.1 Obtención del extracto crudo enzimático	46
4.2.1 Purificación parcial del extracto enzimático	48
4.3 Resultados y discusión	49
4.3.1 Extracto crudo enzimático.....	49
4.3.2 Extracto enzimático con actividad peroxidasa	50
5 DEGRADACIÓN DEL COLORANTE AZUL DIRECTO 2	53
5.1 Metodología	54
5.1.1 Preparación del extracto crudo enzimático	54
5.1.2 Agua sintética	54
5.1.3 Estrategia experimental para la decoloración del AD2 y diseño de experimentos utilizado	55
5.2 Resultados y discusión	56
5.2.1 Tiempo de reacción	58
5.2.2 Valor de pH y temperatura.....	59
5.2.4 Mejor concentración de colorante	61
5.2.5 Optimización del proceso de decoloración	62
5.3 Constantes cinéticas	65
5.4 Pruebas de toxicidad	66
6 TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DE UN EFLUENTE TEXTIL	68
6.1 Metodología	69
6.1.1 Agua residual de la industria textil.....	69
6.1.2 Estrategia experimental para la decoloración de un efluente textil.....	70
6.2 Resultados y discusión	71
6.2.1 Caracterización de los efluentes textiles	71
6.2.2 Cinéticas de degradación del colorante AD2 presente en el efluente textil.....	75
6.2.3 Pruebas de toxicidad.....	78

7 POSTRATAMIENTO QUÍMICO.....	79
7.1 Metodología.....	80
7.1.1 Estrategia experimental	80
7.2 Resultados y discusión	82
7.2.1 Mejores condiciones para eliminar color.....	82
8 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	86
8.1 Conclusiones	86
8.2 Recomendaciones	87
ARTÍCULOS PUBLICADOS.....	88
TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS	89
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

Nota: Esta tesis usa el punto decimal (DOF, 2009)

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1 ESTRUCTURAS QUÍMICAS CON REPRESENTACIÓN DE GRUPOS CROMÓFOROS Y AUXOCROMÓFOROS (GUPTA Y SUHAS, 2009).....	9
FIGURA 2.2 ESTRUCTURA DEL GRUPO HEMO EN LA <i>HRP</i>	30
FIGURA 2.3 ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA PEROXIDASA <i>HRP</i>	31
FIGURA 2.4 CICLO DE ÓXIDO-REDUCCIÓN DE LA PEROXIDASA <i>HRP</i> (BERGLUND <i>ET AL.</i> , 2002).....	32
FIGURA 3.1 DIAGRAMA DE LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	35
FIGURA 3.2 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LAS PROTEÍNAS	37
FIGURA 3.3 ESPECTRO DE ABSORBANCIA Y ESTRUCTURA DEL AD2	38
FIGURA 3.4 RECTA DE CALIBRACIÓN DEL COLORANTE AD2 POR ESPECTROFOTOMETRÍA.....	39
FIGURA 3.5 PRODUCTOS RESULTANTES DE LA DEGRADACIÓN DEL AD2	40
FIGURA 3.6 RECTAS DE CALIBRACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA: (A) AD2, (B) BENCIDINA, (C) 4-AMINOBIFENILO (CONTINUACIÓN)	41
FIGURA 4.1 VARIEDADES DE SOYA PRODUCIDAS EN EL MUNDO.....	43
FIGURA 4.2 RESIDUO INDUSTRIAL DE SOYA (<i>OKARA</i>)	45
FIGURA 4.3 RESIDUO INDUSTRIAL DE SOYA HÚMEDO Y SECO	46
FIGURA 4.4 <i>OKARA</i>	46
FIGURA 4.5 PROCESO DE OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO.....	47
FIGURA 4.6 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO PARA LA PURIFICACIÓN PARCIAL DEL EXTRACTO CRUDO	48
FIGURA 4.7 MUESTRAS DE RESIDUO INDUSTRIAL A) RESIDUO INDUSTRIAL HOMOGENEIZADO DURANTE 15 H B) EXTRACTO CRUDO DE PEROXIDASA OBTENIDO	50
FIGURA 4.8 ELUCIÓN DE PROTEÍNAS	50
FIGURA 4.9 PERFIL DE ELUCIÓN DE CII : (■) PEROXIDASA U/L, (♦) ABSORBANCIA A 280 NM	51
FIGURA 4.10 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL EXTRACTO CRUDO (A) Y SU PURIFICACIÓN PARCIAL (B).....	51
FIGURA 4.11 CINÉTICAS REPRESENTATIVAS EN LA PURIFICACIÓN PARCIAL DE EXTRACTO CRUDO: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA U/L (♦), CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS MG/ML (■)	52
FIGURA 5.1 SISTEMA EXPERIMENTAL PARA ESTUDIOS DE DEGRADACIÓN DEL COLORANTE AD2 USANDO UNA ENZIMA OBTENIDA DE UN RESIDUO DE SOYA.....	56
FIGURA 5.2 GRÁFICO DE EFECTOS PRINCIPALES PARA LA DECOLORACIÓN.	57
FIGURA 5.3. GRÁFICO DE RESPUESTA DEL TIEMPO DE REACCIÓN.....	58
FIGURA 5.4. GRÁFICO DE RESPUESTA DE TEMPERATURA Y PH	59
FIGURA 5.5 GRÁFICO DE RESPUESTA DE DOSIS DE ENZIMA Y PERÓXIDO.....	60
FIGURA 5.6 MUESTRAS AL FINAL DE LA REACCIÓN EN FUNCIÓN DE LA DOSIS DE PERÓXIDO.....	60
FIGURA 5.7 GRÁFICO DE RESPUESTA DE CONCENTRACIÓN DE COLORANTE	61
FIGURA 5.8 MUESTRAS AL FINAL DE LA REACCIÓN EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL AD2.....	61
FIGURA 5.9 MUESTRAS AL INICIO Y FINAL DEL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO	62

FIGURA 5.10 ESPECTRO UV-VIS DEL COLORANTE A UNA CONCENTRACIÓN DE 40 MG/L DE SOLUCIÓN DE AD2 ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.....	63
FIGURA 5.11 CROMATOGRAMAS DE LA SOLUCIÓN DE AD2 ANTES (A) Y DESPUÉS (B) DEL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.....	64
FIGURA 5.12 PERFIL DE LA OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DEL AD2 MEDIDA POR HPLC: (♦) AD2; (■)BENCIDINA; (▲) 4-AMINOBIFENIL	64
FIGURA 5.13. DECOLORACIÓN DEL COLORANTE AD2 EN PRUEBAS EN DISCONTINUO A LAS CONCENTRACIONES INICIALES: (○) 10 MG/L; (◇) 20 MG/L; (□) 30 MG/L; (x) 40 MG/L;	65
FIGURA 6.1. DESCARGA GENERAL A) LAVANDERÍA DE MEZCLILLA B) INDUSTRIA TEXTIL	69
FIGURA 6.2 SISTEMA EXPERIMENTAL PARA EL TRATAMIENTO DEL EFLUENTE TEXTIL	70
FIGURA 6.3. UBICACIÓN DE LA ZONA DE MUESTREO: SANTA ANA XALMIMILULCO, PUEBLA, MÉXICO, INCLUYENDO LA DESCARGA DEL EFLUENTE GENERAL	71
FIGURA 6.4. EFLUENTE GENERAL DE LA LAVANDERÍA DE MEZCLILLA EN SANTA ANA, XAMIMILULCO, PUEBLA, MÉXICO	71
FIGURA 6.5. TOMA DE MUESTRAS DEL EFLUENTE GENERAL.....	72
FIGURA 6.6. UBICACIÓN DE LA ZONA DE MUESTREO EN CIVAC Y DESCARGA DEL EFLUENTE GENERAL	74
FIGURA 6.7. PROCESO DE ELABORACIÓN DE HILOS Y TEÑIDO	74
FIGURA 6.8. TANQUE DE ALMACENAMIENTO DE AGUA RESIDUAL DE UNA DE LAS INDUSTRIAS EN ESTUDIO.....	75
FIGURA 6.9. EFICIENCIAS DE DECOLORACIÓN OBTENIDAS DEL TRATAMIENTO DEL EFLUENTE TEXTIL.....	76
FIGURA 6.10. ESPECTRO UV-VIS DEL COLORANTE A UNA CONCENTRACIÓN DE 40 MG/L INFLUENTE Y EFLUENTE DEL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO	77
FIGURA 6.11. DECOLORACIÓN DEL EFLUENTE TEXTIL CON RESPECTO AL TIEMPO.....	77
FIGURA 6.12. MUESTRAS DEL EFLUENTE TEXTIL AL INICIO Y FINAL DEL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO	78
FIGURA 7.1. PRUEBA DE REACTORES COMPLETAMENTE MEZCLADOS UTILIZADOS EN EL PROCESO DE FENTON	81
FIGURA 7.2 GRÁFICO DE EFECTOS PRINCIPALES DEL TRATAMIENTO TIPO FENTON.....	82
FIGURA 7.3 GRÁFICO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA PARA LA DECOLORACIÓN DE LOS EFLUENTES	83
FIGURA 7.4 ESPECTRO UV-VIS DEL TREN DE TRATAMIENTO ENZIMÁTICO-FENTON	84
FIGURA 7.5. MUESTRAS DEL TREN DE TRATAMIENTO PARA LA DECOLORACIÓN DEL AD2	84

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 2.1 CONTAMINANTES GENERADOS EN LOS PRINCIPALES PROCESOS DE LA INDUSTRIA TEXTIL (WORLD BANK GROUP, 2011).....	6
TABLA 2.2 CLASIFICACIÓN DE LOS COLORANTES DE ACUERDO CON SU GRUPO CROMÓFORO	10
TABLA 2.3 CLASIFICACIÓN DE LOS COLORANTES DE ACUERDO CON SU FORMA DE APLICACIÓN	11
TABLA 2.4 PORCENTAJE DE COLORANTE NO FIJADO QUE PUEDE SER DESCARGADO EN EL EFLUENTE, COMPARACIÓN DE VALORES ENTRE LA EPA Y LA OECD (HESSEL <i>ET AL.</i> , 2007)	12
TABLA 2.5 ANÁLISIS DE 7 DE LOS PARÁMETROS MÁS REPRESENTATIVOS PARA LA INDUSTRIA TEXTIL DE ACUERDO CON CADA PAÍS. ADAPTADO DE HESSEL <i>ET AL.</i> , (2007).....	14
TABLA 2.6 PROCESOS FÍSICOS EMPLEADOS EN EL TRATAMIENTO DE LOS EFLUENTES DE LA INDUSTRIA TEXTIL	22
TABLA 2.7 PROCESOS QUÍMICOS EMPLEADOS EN EL TRATAMIENTO DE LOS EFLUENTES DE LA INDUSTRIA TEXTIL.....	22
TABLA 2.8 PROCESOS BIOLÓGICOS EMPLEADOS EN EL TRATAMIENTO DE LOS EFLUENTES DE LA INDUSTRIA TEXTIL	23
TABLA 2.9 ENZIMAS Y SU PRINCIPAL APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE COMPUESTOS RECALCITRANTES	25
TABLA 2.10 TRABAJOS REALIZADOS CON LAS PRINCIPALES ENZIMAS EMPLEADAS EN EL TRATAMIENTO DE LOS COLORANTES AZO	27
TABLA 2.11 COMPARACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOQUÍMICAS Y ESTRUCTURALES DE LA <i>HRP</i> Y LA <i>SBP</i> (RYAN <i>ET AL.</i> , 2006)	31
TABLA 3.1 REACTIVOS Y ESTÁNDARES EMPLEADOS EN LA INVESTIGACIÓN.....	36
TABLA 4.1 VARIEDAD DE SOYA CULTIVADA EN MÉXICO (SAGARPA, 2009).....	44
TABLA 4.2 CONDICIONES PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTO CRUDO ENZIMÁTICO	49
TABLA 4.3 PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA PEROXIDASA A PARTIR DE RESIDUOS DE SOYA PROCESADA, <i>OKARA</i>	52
TABLA 5.1 PROPIEDADES FISCOQUÍMICAS Y ESTRUCTURA MOLECULAR DEL AD2 (COBOS, 2013)	54
TABLA 5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS MEJORES PARÁMETROS DE OPERACIÓN PARA EL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO	55
TABLA 5.3 COEFICIENTE DE REGRESIÓN PARA DECOLORACIÓN	57
TABLA 5.4 DISEÑO OPTIMIZADO DEL PROCESO DE DECOLORACIÓN DEL AD2	62
TABLA 5.5. PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA DEGRADACIÓN DEL COLORANTE AD2 A DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES.....	66
TABLA 5.6 PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EMPLEANDO <i>VIBRIO FISCHERI</i>	67
TABLA 6.1. MEJORES CONDICIONES DE OPERACIÓN PARA LA DECOLORACIÓN DEL AD2 EN AGUA DESIONIZADA	70
TABLA 6.2 CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GENERAL DE LA LAVANDERÍA DE MEZCLILLA EN ESTUDIO.....	73
TABLA 6.3. CARACTERIZACIÓN DEL EFLUENTE GENERAL DE LA INDUSTRIA COOPERANTE.....	75
TABLA 6.4. VALORES OBTENIDOS PARA LA PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EMPLEANDO <i>VIBRIO FISCHERI</i> EN EL INFLUENTE Y EFLUENTE TEXTIL DESPUÉS DEL TRATAMIENTO.....	78

TABLA 7.1. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE OPERACIÓN PARA EL TRATAMIENTO TIPO FENTON	81
TABLA 7.2. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE OPERACIÓN PARA EL TRATAMIENTO TIPO FENTON	84
TABLA 7.3. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE OPERACIÓN PARA EL TRATAMIENTO DE TIPO FENTON.....	85

GLOSARIO DE TÉRMINOS

4-AAP	4 aminoantipirina
ABTS	Compuesto químico empleado para determinar cinéticas de reacción (<i>2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)</i>)
AD2	Azul Directo 2
APx	Ascorbato peroxidasa
CcP	Citocromo-c peroxidasa
CE₅₀	Concentración efectiva media
ci	Concentración inicial
CII	Cromatografía de intercambio iónico
CIVAC	Ciudad Industrial del Valle de Cuernavaca
CP	Catalasa peroxidasa
cf, ct	Concentración final, a un tiempo t determinada
DAD	Detector de arreglo de diodos
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
DEAE53-cellulose	Dietil-aminoetilcelulosa 53 en inglés
DQO	Demanda química de oxígeno
EC	Concentración efectiva en inglés
ECCACIV	Empresa para el control de la contaminación de Aguas de CIVAC.
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (cromatografía de líquidos de alta resolución en inglés)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (peroxidasa de rábano picante en inglés)
HRP-C	Isoenzima C de rábano picante por sus siglas en inglés
LC₅₀	Concentración letal media en inglés
LiP	Lignina peroxidasa
MnP	Manganeso peroxidasa
N-Total	Nitrógeno total
OKARA	Pulpa blanca o amarillenta formada por las partes insolubles de la soya.
PAO	Procesos avanzados de oxidación
P-Total	Fósforo total
SBP	<i>Soybean peroxidase</i> (Peroxidasa de soya en inglés)
SDT	Sólidos disueltos totales
Soya	Semilla oleaginosa (<i>Glycine max</i>) conocida en inglés como <i>soybean</i>
SST	Sólidos suspendidos totales cursivas
UT	Unidades de toxicidad
VP	<i>Versatile peroxidase</i> (Peroxidasa versátil en inglés)

RESUMEN /ABSTRACT

En este trabajo se evaluó la capacidad catalítica de una peroxidasa para llevar a cabo la decoloración del colorante azul directo 2 y un efluente de la industria textil con presencia de colorantes azo. La investigación fue dividida en 2 etapas. La primera estuvo orientada a la extracción y purificación parcial de la enzima peroxidasa a partir de un residuo industrial de soya. La obtención de enzimas con actividad peroxidasa se llevó a cabo empleado cromatografía de intercambio iónico, obteniendo fracciones con actividad de 15 ± 5 U/L. En la segunda etapa, se estudio la capacidad catalítica de la peroxidasa de soya parcialmente purificada sobre la decoloración del colorante Azul Directo 2. Parámetros tales como: tiempo de contacto, pH, temperatura, dosis de enzima, dosis de peróxido y concentración de colorante fueron evaluados, para determinar las mejores condiciones de operación en el tratamiento enzimático, a través de un diseño factorial 2^6 utilizando el programa *STATGRAPHICS* para el manejo de datos. De acuerdo con los resultados obtenidos, el mayor porcentaje de decoloración fue del 73% trabajando a concentraciones mayores de 40 mg/L, valores de pH de 5.5, temperatura de 40°C con un tiempo de reacción de 4 horas. Para la determinación y cuantificación de la degradación del colorante Azul Directo 2 así como de los productos de la degradación se utilizó cromatografía de líquidos de alta precisión, siendo identificadas 2 aminas aromáticas; bencidina y 4-aminobifenilo. Con el propósito de evaluar si los productos de degradación son tóxicos, se realizaron pruebas de toxicidad empleando *Vibrio fischeri*. Las pruebas mostraron un incremento en la toxicidad después del tratamiento enzimático obteniendo 4 UT. Finalmente, empleando las mejores condiciones de operación para la decoloración del Azul Directo 2 se evaluó la capacidad oxidativa del extracto enzimático en la decoloración de un efluente del proceso de teñido de una industria textil. La mayor eficiencia obtenida fue del $52 \pm 2\%$. Se atribuye esto a la gran variedad de aditivos, fijadores y suavizantes que se emplean para la etapa de teñido. En las pruebas de cromatografía de líquidos de alta precisión únicamente se logró cuantificar bencidina en los productos de degradación. La pruebas de toxicidad al inicio y final del tratamiento no presentaron diferencias significativas. Esto se debe principalmente a que los tratamientos enzimáticos son específicos de un sustrato. Considerando la eficiencias de decoloración y el aumento de toxicidad en los efluentes, se evaluó como alternativa de tratamiento el proceso de Fenton, logrando con ello cerca de un 80% de decoloración del colorante residual y la eliminación de toxicidad.

Palabras clave: Aguas residuales coloridas, industria textil, peroxidadas, soya (*Glycine max*).

In this work, the catalytic capacity of peroxidase to carry out the Direct Blue dye 2 decolourization of an effluent from the textile industry with the presence of azo dyes was evaluated. The research was divided into 2 stages. The first was oriented to the extraction and partial purification of the enzyme peroxidase from an industrial soybean residue. Obtain enzymes with peroxidase activity the use of ion exchange chromatography, obtaining fractions with activity of 15 ± 5 U / L was carried out. In the second stage, the catalytic capacity of the partially purified soybean peroxidase for the Direct Blue dye 2 decolourization was studied. Parameters such as: contact time, pH, temperature, enzyme dose, peroxide dose, and dye concentration were evaluated. To determine the best operating conditions in the enzymatic treatment, a 2^6 factorial design using the STATGRAPHICS program for data management was applied. According to the results, the highest percentage of discoloration was 73% working at concentrations higher than 40 mg / L, pH values of 5.5, temperature of 40°C with a reaction time of 4 hours. For the determination and quantification of the degradation of the Direct Blue dye 2 as well as, the products of the degradation, liquid chromatography of high precision was used. Two aromatic amines, benzidine, and 4-aminobiphenyl were identified. In order to assess whether the degradation products are toxic, toxicity tests were performed using *Vibrio fischeri*. The tests showed an increase in toxicity after the enzymatic treatment obtaining 4 UT. Finally, using the best operating conditions for Direct Blue 2 decolourization, the oxidative capacity of the enzymatic extract was evaluated in the decolourization of an effluent from the dyeing process of a cooperating textile industry. The highest efficiency obtained was $52 \pm 2\%$, attributed to the great variety of additives, fixatives, and softeners that are used for the dyeing stage. In the high-precision liquid chromatography tests only benzidine was quantified in the degradation products. The toxicity tests at the beginning and at the end of the treatment did not present significant differences. This is mainly because the enzymatic treatments are specific to a substrate. Considering the decolourization efficiencies and the increase of toxicity in the effluents, the Fenton process was evaluated as an alternative treatment, achieving about 80% residual dye decolourization and the elimination of toxicity.

Key Words: Colored wastewater, textile industry, peroxidases, soybean (*Glycine max*).

1 INTRODUCCIÓN

La industria textil es una de las principales fuentes de contaminantes para el agua a nivel mundial debido al volumen y composición de sus efluentes, los cuales son caracterizados por ser típicamente calientes, alcalinos y coloreados (Kumar *et al.*, 2007; Srinivasan y Viraraghavan, 2010). Los principales contaminantes presentes en estas aguas residuales son: compuestos químicos que implican altos valores de demanda química de oxígeno (DQO), sólidos suspendidos, aceites minerales, compuestos orgánicos (Kaushik y Malik, 2009) y también pueden estar presentes concentraciones significativas de metales pesados como: cromo, cobre, zinc, níquel o plomo provocando un efecto carcinogénico y genotóxico (World Bank Group, 2011).

El impacto ambiental que causa este sector es variado pero el color es el primer signo contaminante que se observa en sus aguas residuales, encontrando concentraciones de colorante desde 1 g/dm^3 (Kaushik y Malik, 2009) provocando reducción de la transparencia y disminución del oxígeno disuelto, dificultando la función fotosintética y causando cambios en la biota acuática. Por otra parte, muchos de estos colorantes presentan toxicidad aguda o crónica en los ecosistemas (Dallago *et al.*, 2005).

Los colorantes azo constituyen la familia más importante entre los colorantes industriales. Estos son compuesto xenobióticos recalcitrantes caracterizados por la presencia de uno o más grupos azo $-N=N-$ (Prato y Buitrón 2012). Se conoce que la cantidad de colorante que se pierde en el efluente depende de la clase de aplicación utilizada variando desde 2 al 50% siendo descargados a cuerpos receptores sin previo tratamiento (dos Santos *et al.*, 2007).

La eliminación de los colorantes azoicos de las aguas residuales textiles es un tema relevante en el tratamiento de aguas ya que se ha reportado que el uso de un solo proceso

no es eficiente para la degradación del color y la mineralización de los compuestos que se forman (Buitrón *et al.*, 2004; Supaka *et al.*, 2004). Los procesos biológicos han sido considerados como alternativas efectivas para el tratamiento de efluentes coloreados (Melgoza *et al.*, 2004; Rai *et al.*, 2005), pero la necesidad de aclimatación, los tiempos elevados de residencia y el carácter recalcitrante de algunos colorantes y auxiliares de manufactura, constituyen en la actualidad una de las mayores limitantes encontradas para su operación estable (Hai *et al.*, 2007). Los procesos físicos (Gupta y Suhas, 2009), químicos (Verma *et al.*, 2012) y oxidación avanzada, tales como ozonación (Muthukumar y Selvakumar, 2004), reactivo tipo Fenton (Gutowska *et al.*, 2007) y foto Fenton (Prato y Buitrón, 2012), han presentado la capacidad para decolorar soluciones de colorantes por oxidación, pero los altos costos de inversión y operación los han limitado en su aplicación.

Una alternativa de tratamiento es el empleo de enzimas con actividad peroxidasa en la degradación oxidativa de compuestos coloreados, cuando no pueden ser eliminados por tratamientos biológicos o físicos (Akhtar *et al.*, 2005a; Husain, 2006; Matto y Husain 2007; Mohan *et al.*, 2005), ya que presentan ventajas por ser altamente selectivas, catalizando un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos ya sea por precipitación o por la apertura de la estructura del anillo aromático, son menos probables de inhibir por sustancias que pueden ser tóxicas para los organismos vivos, su costo y tiempo de retención podrían llegar a ser inferiores a la de otros métodos de tratamiento (Boscolo *et al.*, 2006; Geng *et al.*, 2001; Husain 2009; Kamal y Behere 2002, 2003).

En la actualidad se han reportado varios trabajos sobre el tratamiento enzimático empleando peroxidasas para la remoción de colorantes azo en solución acuosa, utilizando diferentes condiciones de operación, logrando porcentajes de decoloración entre el 50 al 90% (de Souza *et al.*, 2007; Marchis *et al.*, 2011; Mohammad *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012; Villalobos y Buchanan, 2002; Villegas *et al.*, 2003). A pesar de la variedad de fuentes de obtención y aplicación de la peroxidasa, no hay trabajos reportados sobre la utilización de un residuo industrial de soya con actividad peroxidasa para su aplicación en la decoloración de colorantes presentes en las descargas de la industria textil, ya que la mayoría de las investigaciones se han enfocado en la peroxidasa extraída del rábano picante (*HRP*) (Gupta y Suhas, 2009; Verma *et al.*, 2012).

En este trabajo se plantea la determinación de las mejores condiciones de operación: (pH, temperatura, dosis de peróxido, concentración de colorante, tiempo de reacción), bajo las cuales el extracto enzimático obtenido de un residuo industrial de soya logra su mayor capacidad catalítica para la decoloración de un efluente de la industria textil con presencia del colorante Azul Directo 2 (AD2).

1.1 Hipótesis

Mediante las peroxidasas obtenidas a partir de un residuo industrial del procesamiento del frijol de soya es posible decolorar efluentes del proceso de teñido de la industria textil que emplean colorantes tipo azo.

1.2 Objetivo

Evaluar la capacidad catalítica de la enzima peroxidasa (obtenida a partir de un residuo industrial del procesamiento del frijol de soya) en la decoloración de efluentes de la industria textil que emplean el colorante azo AD2.

1.3 Objetivos específicos

- ✓ Implementar una técnica adecuada para la obtención de un extracto crudo y purificación parcial de enzimas oxidoreductasas.
- ✓ Determinar los mejores parámetros para alcanzar la mayor actividad catalítica de la enzima utilizando agua sintética.
- ✓ Identificar los productos de degradación que se generan durante las reacciones de oxidación mediante cromatografía de líquidos (*HPLC*, en inglés).
- ✓ Evaluar la actividad catalítica de la enzima peroxidasa en la oxidación de un efluente textil real con presencia de colorante azo.
- ✓ Evaluar la toxicidad de los efluentes generados.
- ✓ Proponer una alternativa de descontaminación del efluente si así lo requiriera.

1.4 Alcances

- ✓ El trabajo experimental se llevó a cabo en reactores a escala laboratorio.
- ✓ En las pruebas para la determinación de parámetros óptimos se utilizó como sustrato agua sintética, preparada con el colorante AD2.
- ✓ Se realizó la validación de los parámetros óptimos obtenidos utilizando un efluente general de una industria textil específica.

2 INDUSTRIA TEXTIL

La importancia del control de la contaminación del agua en los últimos años ha incrementado debido al deterioro ambiental causado por el crecimiento demográfico e industrial haciendo que cada día cobren mayor importancia los residuos generados en los distintos procesos industriales. En México, solamente las áreas urbanas generan 228.7 m³/s de agua residual. Los datos precisos indican que en nuestro país se generan 7.21 km³/año de agua residual proveniente de las ciudades y 6.67 km³/año de agua de otras fuentes, principalmente las descargadas por la industria. De las cuales únicamente tienen cobertura de tratamiento un 36% de las aguas residuales municipales y un 15% las industriales (SEMARNAT-CONAGUA, 2015).

Los aportes de contaminantes del sector industrial están concentrados en un número limitado de actividades entre las que destaca la industria textil. Las industrias relacionadas con el giro textil representan una de las más grandes y complicadas cadenas productivas debido a la heterogeneidad de sus productos. En el 2010 en México se produjeron 122,422 toneladas de fibras químicas para uso textil. De ellas el 85.8% corresponden a fibras sintéticas, principalmente, poliéster filamentado textil, poliéster fibra corta y nylon filamentado textil. Para este mismo año se reportó que sumaban 14,950 los establecimientos del sector textil y del vestido en México (INEGI, 2011).

La industria textil es considerada como uno de los principales generadores de contaminantes de agua y desechos peligrosos, debido a que en el proceso de fabricación incluye una serie de etapas que provocan una seria contaminación del ambiente, los principales puntos de generación de contaminantes están centrados en el manejo de materiales peligrosos, emisiones al aire, residuos sólidos y líquidos, consumo de energía y generación de grandes cantidades de aguas residuales altamente coloreadas y constituidas

por compuestos recalcitrantes (Amjad y Qayyum, 2007). Los datos reportados para la Zona Metropolitana del Valle de México señalan que las empresas textiles representan el 14% de las empresas instaladas a nivel nacional y las aguas residuales generadas por estas empresas corresponden a 1,600,901 m³/año de las cuales el 54%, 861,937, m³/año son descargadas sin previo tratamiento (Prato, 2009).

En México, la producción de colorantes ha ido en aumento debido a las altas demandas de los productos textiles. Aunado a esto, la incorporación de colorantes textiles cada vez más resistentes provoca la generación de elevados volúmenes de efluentes fuertemente coloreados, constituidos por moléculas complejas que deben ser degradadas antes de su vertido. Por lo anterior, la industria textil es una de las mayores fuentes de aguas residuales altamente contaminantes alrededor del mundo (dos Santos *et al.*, 2007).

2.1 Generación de aguas residuales de la industria textil

La problemática de los efluentes textiles no sólo está asociada a la presencia de colorantes, en la industria textil son bastante notables los elevados consumos de agua 150-350 L/kg de fibra, la fijación variable de los colorantes y la presencia de compuestos auxiliares químicos tóxicos que conducen a una serie de problemas operativos en los sistemas de tratamiento (IPPC, 2003; Schönberger y Schäfer, 2002; Sponza, 2006).

La composición de los efluentes generados en esta industria es muy variable, de acuerdo con la categoría de producción (Zeybek *et al.*, 2007). El agua residual de este sector es típicamente alcalina y presenta concentraciones de DBO₅ que puede variar de 700 a 2000 mg/L y una demanda química de oxígeno (DQO), aproximadamente de 2 a 5 veces el valor de DBO₅ (Kaushik y Malik, 2009).

Los efluentes de los procesos de teñido son típicamente calientes y coloreados. Los principales contaminantes presentes son: sólidos suspendidos, aceites minerales, compuestos orgánicos (incluyendo fenoles y orgánicos halogenados de solventes usados en el blanqueado), también están presentes concentraciones significativas de metales pesados: cromo, cobre, zinc, níquel ó plomo (World Bank Group, 2011). En el proceso de fabricación de la fibra natural el agua residual puede contener pesticidas y contaminantes microbiológicos como (bacterias, hongos y otros patógenos).

En la Tabla 2.1 se presentan las características típicas de efluentes de los principales procesos que constituyen la industria textil.

Tabla 2.1 Contaminantes generados en los principales procesos de la industria textil (World Bank Group, 2011)

PROCESO	CARACTERÍSTICAS TÍPICAS DEL EFLUENTE
LAVADO	En el proceso de lavado de la fibra (especialmente lana) se usa agua caliente para remover los sólidos, grasas y otros contaminantes. El efluente de este proceso es altamente alcalino y aporta concentraciones significativas de DBO ₅ y DQO, desinfectantes e insecticidas, NaOH, aceites, grasas, pectinas, cera, lubricantes y solventes gastados.
DESCRUDE	Las operaciones en este proceso pueden generar efluentes con concentraciones significativas de materia orgánica y sólidos. Las cargas de DBO ₅ y DQO oscilan entre el 35 y 50% de la carga total y las concentraciones de DQO puede llegar a ser de 20,000 mg/L.
BLANQUEADO	En este proceso se utilizan agentes blanqueadores. El peróxido es el más utilizado para blanquear algodón. El uso de blanqueadores a base de cloro puede producir halógenos orgánicos (debido a reacciones secundarias) y causa concentraciones significativas de halógenos orgánicos absorbibles (AOX) en particular trihalometanos. El blanqueado con hipoclorito de sodio representa la preocupación más importante de este proceso.
MERCERIZADO	Durante el mercerizado la fibra de algodón reacciona con una solución de sosa cáustica y un tratamiento de lavado de agua caliente elimina la solución cáustica de la fibra. Esta solución se neutraliza con ácido, seguido de un número de lavados para eliminarlo. Las aguas residuales del mercerizado son altamente alcalinas.
TEÑIDO	Las aguas residuales generadas en el teñido presentan alta coloración por la presencia de colorantes o pigmentos, metales (como: cobre, cromo, zinc, cobalto y níquel), aminas (producidas por los colorantes azo bajo condiciones de reducción), agentes químicos usados como auxiliares en la formulación del colorante (agentes antiespumantes y dispersantes) y en el proceso de teñido (álcalis, sales y agentes reductivos). Los efluentes del proceso de teñido se caracterizan por tener relativamente altas concentraciones de DQO y bajas concentraciones de DBO ₅ habitualmente por encima de los 5000 mg/L. Las concentraciones de sal (por ejemplo, en el uso de un colorante reactivo) pueden variar entre 2000 y 3000 mg/L.
IMPRESIÓN	Los componentes del agua residual generada en esta etapa están constituidos por pigmentos (partículas insolubles) ó bien colorantes, resinas y antiespumantes que se utilizan para darle solidez al color y solventes que se utilizan únicamente con los pigmentos. El aspecto de este efluente es aceitoso y están presentes en él altas concentraciones de compuestos orgánicos volátiles (COV).

2.2 Impacto ambiental de los efluentes textiles

Aunque la industria textil representa una parte relativamente pequeña de la industria química, es importante el impacto ambiental que producen los efluentes que se generan. Para evaluar los efectos nocivos que pueden causar los colorantes si son descargados en un cuerpo receptor hay que considerar, entre otros, los siguientes factores: Las concentraciones de los colorantes descargados en los efluentes industriales y el tipo de molécula descargada, la toxicidad a macro y microorganismos en el cuerpo de agua y su posible acumulación en las cadenas alimenticias y en el ambiente (Leist, 1982).

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 (IPPC, 2003; EPA, 1996). Sin embargo, es reconocido que los efectos más negativos sobre los cuerpos de agua y las plantas de tratamiento están asociados con los productos de fisión del enlace azo y a los agentes de tinción (Sponza, 2006).

El mayor impacto ambiental se asocia con las emisiones de contaminantes tanto hacia el agua como hacia el aire (Mattioli *et al.*, 2005). 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 (IPPC, 2003; Mattioli *et al.*, 2005; Schöberger y Schäfer, 2002).

En el mundo existen más de 100,000 colorantes disponibles comercialmente (Robinson *et al.*, 2001). Un 90% de los colorantes se comercializan en cantidades inferiores a 100 t/año y sólo un 1% lo hacen en cantidades mayores de 1000 t/año (O'Neill *et al.*, 1999). La exigencia actual de la industria textil radica en la búsqueda de colorantes con estabilidad química y fotolítica. Se diseñan colorantes resistentes a la ruptura debida a la exposición a la luz, agua, jabones. Un 2% de la producción mundial de colorantes se pierde en el efluente en procesos de fabricación (O'Neill *et al.*, 1999), mientras que un 10-15% se pierde en los procesos de tinción, como consecuencia de la incompleta fijación de los colorantes a las fibras. Este porcentaje representa la descarga de 200 t/d de estos compuestos al ambiente (Guaratini y Zanoni, 2000). Este porcentaje depende en gran medida del tipo de colorante y fibra que participan en la tinción, alcanzando valores desde 5% para tintes básicos hasta 50% para tintes reactivos (McMullan *et al.*, 2001). Valores del orden de mg/L de colorantes en las aguas son visibles para el ojo humano. Para algunas clases de colorantes ese valor disminuye a 0.005 mg/L en un cauce limpio (Gutiérrez y Crespi, 1999). Todas estas características hacen que el vertido de efluentes de la industria textil se haya convertido en un problema ecológico y toxicológico a nivel mundial.

El primer efecto que causa el vertido de aguas residuales con colorantes disueltos es el visual y se presenta a concentraciones muy bajas de colorante. 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 con los efluentes textiles son debidos a la presencia de metales pesados ó azufre, que producen problemas ambientales debido a su naturaleza tóxica.

Los riesgos toxicológicos de los colorantes sobre la salud humana están relacionados con el modo y tiempo de exposición. Estos compuestos presentan una baja toxicidad aguda, que es la resultante de los tiempos de exposición cortos. 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 y Zanoni, 2000). Se ha comprobado que algunos colorantes de naturaleza azoica presentan un carácter cancerígeno potencial, y al menos 3000 colorantes azo comerciales han sido catalogados como cancerígenos (Guaratini y Zanoni, 2000). Su toxicidad radica en que pueden dar lugar a las aminas aromáticas de las cuales derivan, debido a procesos de oxidación, hidrólisis ó reducción del enlace azo. Algunas aminas aromáticas utilizadas en la fabricación de los tintes son carcinógenos reconocidos (Weisburger, 2002). Aun así, el análisis del grado de toxicidad de los colorantes, medido a partir de 50% de la dosis letal (LD_{50}) ha demostrado que apenas un número reducido de colorantes presenta toxicidad aguda ($LD_{50} < 5$ g/kg) y son principalmente colorantes azo y básicos (Shore, 1996). Estudios más completos señalan que de 3000 colorantes investigados solamente 3% de ellos presentó valores de concentración letal (LC_{50} , en inglés) inferiores a 10 mg/L en peces y al menos el 60% presentaban valores de LC_{50} mayores a 100 mg/L (Chung *et al.*, 1978; IPPC, 2003; Pinheiro *et al.*, 2004). Es importante reconocer que la toxicidad de un efluente textil no solamente depende del colorante, sino que implica a su vez el efecto aditivo y/o sinérgico y/o antagónico de los diversos agentes presentes durante el proceso de tinción.

2.3 Colorantes empleados en la industria textil

El color es el primer signo contaminante que se observa en las aguas residuales. Este es proporcionado, tanto por colorante como por pigmentos. Ambos se diferencian por sus características de solubilidad. Los colorantes son compuestos solubles que se aplican principalmente a materiales textiles en disolución acuosa y los pigmentos son compuestos insolubles, que se incorporan a productos tales como pinturas, tintas de imprenta ó plásticos (Christie, 2003).

La industria de los colorantes constituye, aproximadamente, el 6% de la producción total del sector industrial. En términos absolutos esto supuso, en 1974, una producción mundial de unas 750,000 Ton/año de colorantes. Sólo unos pocos colorantes o pigmentos tienen una demanda superior a 1000 Ton/año; 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 (Herbst y Hunger 1997; Zollinger, 2001).

El consumo por aplicaciones es el siguiente:

- Industria textil: 60%
- Pinturas y tintas (pigmentos): 25%
- Resto de aplicaciones (papel, cuero, alimentos y otras): 15%

Las moléculas de los colorantes están constituidas por dos grupos fundamentales: El grupo cromóforo, responsable de producir el color y auxocromóforo (Figura 2.1), el cual hace que las moléculas sean más solubles y den mayor afinidad hacia las fibras (Gupta y Suhas 2009).

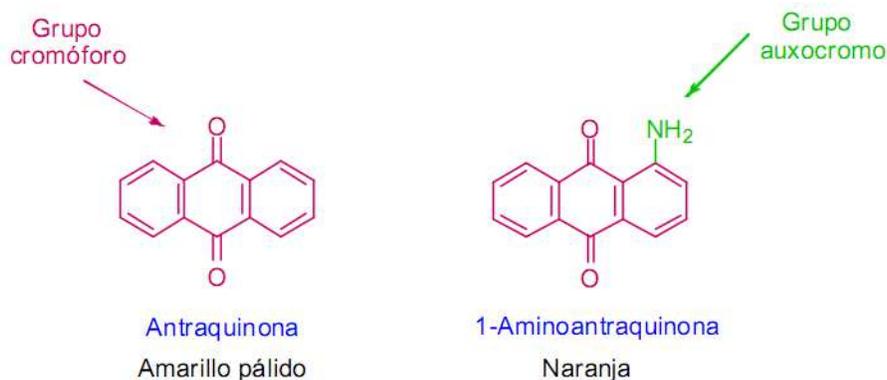


Figura 2.1 Estructuras químicas con representación de grupos cromóforos y auxocromóforos (Gupta y Suhas, 2009)

Los colorantes usados en la industria textil son de diversos tipos y pueden ser clasificados dependiendo de varios factores, tales como su estructura química (Tabla 2.2), clase de aplicación (Tabla 2.3) ó uso final. Cada tipo de colorante presenta características físicas, químicas y biológicas diferentes, que les atribuyen propiedades recalcitrantes y efectos tóxicos para el ambiente.

Tabla 2.2 Clasificación de los colorantes de acuerdo con su grupo cromóforo

(EPA 1996; Gupta y Suhas 2009; Hunger, 2003; Husain 2006; O' Neil *et al.*, 1999; Robinson *et al.*, 2001)

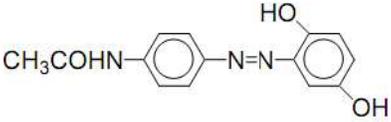
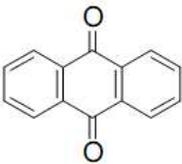
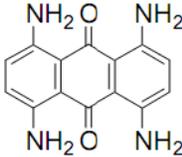
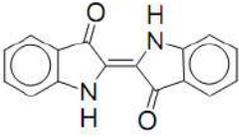
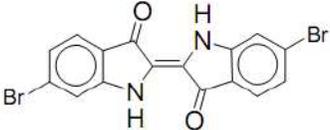
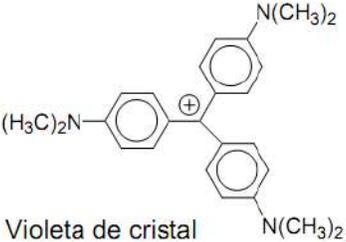
FAMILIA	GRUPO CROMÓFORO	DESCRIPCIÓN	EJEMPLO
Azoicos	$Ar-N=N-Ar$ Grupo azo	Estos colorantes se caracterizan por tener un grupo funcional azo, consistente en un enlace doble $-N=N-$ unido a átomos de carbono. En cuanto a sus propiedades de color, aportan un rango de matices prácticamente completo y alta intensidad de color. Presentan buenas propiedades técnicas: solidez a la luz, al calor, al agua y a otros disolventes.	 <p>Amarillo disperso 3</p>
Antraquinonas	 <p>Antraquinona</p>	Los colorantes a base de antraquinonas y quinonas aromáticas policíclicas tienen gran importancia ya que son colorantes ácidos con solidez a la luz, mordentes y dispersos	 <p>Tetraaminoantraquinona</p>
Indólicos	 <p>Índigo</p>	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 biodegradación 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	 <p>Púrpura de tiro</p>
Trihalometanos	 <p>Catión trifenilmetilo</p>	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	 <p>Violeta de cristal</p>

Tabla 2.3 Clasificación de los colorantes de acuerdo con su forma de aplicación

(EPA 1996; Gupta y Suhas 2009; Hunger, 2003; Husain 2006; O' Neil *et al.*, 1999; Robinson *et al.*, 2001)

CLASE	SOLUBILIDAD	PRODUCTO QUÍMICO PRINCIPAL	APLICACIONES	PROBABLES CONTAMINANTES
Ácidos	Solubles en agua	Tipo azo, antraquinona, trihalometano	Nylon, lana, seda, acrílicos modificados y también en cierta medida para el papel, el cuero, la impresión de chorro de tinta, los alimentos y cosméticos	Ácidos orgánicos, aminas aromáticas
Básicos	Soluble en agua	Tipo azo, antraquinona, oxazina, triarilmetano	Papel, nylon, poliéster modificado, también se utiliza para la seda, la lana y el algodón	Ácidos orgánicos, aminas aromáticas
Dispersos	Estos son colorantes no iónicos insolubles en agua	Contienen azoicos, antraquinona, nitro y grupos benzodifuranona	En poliéster y en cierta medida nylon, celulosa, acetato de celulosa y fibras de acrílico	Sales, surfactantes, fosfatos, lubricantes, dispersantes
Directos	Solubles en agua aniónicos	Contienen poliazos, ftalocianinas y oxazinas	Algodón, rayón, cuero y en cierta medida en nylon	Aminas aromáticas, sales, surfactantes
Reactivos	Solubles en agua	Contienen grupos cromóforos como azo, antraquinona, triarilmetano, ftalocianina	Generalmente se utilizan para el algodón y otros materiales celulósicos, pero también se utiliza en menor medida en lana y nylon	Aminas aromáticas, sales, surfactantes
Sulfurados	Solubles en agua	No poseen una estructura determinada	Algodón y rayón, tienen un uso limitado con fibras de poliamida, seda, cuero, papel y madera	Aminas aromáticas, álcalis, agentes oxidantes y reductores
Mordentes	Solubles en agua	Azo y antraquinona	Lana y seda	Aminas aromáticas, sales orgánicas, halogenados, metales pesados, color no fijado

2.3.1 Colorantes azo

Los colorantes azo constituyen la familia más importante entre los colorantes industriales. Se caracterizan por tener un grupo funcional azo, consistente en un enlace doble $-N=N-$, unido a átomos de carbono. Generalmente el grupo azo se une a dos anillos aromáticos. 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.

Los colorantes azo son considerados el grupo más importante de colorantes debido principalmente a: 1) síntesis relativamente sencilla, 2) versatilidad estructural, 3) habilidad para enlazarse a la mayoría de las fibras sintéticas naturales y 4) gran potencial para cubrir el espectro visible (Melgoza, 2003; Melgoza *et al.*, 2004; Pandey *et al.*, 2007).

Este grupo se subdivide con relación al número de grupos azo presentes en la molécula del colorante: Mono-azoico con un grupo azo, Di-azoico con dos grupos azo, Tri-azoico con tres grupos azo, Poli-azoico con cuatro o más grupos azo. En la Tabla 2.4 se muestra una comparación de los porcentajes de colorante no fijado a las fibras reportado por la EPA y la OECD (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico), los cuales son descargados en el efluente (Hessel *et al.*, 2007).

Tabla 2.4 Porcentaje de colorante no fijado que puede ser descargado en el efluente, comparación de valores entre la EPA y la OECD (Hessel *et al.*, 2007)

COLORANTES	EPA %	OECD %
Ácidos	10-20	7-20
Básicos	1	2-3
Directos	30	5-20
Dispersos	5-25	8-20
Azoicos	25	5-10
Reactivos	50-60	20-50
Sulfurosos	25	30-40
Tina	25	5-20

Es importante reconocer que la toxicidad de un efluente textil no sólo depende del colorante sino que implica a su vez el efecto aditivo y/o sinérgico y/o antagónico de los diversos agentes presentes durante el proceso de tinción.

2.4 Legislación y normatividad para las descargas de aguas residuales

En México las descargas de aguas residuales municipales e industriales están reguladas por Normas Oficiales Mexicanas. NOM-001-SEMARNAT-1996, NOM-002-SEMARNAT-1996, NOM-003-SEMARNAT-1996. En el país existe una escasa cobertura de infraestructura en sistemas de tratamiento de aguas residuales para la remoción de contaminantes aportados por la industria, debido a las características que las descargas presentan, provocando que los procesos se vean limitados tanto técnica como económicamente, disminuyendo con esto la eficiencia de remoción de contaminantes. No obstante, las descargas de diferentes giros industriales en la mayoría de los casos cumplen con los parámetros establecidos por estas normas tan laxas, provocando que los contaminantes específicos de cada giro puedan incorporarse a los cuerpos receptores deteriorando el ambiente acuático y causando la pérdida de flora y fauna, así como las limitaciones de uso del cuerpo receptor (Saldaña *et al.*, 2001).

Países como EE.UU. y Canadá cuentan con legislación ambiental más segura. Algunos países de Europa como Francia, Austria e Italia tienen valores límites para las descargas de efluentes coloreados. Sin embargo, debido a que estos países utilizan unidades diferentes para su estimación, hace imposible una comparación. En Francia, las unidades que utilizan para realizar su determinación son mg/L en la escala Pt-Co.

En la Tabla 2.5 se presenta un resumen de los límites máximos permisibles para la descarga de residuos líquidos a cuerpos de agua superficial establecidos en diferentes países, considerando 7 de los parámetros más importantes para la industria textil, tales como: Color mg/L Pt-Co, demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅), demanda química de oxígeno (DQO), sólidos suspendidos (SS), salinidad (cloruro o sulfato), detergentes, grasas y aceites (Hessel *et al.*, 2007). Se observa que en México únicamente están normados 3 de los 7 parámetros, a diferencia de países como Italia, Venezuela y Francia que cuentan con una normatividad más rigurosa.

2.5 Tecnologías para el tratamiento de colorantes presentes en efluentes de la industria textil

El tratamiento de aguas residuales de la industria textil es un problema ambiental al que se le ha dado mucha atención, ya que muchos colorantes textiles son tóxicos y no

biodegradables y, en consecuencia, son descargados a canales y ríos permaneciendo en el ambiente.

Tabla 2.5 Análisis de 7 de los parámetros más representativos para la industria textil de acuerdo con cada país. Adaptado de Hessel *et al.*, (2007)

PAÍS	Color	DBO ₅	DQO	SS	Cloruros o sulfatos	Detergentes	Grasas y aceites
	mg/L Pt-Co	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
Alemania		25	160	20	150		0
Argentina		50		5		5	
Austria		20	150	30		1	
Bélgica		70	350	100	2000		20
Canadá				30			
Quebec		15		30	1500		15
Chile		300	900	300	4000		50
China		30	100	30		10	20
Checoslovaquia		85	75	90			
Francia	100	30	125	30			20
Hungría		60	150	100	1500	10	
India		30	250	100			10
Indonesia		50	100	200		5	5
Italia		40	160	80	1200	2	20
Japón		120	120	1510			10
México		30		40			15
Portugal		40	150	60	1	2	
Singapur		20	60	30	400	5	
Sudáfrica			75	25	250		50
Suiza		20	10	20			20
Tailandia		60	400	30	600		
Trinidad y Tobago		30	250	50	250		10
Turquía		150					
Venezuela		60	350	80	1000	2	20

LMP para descargas de aguas residuales a cuerpos receptores regulados por : Normatividades, Reglamentos, Leyes o Decretos vigentes.	
No especificado	

Muchos de los colorantes que existen en el mercado son xenobióticos, por lo que con frecuencia se necesita más de un proceso biológico de tratamiento para su remoción total y los subproductos generados en la remoción de colorantes, conocidos como metabolitos (aminas aromáticas, algunas potencialmente carcinogénicas), presentan problemas de toxicidad, lo que hace indispensable la mineralización del colorante (Prato, 2009; Sponza 2006; Vandevivere *et al.*, 1998).

Existen diferentes métodos físico-químicos y biológicos que pueden ser aplicados para remover colorantes de las aguas residuales. Cada método tiene sus limitaciones técnicas y económicas. Se ha reportado en la literatura que el uso de un solo proceso no es eficiente para la degradación del color y la mineralización de los compuestos que se forman, y el uso de un solo proceso biológico anaerobio o aerobio no es efectivo para la degradación o remoción del colorante (Buitrón *et al.*, 2003; Shaul *et al.*, 1991; Supaka *et al.*, 2004).

2.5.1 Tratamiento de colorantes mediante procesos biológicos

Los procesos biológicos por su costo son los tratamientos más utilizados en la remoción de colorantes presentes en los efluentes industriales (Barragán *et al.*, 2007; Bromley-Challenor *et al.*, 2000; Dos Santos *et al.*, 2007; Frijters *et al.*, 2006; Van der Zee y Villaverde 2005;). En los procesos biológicos, los colorantes azo generalmente han sido considerados como compuestos recalcitrantes. Sin embargo, el éxito comprobado en el tratamiento de diversos contaminantes tóxicos, constituyen una de las alternativas más interesantes para la degradación de efluentes textiles complejos (Buitrón *et al.*, 2004; Pandey *et al.*, 2007; Rai *et al.*, 2005; van der Zee y Villaverde, 2005).

2.5.1.1 Proceso aerobio

Pocos estudios han reportado que los colorantes azo pueden ser utilizados por las bacterias aerobias como fuente de carbono y energía. Por lo general, los tratamientos aerobios basados en consorcios de bacterias en sistemas convencionales no son capaces de degradar colorantes procedentes de efluentes textiles (Robinson *et al.*, 2001). Sin embargo se ha conseguido aislar cepas de bacterias que son capaces de degradar algunos colorantes (Buitrón *et al.*, 2004; Davies *et al.*, 2006; Li y Bishop, 2004; McMullan *et al.*, 2001; Quezada *et al.*, 2000). Varios autores han reportado que la aparición de microzonas anaerobias en los procesos aerobios han facilitado la decoloración vía reductiva (Jian y Bishop, 1994; Khalid *et al.*, 2008; Stolz, 2001). Es importante resaltar que la degradación de los metabolitos generados a partir de colorantes puede ser realizada mediante este proceso; sin embargo, se requieren largos periodos de aclimatación (Ekici *et al.*, 2001; Haug *et al.*, 1991). Trabajos realizados por Jian y Bishop en 1994 y Ghoropade y Spancer en 1993 reportan que en el tratamiento de los colorantes Anaranjado Ácido 7 (AA7), Anaranjado

Ácido 8 (AA8), Rojo Ácido 18 (RA18), entre otros, se han degradado pero difícilmente se ha podido llegar a su mineralización teniendo largos tiempos de reacción. Ars-Alaton *et al.*, (2009), Tan *et al.*, (2005) y Khehra *et al.*, (2005) manifiestan que los largos periodos de aclimatación se relacionan con la presencia de compuestos aromáticos sulfonados, los cuales resultan recalcitrantes a los procesos de tratamiento. Buitrón *et al.*, (2004) demostraron que es factible la mineralización del colorante Rojo Ácido 151 (RA151) mediante un consorcio aerobio, enfatizando en la necesidad de largos periodos de aclimatación y una baja robustez del proceso frente a los cambios de concentración.

2.5.1.2 Proceso anaerobio

Este proceso ha sido empleado en gran medida para el tratamiento de colorantes ya que ha demostrado una gran eficiencia de decoloración (Delee *et al.*, 1998; Forgacs *et al.*, 2004; Rai *et al.*, 2005). La decoloración de compuestos azo mediante este proceso no es considerada específica debido a que diversas cepas pueden romper el enlace azo de manera eficiente (van der Zee y Villaverde, 2005). En un estudio de Razo-Flores *et al.*, (1996) se reportó que dos colorantes azoicos se redujeron y decoloraron en condiciones anaerobias utilizando lodos granulares. Otro estudio (Van der Zee *et al.*, 2001) demostró la viabilidad de la aplicación de lodos granulares anaerobios para la decoloración de 20 colorantes azoicos.

Cabe destacar que algunos parámetros tales como: tipo de reactor, tiempo de residencia hidráulica, origen y estrategia de aclimatación del inóculo, presencia de mediadores redox, así como el tipo y la concentración de co-sustrato son factores clave en la eficiencia de decoloración (Melgoza *et al.*, 2004; Quezada *et al.*, 2000; Van der Zee y Cervantes 2009; Van der Zee y Villaverde, 2005). Algunas de las desventajas de este tratamiento es que la remoción de DBO puede ser insuficiente, los colorantes y otros compuestos refractarios no se mineralizan, además de que los macronutrientes presentes en las aguas residuales como N y P no se remueven mediante este sistema y los sulfatos dan lugar a sulfuros.

Aunque la reducción anaerobia de colorantes azo es más satisfactoria que la degradación aerobia, los productos generados presentan mayor toxicidad que los compuestos originales. Estos compuestos son denominados metabolitos (aminas aromáticas), las cuales pueden ser oxidadas en un proceso aerobio convencional.

2.5.1.3 Proceso acoplado anaerobio-aerobio

Cuando se conocen las bondades, capacidades y limitaciones de los tratamientos biológicos (aerobio, anaerobio y anóxico), es conveniente utilizar las ventajas encontradas en cada uno de ellos y combinarlas en tratamientos que se denominan acoplados. Los tratamientos acoplados (anaerobio-aerobios) son una buena alternativa para el tratamiento de estos

efluentes como señalan: Garzón-Zúñiga *et al.* (2011), López-Ayala (2004), Melgoza (2003), Cruz *et al.* (1996). Una ventaja de este sistema es la mineralización completa que a menudo se logra gracias a la acción sinérgica de diferentes organismos (Stolz, 2001). Además, la reducción del enlace azo se puede lograr en las condiciones de reducción en biorreactores anaerobios (Brown y Laboureur, 1983b) y el resultante, aminas aromáticas incoloras pueden ser mineralizadas en condiciones aerobias (Brown y Laboureur, 1983a), lo que hace atractivo a la combinación de estos procesos anaerobio-aerobio. Esta combinación podría llevarse a cabo de diversas formas; por ejemplo, mediante reactores secuenciales, mediante el uso de biopelículas, lodos granulares o biomasa inmovilizada como lo indica la literatura (Buitrón *et al.*, 2004; Cruz y Buitrón, 2000; Garzón-Zúñiga *et al.*, 2011; Jian y Bishop, 1994; Kudlich *et al.*, 1996; Stolz, 2001; Tan *et al.*, 1999; Van der Zee y Villaverde, 2005).

Las principales desventajas de este tratamiento son los tiempos de residencia elevados en fase anaerobia, requerimientos de cepas específicas para degradar colorantes específicos, uso de co-sustratos y la persistencia de las aminas aromáticas (Ahmad *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2009; Supaka *et al.*, 2004; Van der Zee y Villaverde, 2005).

2.5.2 Tratamiento de colorantes mediante procesos físico/químicos

2.5.2.1 Adsorción

La eficacia del proceso de adsorción está influenciada por una gran variedad de parámetros, entre ellos la interacción entre el colorante y soporte, superficie específica, tamaño de la partícula, temperatura, pH o tiempo de contacto. La eficacia del método depende en gran medida del tipo de soporte elegido. Se emplean tanto soportes inorgánicos como orgánicos. Los primeros tienen una gran estabilidad mecánica y química, alta superficie específica y alta resistencia a la degradación microbiana. Los soportes orgánicos se generan a partir de fuentes renovables o son residuos industriales.

Varios estudios han adoptado en la actualidad el proceso de adsorción para tratar el agua residual de la industria textil, empleando adsorbente sintéticos y naturales (Chatterjee *et al.*, 2010; Geethakarthis y Phanikumar, 2011). La eficiencia de la adsorción de varios materiales radica en los problemas de regeneración (Li *et al.*, 2009). El carbón activado es un adsorbente ampliamente utilizado para la decoloración de efluentes con presencia de colorantes azo ya que presenta altos porcentajes de remoción, pero debido a los altos costos limita su escalamiento (Malik, 2004; Wang *et al.*, 2010). En investigaciones recientes se ha llevado a cabo remoción de colorantes empleando adsorbentes de bajo costo incluyendo aserrín (Malik, 2004; Ozacar y Sengil, 2005), residuos de la agricultura (Nigam *et al.*, 2000), arcilla roja (Namasivayam y Arasi, 1997; Wang *et al.*, 2005), dolomita (Walker

et al., 2003), ceniza (Mall *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2005) y concha de ostra (Qiu-Yue *et al.*, 2010), siendo una de las soluciones a esta limitante. Los adsorbentes sintéticos basados en resinas sílicas, debido a la facilidad de síntesis y regeneración ha sido empleada como un adsorbente para la descontaminación de efluentes textiles (Chen *et al.*, 2010; Kamboh *et al.*, 2011 a,b). La decoloración de efluentes textiles está basada en la interacción entre la superficie del adsorbente y el contaminante adsorbido a través de enlaces químicos, de hidrógeno, hidrofóbicos así como de fuerzas de van der Waals (Parida *et al.*, 2006).

Kamboh *et al.* (2014), reportaron la adsorción del colorante Negro Directo 38 empleando una resina sílica sintetizada logrando un 91% de decoloración. Shirzad-Siboni *et al.* (2014), investigaron la remoción del colorante negro reactivo 5 utilizando conchas de ostra como medio adsorbente logrando porcentajes de decoloración del 99.91% a 72.14% para concentraciones de 20 a 500 mg/L.

2.5.2.2 Membranas de filtración

Los métodos de tratamiento basados en el empleo de membranas permiten una separación efectiva de las moléculas de colorante y otros compuestos de tamaño mayor al del poro de la membrana seleccionada. Los métodos, tales como microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración u ósmosis inversa son altamente eficientes. En ellos se logran tratar grandes volúmenes de efluente en continuo de un modo rápido y satisfactorio. Pero estos tratamientos están limitados por algunas desventajas como su elevado costo, aplicabilidad limitada, alto consumo de energía, producción de lodos y subproductos tóxicos (Cheremisinoff, 2002; De Souza *et al.*, 2007; Gupta y Suhas 2009).

2.5.2.3 Coagulación-Floculación

El proceso de coagulación-floculación se basa en la adición de polielectrolitos ó agentes floculantes inorgánicos (sales de hierro o aluminio), que forman flóculos o flocs con las moléculas de colorante facilitando su eliminación por sedimentación (Mishra *et al.*, 2006; Yue *et al.*, 2008). Este proceso es eficiente al tener altos porcentajes de remoción de color; sin embargo, el proceso genera 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 (Shi *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2008). Este proceso no es eficiente para colorantes altamente solubles y el resultado con colorantes azoicos, ácidos, reactivos generalmente no son muy buenas (Hai *et al.*, 2007). Esto es debido al desarrollo de colorantes más resistentes que provocan dificultades para la selección de un coagulante apropiado (Yu *et al.*, 2002). En general, la remoción de color disminuye con el incremento de la concentración y la solubilidad del colorante (Bouyakoub

et al., 2009; Zahrim *et al.*, 2010). Por tanto, es necesario determinar las condiciones de operación para cada tipo de colorante. Sin embargo, la efectividad del proceso de coagulación-floculación radica en la elección apropiada del agente coagulante, del agente floculante y de los parámetros tales como: tiempo de mezclado y tiempo de sedimentación (Verma *et al.*, 2012).

Zahrim y Hilal (2013), investigaron el tratamiento del Negro Ácido 210 empleando el proceso de coagulación-floculación seguido de una filtración y nanofiltración para mejorar la calidad del efluente, logrando eficiencias de decoloración del 99.7% para concentraciones de 4000 mg/L, sin embargo una de las dificultades encontradas en este trabajo fue el ensuciamiento excesivo de las membranas. Ciabatti *et al.* (2010), Choo *et al.* (2010), Anouzla *et al.* (2009) y Kang *et al.* (2007) emplearon 5 diferentes coagulantes en concentraciones de 10 a 200 mg/L, para decolorar colorantes azo dispersos, obteniendo porcentajes de remoción del 79 al 99%. Gao *et al.* (2007), Sanghi *et al.* (2006), Georgiou *et al.* (2003), Golob *et al.* (2005) y Kim *et al.*, 2005, emplearon cloruro de magnesio, cloruro férrico y sulfato ferroso como coagulantes en concentraciones de 290 a 400 mg/L logrando porcentajes de decoloración del 75 al 90%.

2.5.2.4 Ozonación

Las técnicas de ozonación consisten en la descomposición de compuestos con base en 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.*, 2006; Wu *et al.*, 2008;). Sundrarajan *et al.* (2007) reportaron en sus investigaciones que la aplicación de ozono para la remoción de colorantes reactivos amarillo y azul se puede lograr con un tiempo de reacción de 5 min con un consumo de ozono de 37.5 y 36 mg/L respectivamente, logrando porcentajes de decoloración mayores al 90%.

La decoloración del azul reactivo 15 fue estudiado por Wu *et al.* (2008) en un reactor semicontinuo, encontrando que las reacciones llevadas a cabo fueron de primer orden. Los autores observaron que la ozonación es efectiva para remover materia oxidable medida como DQO. Algunos autores sugieren que este proceso puede ser utilizado para la reutilización o “reúso” del agua ya que puede llegar a remover el color en su totalidad y la DQO hasta cierto punto. Sin embargo, debe comprobarse la toxicidad de cada efluente, pues en algunos casos, los compuestos generados tienen mayor carácter tóxico que los colorantes de partida (Gutiérrez y Crespi, 1999). Otra gran desventaja de la ozonación es su corto tiempo de vida media, aproximadamente de 20 min, lo cual repercute fuertemente en el costo del proceso (Robinson *et al.*, 2001). Lu *et al.* (2009), reportan el uso de ozono para la decoloración del colorante rojo reactivo brillante empleando un tiempo de 120 min con

una concentración de ozono de 34 mg/L, logrando porcentajes de decoloración del 97%. De Souza *et al.* (2010) emplearon un tratamiento combinado ozonación/biológico trabajando a concentraciones de 500 mg/L logrando eficiencias de decoloración del 96%. Zhang *et al.* (2013) estudiaron la eficiencia de decoloración del Rojo Reactivo 2 por el proceso de ozonación catalizado con ion ferroso ($O_3/Fe(II)$) en un reactor en lote; los resultados indicaron que la ozonación del colorante es una reacción irreversible de segundo orden, logrando un 95% de decoloración a concentraciones de 50 y 80 mg/L con dosis de Fe(II) de 0.9 mM.

2.5.2.5 Reactivo de Fenton

El reactivo de Fenton es una combinación de H_2O_2 y sales de Fe(II). El ion ferroso se oxida a férrico mientras el H_2O_2 produce iones hidróxido y radicales hidroxilo. Estos últimos oxidan al colorante y el compuesto formado precipita con el ion férrico y compuestos orgánicos (Meric *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008). Los procesos de Fenton han sido aplicados satisfactoriamente en el tratamiento de efluentes con presencia de contaminantes recalcitrantes (Elmorsi *et al.*, 2010; Pignatello *et al.*, 2006; Safarzadeh *et al.*, 1997; Sun y Pignatello, 1992). Los tiempos de reacción mediante los cuales se ha logrado decolorar los efluentes textiles están en el rango de 5 hasta 300 min (Kang *et al.*, 2002; Kusic *et al.*, 2009; Papadopoulos *et al.*, 2007; Park *et al.*, 1999; Pignatello *et al.*, 2006). En general este tratamiento es eficiente en la decoloración de colorantes solubles como insolubles, los colorantes a la tina han presentado una resistencias ante este proceso (Kim *et al.*, 2005). Este proceso también es aplicado incluso con altas concentraciones de sólidos. Los principales inconvenientes de este tratamiento es que suele ser eficaz en un estrecho rango de pH menor a 3.5 (Cheng *et al.*, 2004). Sus principales desventajas son la generación de lodos debida a la floculación de los reactivos con el colorante y el costo de los reactivos.

2.5.2.6 Procesos electroquímicos

Los procesos electroquímicos se basan en la hidrólisis del colorante mediante un potencial ó corriente controlada ó a través de agentes secundarios generados electrolíticamente. Los procesos son limpios, operan a baja temperatura y en muchos casos no requieren la adición de productos químicos a las aguas residuales (Ochoa, 1995). Varios materiales como el hierro, polímeros conductores, electrodos con diamantes dopados con boro con diferentes condiciones experimentales, se han utilizado con éxito en la electro-degradación de los colorantes (Dogan y Turkdemir, 2005; Faouzi *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2007).

Lopes *et al.* (2004) reporta la decoloración del 83 al 100% del colorante rojo directo 80 mediante tres diferentes electrodos. Esta técnica es eficaz en la decoloración de colorantes solubles e insolubles. Sin embargo, los principales inconvenientes son el alto consumo de

energía, producción de lodos, contaminación por compuestos organoclorados y metales pesados debido a la oxidación indirecta (Gupta y Suhas , 2009). En las Tablas 2.6 a 2.8 se presentan las principales ventajas y desventajas de las tecnologías antes mencionadas, con el fin de tener un punto de referencia para la selección de la tecnologías o, en su caso, un sistema de combinación más apropiada para la remediación de los efluentes coloreados.

Tabla 2.6 Procesos físicos empleados en el tratamiento de los efluentes de la industria textil

PROCESO	VENTAJAS	DESVENTAJAS	FUENTE
PROCESOS FÍSICOS			
ADSORCIÓN	<p>Los procesos de adsorción generan efluentes de alta calidad.</p> <p>Aplicable a diferentes colorantes (ácidos, básicos, reactivos)</p> <p>Posibilidad de reutilización del agua dentro del proceso</p> <p>Capacidad de tratamiento del orden de cientos de m³/d</p>	<p>Son procesos lentos; no selectivos, de manera que hay una competencia entre las moléculas del colorante y otros compuestos presentes en el efluente; no destructivos, generándose un residuo que debe ser eliminado. La desorción es un proceso muy difícil y costoso. Los adsorbentes suelen ser caros y, en ocasiones, requieren un proceso de activación previo</p>	<p><i>Allegre et al., 2004</i> <i>Forgacs et al., 2004</i> <i>Gulnaz et al., 2006</i> <i>Hai et al., 2007</i> <i>Rai et al., 2005</i></p>
COAGULACIÓN - FLOCULACIÓN	<p>Este proceso es eficiente al tener altos porcentajes de remoción de color</p> <p>El equilibrio del sistema se alcanza en tiempos cortos de 2-4 horas</p>	<p>El proceso genera lodos que deben ser eliminados. Los mejores rendimientos se logran al aplicar un exceso de coagulante, que aumenta la concentración de contaminante en el efluente. Este proceso no es eficiente para colorantes altamente solubles y el resultado con colorantes azoicos, ácidos, reactivos generalmente no son muy buenos</p>	<p><i>Hai et al., 2007</i> <i>Lee et al., 2006</i> <i>Mishra et al., 2006</i> <i>Shi et al., 2007</i> <i>Wang et al., 2006</i> <i>Yue et al., 2008</i> <i>Zhou et al., 2008</i></p>
MEMBRANAS DE FILTRACIÓN	<p>Aplicable a un número amplio de colorantes</p> <p>Resulta factible con la combinación de procesos biológicos y de oxidación avanzada</p> <p>La fracción de rechazo de la membrana puede ser incinerada favoreciéndole balance energético del proceso</p>	<p>Costo elevado. Altos costos energéticos del tren de tratamiento. Generación de lodos tóxicos. Taponamiento de las membranas. Adsorción del colorante sobre la membrana</p>	<p><i>Gomes et al., 2005</i> <i>Hai et al., 2007</i> <i>Rai et al., 2005</i> <i>Zhang et al., 2009</i></p>

Tabla 2.7 Procesos químicos empleados en el tratamiento de los efluentes de la industria textil

PROCESO	VENTAJAS	DESVENTAJAS	FUENTE
PROCESOS QUÍMICOS			
OXIDACIÓN QUÍMICA	Tiempos de reacción bajos en minutos. Posibilidad de combinación con procesos de oxidación avanzada Aprovechamiento de las sales presentes en el influente Puede ser utilizado como alternativa de pretratamiento económica	Generación de efluentes más tóxicos Costos elevados de materias primas	Aleboyeh <i>et al.</i> , 2009 Li <i>et al.</i> , 2009 Metcalf y Eddy, 2003
OZONACIÓN	Algunos autores sugieren que este proceso puede ser utilizado para la reutilización o "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	Corto tiempo de vida aproximadamente de 20 minutos, lo cual repercute fuertemente en el costo del proceso Los compuestos generados tienen mayor carácter tóxico que los colorantes de partida	Hao <i>et al.</i> , 2000 Robinson <i>et al.</i> , 2001 Soares <i>et al.</i> , 2006 Sundrarajan <i>et al.</i> , 2007 Wu <i>et al.</i> , 2008
FOTO-FENTON	Es eficiente en la decoloración de colorantes solubles como insolubles Tiempo de residencia cortos Formación de lodo mínima Aplicación exitosa en procesos a escala piloto y semi-industrial	Generación de lodos debida a la floculación de los reactivos con el colorante Elevados costos de los reactivos	Cheng <i>et al.</i> , 2004 Meric <i>et al.</i> , 2003 Papadopoulos <i>et al.</i> , 2007 Pignatello <i>et al.</i> , 2006

2.6 Métodos enzimáticos para el tratamiento de efluentes coloreados

Recientemente los tratamientos enzimáticos han presentado mucho interés en la decoloración/degradación de importantes colorantes textiles empleados en la industria como una alternativa estratégica a procesos convencionales, físicos, químicos y biológicos, los cuales poseen serias limitaciones. El tratamiento enzimático es muy prometedor debido a la acción de las enzimas sobre los contaminantes catalizando un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos ya sea por precipitación o por la apertura de la estructura del anillo aromático, incluso cuando estos están presentes en soluciones muy diluidas siendo recalcitrantes a diversos microorganismos que participan en la degradación (Husain, 2006).

Tabla 2.8 Procesos biológicos empleados en el tratamiento de los efluentes de la industria textil

PROCESO	VENTAJAS	DESVENTAJAS	FUENTE
PROCESOS BIOLÓGICOS			
AEROBIOS	Económicos y con una infraestructura disponible en algunos casos Capacidad de tratamiento del orden de m ³ /d Impacto ambiental bajo	El mecanismo primario de remoción es la adsorción sobre la pared celular. La reducción de la DQO no está correlacionada con la decoloración del efluente. Altos tiempos de retención hidráulica. Inhibición por compuestos recalcitrantes	Buitrón <i>et al.</i> , 2004 McMullan <i>et al.</i> , 2001 Pandey <i>et al.</i> , 2007 Robinson <i>et al.</i> , 2001 Stolz, 2001 Tan, 2001
ANAEROBIOS	Posibilidad de aplicación de mediadores redox para mejorar el porcentaje como la velocidad de decoloración Factibilidad de bio-aumentación de los cultivos	Generación de subproductos tóxicos. Requerimiento de cepas específicas. Bajas remociones de materia orgánica expresada como DQO. Probable efecto recalcitrante de los auxiliares del proceso de tinción. Largos periodos de aclimatación. Los colorantes y otros compuestos refractarios no se mineralizan. Los micronutrientes presentes en las aguas residuales como N y P no se remueven mediante este sistema Los sulfatos dan lugar a sulfuros	Delee <i>et al.</i> , 1998 Forgacs <i>et al.</i> , 2004 Rai <i>et al.</i> , 2005 Razo-Flores <i>et al.</i> , 1996 Van der Zee, 2005
ACOPLADOS	Mineralización completa que a menudo se logra gracias a la acción sinérgica de diferentes organismos La reducción del enlace azo se puede lograr en las condiciones de reducción en biorreactores anaerobios y las resultantes aminas aromáticas incoloras puede ser mineralizada en condiciones aerobias.	Tiempos elevados de residencias en fase anaerobia Requerimientos de cepas específicas para degradar colorantes específicos Uso de co-sustratos Persistencia de las aminas aromáticas	Buitrón <i>et al.</i> , 2004 Cruz <i>et al.</i> , 1996 López Ayala 2004 Melgoza, 2004 Moeller y Garzón, 2006 Stolz, 2001 Van der Zee, 2005

Los procesos de tratamiento empleando enzimas presentan ventajas por ser altamente selectivas (Aitken, 1993; Baborová *et al.*, 2006; Kulshrestha y Husain, 2007; Park *et al.*, 2007; Villalobos y Buchanan 2002; Villegas-Rosas *et al.*, 2003), su inhibición por sustancias que pueden ser tóxicas para los organismos vivos es menos probable y su costo podría llegar a ser inferior. Por otra parte, requiere bajos tiempos de residencia con respecto a otros tratamientos (Karim *et al.*, 2012; Kulshrestha y Husain, 2007; Siddique *et al.*, 1993), presentando alta estabilidad térmica y química (Boucherit *et al.*, 2013; Ghaemmaghami *et*

al., 2010; Neves *et al.*, 2012). Las enzimas que han presentado mayor utilidad en el tratamiento de compuestos recalcitrantes son: Peroxidasa, lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP), lacasa, azo reductasa y peroxidasa de rábano picante (HRP) (Selvam *et al.*, 2003). En la Tabla 2.9 se presentan las principales fuentes de obtención y aplicaciones del tratamiento enzimático.

Tabla 2.9 Enzimas y su principal aplicación en el tratamiento de compuestos recalcitrantes

ENZIMAS	FUENTE	APLICACIÓN	REFERENCIA
Azo reductasa	<i>Pseudomonas sp.</i>	Degradación de colorantes	Husain, 2006
Cloro-peroxidasa	<i>Caldariomyces fumago</i>	Oxidación de compuestos fenolicos	Aitken <i>et al.</i> , 1993
Cyanidasa	<i>Alcaligenes denitrificans</i>	Descomposición de los cianuros	Basheer <i>et al.</i> , 1992
Lacasa	<i>Trametes versicolor</i> Soya	Fenoles, aminas aromáticas, colorantes sintéticos	Christian <i>et al.</i> , 2005 Duran <i>et al.</i> , 2002 Duran y Esposito 2000 Husain, 2006
Lignina peroxidasa	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Fenoles, aminas aromáticas, colorantes sintéticos	Christian <i>et al.</i> , 2005 Husain, 2006 Kalme <i>et al.</i> , 2007 Park <i>et al.</i> , 2006, 2007 Yu <i>et al.</i> , 2006
Manganeso peroxidasa	Bacterias <i>Phanerochaete</i> <i>Chrysosporium</i> <i>Basidiomycetes</i>	Oxidación de compuestos aromáticos y fenoles, colorantes azo	Baborová <i>et al.</i> , 2006 Christian <i>et al.</i> , 2005 Duran <i>et al.</i> , 2002 Eibes <i>et al.</i> , 2005 Husain, 2006
Peroxidasa	Raíces de rábano, jitomate, hongos blancos, soya <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Ipomea palmata</i> <i>Saccharum spontaneum</i> <i>Coprinus cinereus</i>	Oxidación de compuestos aromáticos, fenoles y sus derivados, colorantes sintéticos, colorantes reactivos	Akhtar <i>et al.</i> , 2005a, b Gudelj <i>et al.</i> , 2002 Husain 2006 Kulshrestha y Husain 2007 Matto y Husain, 2007 Mohan, 2005 Shaffiqu <i>et al.</i> , 2002

Varias investigaciones han reportado el uso de peroxidasas para la remoción de colorantes azo en fase acuosa, obteniendo porcentajes de decoloración entre 50 y 90% empleando diferentes condiciones de operación (de Souza; 2007; Kalsoom *et al.*, 2013; Marchis *et al.*, 2011; Mohammad *et al.*, 2010; Mohan *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2012).

El uso de la peroxidasa de rábano picante (*Horseradish Peroxidase*, HRP) para el tratamiento de contaminantes incluye anilinas, arilaminas, tales como bencidinas y naftilaminas, ya que la HRP presenta la habilidad para co-precipitar ciertos contaminantes difíciles de remover (Hamid y Ur-Rehman, 2009).

Mohan *et al.* (2005) reportaron el empleo de la *HRP* para la remoción del colorante negro ácido a una concentración de 20 mg/L logrando porcentajes de decoloración cercanas al 60%. Maddhinni *et al.* (2006) reportaron la decoloración del colorante Amarillo Directo 12 a concentraciones de 10 mg/L, pH de 4 unidades, temperatura de 24°C, con un tiempo de reacción de 105 min logrando un 70% de decoloración. Bhunia *et al.* (2002) mostraron una efectiva degradación y precipitación de importantes colorantes azo de la industria textil (azul, negro y violeta remazol, azul y rojo cibacron y azul violeta) mediante el empleo de la *HRP*. Una enzima purificada producida por *Geotrichum candidum Dec1* fue utilizada en la decoloración de 21 colorantes principalmente de antraquinona, de los cuales 9 fueron decolorados por esta peroxidasa (Kim y Shoda, 1999).

Shaffiqu *et al.* (2002) estudiaron la degradación de colorantes textiles mediante enzimas peroxidadas, extraídas de la planta *Iponema palmata* y *Saccharum spontaneum* las cuales utilizaron como fuente alternativa a la *HRP*. Los colorantes estudiados fueron: Negro Cibacron, Azul MR, Azul Brillante HER, Verde Supranol, Azul directo, empleados en la industria textil con un rango de concentración de 25 a 200 mg/L, logrando porcentajes de decoloración del 50 al 99% con tiempos de reacción de 15 a 90 min.

La lignina peroxidasa fue reportada por primera vez en 1983 (Aitken *et al.*, 1994). Esta es parte de las enzimas extracelulares del hongo blanco *Phanerochaete chrysosporium* (Aitken e Irvine, 1989). La LiP mostró alta efectividad para mineralizar una gran variedad de compuestos recalcitrantes y la oxidación de compuestos aromáticos policíclicos y fenólicos (Aitken *et al.*, 1994; Aitken e Irvine, 1989). El mecanismo de oxidación de los colorantes azo por lignina peroxidasa probablemente involucra la oxidación de grupos fenólicos para producir un radical en el carbono donde se encuentra el enlace azo (Ollikka *et al.*, 1993). Verma y Madamwar (2002), reportaron la decoloración de los colorantes Azul Brillante HGR y Rojo Ácido 119 por lignina peroxidasa purificada parcialmente de *Phanerochaete chrysosporium*, logrando porcentajes de decoloración del 80 y 70%, respectivamente.

La producción de manganeso peroxidasa se obtiene principalmente de los hongos *Phanerochaete chrysosporium*. Hay varios estudios que evaluaron la obtención de esta enzima lignolítica para su aplicación en la decoloración de colorantes azo. Mielgo *et al.* (2003) desarrollaron un sistema basado en el uso de una enzima MnP para la degradación de colorantes azo. En este trabajo se incluye la optimización del proceso con el objetivo de determinar la influencia de los factores físicos-químicos tales como: ácidos orgánicos, H₂O₂, concentración de Mn⁺², pH, temperatura, actividad enzimática y concentración de colorante. Los estudios mostraron que en un tiempo de reacción de 10 min se lograron porcentajes de decoloración del 90% para una concentración de 1500 mg/L. Boer *et al.* (2004), demostraron la habilidad para decolorar varios colorantes sintéticos: Rojo Congo,

Azul Trypan, Verde Metil, Violeta Metil y PolyR478 a 200 mg/L, empleando *Lentinula edodes* en medio sólido, completando la decoloración en 18 días de incubación. En la Tabla 2.10 se presentan las eficiencias obtenidas de algunos trabajos empleando las principales enzimas para el tratamiento de colorantes azo.

Tabla 2.10 Trabajos realizados con las principales enzimas empleadas en el tratamiento de los colorantes azo

ENZIMA	COLORANTE	% DE REMOCIÓN	REFERENCIA
Peroxidasa	Negro Directo	93%	Calderón <i>et al.</i> , 2003
	Cibacron	97%	
	Solofenil	96%	
HRP	Negro Ácido 10	85%	Mohan <i>et al.</i> , 2005
	Amarillo Directo 12	91%	Maddhinni <i>et al.</i> , 2006
MnP	Índigo Carmine	93%	Rodríguez-Couto <i>et al.</i> , 2002
	Acid Black 52	90%	Mielgo <i>et al.</i> , 2003
	Orange II	90-95%	Feijoo <i>et al.</i> , 2003
LiP	RBBR	75 %	Ollikka <i>et al.</i> , 1993
	Brillant Blue	83%	Verma y Madamwar, 2002
	Naranja disperso 3	89%	Zhao <i>et al.</i> , 2006
Lacasa	Efluente textil	87%	Campos <i>et al.</i> , 2001
	Rojo Directo 28	91%	Claus <i>et al.</i> , 2002
	Azul Astrazone	90%	Yesilada <i>et al.</i> , 2003

2.6.1 Peroxidasas

El término peroxidasa se refiere a una enzima que cataliza la oxidoreducción entre peróxido de hidrógeno y una gran variedad de donadores de hidrógeno, siendo capaz de transformar una variedad de compuestos siguiendo un mecanismo de radicales libres, dando productos oxidados o polimerizados (Torres y Ayala, 2010).

Se ha identificado actividad peroxidasa en plantas, microorganismos y animales, donde juega un rol muy importante. En las plantas participa en el proceso de lignificación (Wakamatsu y Takahama, 1993) y en el mecanismo de defensa en daños físicos y tallos infectados (Biles y Martyn, 1993)

Las peroxidasas se utilizan ampliamente en bioquímica clínica e inmunoensayos (Vamos-Vigyazo, 1981; Lin *et al.*, 1996). Algunas aplicaciones novedosas de peroxidasas sugeridas incluyen tratamiento de aguas residuales que contienen compuestos fenólicos, la síntesis de diversos productos químicos aromáticos y la eliminación de peróxido de materiales tales como productos alimenticios y residuos industriales (Agostini *et al.*, 2002)

La primera peroxidasa fue aislada de una planta de higo en 1936; posteriormente, se han aislado y purificado otras peroxidosas, de las cuales la más investigada ha sido la *HRP* (Tabatabaei *et al.*, 2000). Las peroxidosas pueden presentar masas moleculares en un rango de 30,000 y 150,000 Da (Hamid y Ur-Rehman, 2009), las cuales se pueden llegar a encontrar bajo la denominación (EC 1.11.1.x). Actualmente 15 diferentes denominaciones están vigentes para la clasificación del código enzimático (EC), catalogado por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, siendo el código (EC 1.11.1.7) el que represente a la peroxidasa.

2.6.1.1 Clasificación de las peroxidosas

Las peroxidosas se encuentran en una gran variedad de organismos. Estas se agrupan en 2 superfamilias en función de sus diferencias estructurales: una encontrada en animales, hongos y bacterias (Daiyasu y Toh, 2000; Furtmuller *et al.*, 2006) y una segunda en bacterias, hongos y plantas (Passardi *et al.*, 2007). Esta última se divide a su vez en tres clases independientes de peroxidosas (Ruiz *et al.*, 2001).

Peroxidasas clase I (Procedencia Procariota)

La clase I incluye a las peroxidosas intracelulares como la citocromo-c peroxidasa (CcP) de levaduras, una proteína soluble que participa en la cadena de transporte de electrones mitocondrial como oxidasa terminal cuando la citocromo c oxidasa respiratoria está inhibida, la ascorbato peroxidasa (APx) responsable de la eliminación del H₂O₂ en cloroplastos y citosol de plantas superiores (Dalton, 1991) y la catalasa peroxidasa (CP).

Estas peroxidosas no contienen en ningún caso puentes disulfuro, carbohidratos, iones calcio estructurales, o una secuencia señal que permita su secreción vía retículo endoplásmico (elementos característicos de las peroxidosas de las clases II y III) (Ruiz, 1998).

Peroxidasas clase II (fúngicas)

La clase II incluye a las peroxidosas extracelulares de hongos tales como lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y peroxidasa versátil (VP). Todas ellas son glicoproteínas monoméricas que contienen 4 enlaces disulfuro conservados y dos sitios de unión a calcio. Presentan una secuencia que codifica para un péptido señal en el extremo amino terminal, para su secreción. Estas son principalmente obtenidas de *Phanerochaete chrysosporium* (Rodríguez, 2011).

Peroxidasas clase III (Secreción en plantas)

Las funciones fisiológicas de estas peroxidasas son muy variadas y específicas del tejido en el que se producen. Pueden participar en la oxidación de compuestos tóxicos, en la biosíntesis de la pared celular, en el catabolismo del ácido 3-indolacético, en la biosíntesis de etileno, etc. (Campa, 1991).

Son frecuentemente nombradas como peroxidasas “clásicas” de plantas y son secretadas de la célula o transportadas a la vacuola. Todas las peroxidasas de plantas presentan la misma estructura general, que consiste de una molécula de ferriprotoporfirina IX como grupo prostético y 10 α -hélices extra, aminoácidos altamente conservados y 4 enlaces disulfuro (Welinder *et al.*, 1992). Algunos ejemplos son las peroxidasas de cacahuates, rábano picante, soya y cebada.

Las peroxidasas Clase III tienen importantes roles en las funciones celulares de las plantas, α -oxidación de ácidos grasos en semillas y hojas de frijol, biosíntesis de lignina; biosíntesis de los polímeros de la pared celular; cicatrización y regeneración de tejido vegetal, posiblemente participa en el catabolismo de auxinas y en la defensa contra el ataque de patógenos, metabolismo de hormonas y respuesta al estrés, metabolismo de ácido indolacético (IAA). La función fisiológica de las peroxidasas no se conoce en su totalidad, debido a las múltiples formas de esta enzima que existen en diversas plantas (Tabatabaei *et al.*, 2000).

En el ciclo peroxidativo estándar, las peroxidasas catalizan la reducción de H_2O_2 mediante la donación de electrones de varias moléculas tales como compuestos fenólicos, precursores de lignina, y metabolitos secundarios de auxina (Hiraga *et al.*, 2001). Sin embargo poco se sabe de su función biológica en la planta.

2.6.1.1.1 Estructura de las peroxidasas

El ejemplo más familiar de peroxidasas clásicas es la isoenzima C de rábano picante (*HRP-C*), la cual ha sido la más estudiada debido a su abundancia en esta hortaliza y a su disponibilidad. La *HRP-C* ocupa un papel importante en la historia de la enzimología, debido a su estabilidad, disponibilidad y a que la enzima purificada es frecuentemente utilizada como un modelo de la familia de las peroxidasas. La elucidación del modo de acción de la *HRP-C* junto con el conocimiento de su estructura molecular ha servido para ilustrar la estructura y el papel que desempeñan las peroxidasas de otros vegetales. Sin embargo, hasta la fecha no se tiene el entendimiento completo de la función que desempeña esta enzima en el rábano picante (Robinson, 1991).

La peroxidasa de rábano picante (*HRP*) es una glucohemoproteína con actividad catalítica. En su centro activo presenta un grupo hemo tipo b que contiene un ión de hierro en cuya

coordinación participan los cuatro nitrógenos pirrólicos. La estructura se muestra en la Figura 2.2. El grupo hemo tiene una estructura plana con el átomo de hierro retenido firmemente en medio de un anillo de porfirina que se compone de cuatro moléculas. El hierro tiene dos sitios de unión abiertos, uno por encima y otro por debajo del plano del grupo hemo. El grupo hemo tiene una histidina (enzima) unido en el residuo de histidina proximal (His170) que se encuentra por debajo del grupo hemo. El segundo residuo por encima del grupo hemo presenta histidina en el lado distal, el cual se encuentra vacante (Veitch, 2004). Este sitio está abierto para que el peróxido de hidrógeno pueda unirse durante las reacciones de óxido-reducción. Un átomo de oxígeno se unirá a este sitio durante la activación. Durante la reacción enzimática, la unión del peróxido de hidrógeno al átomo de hierro crea una configuración octaédrica.

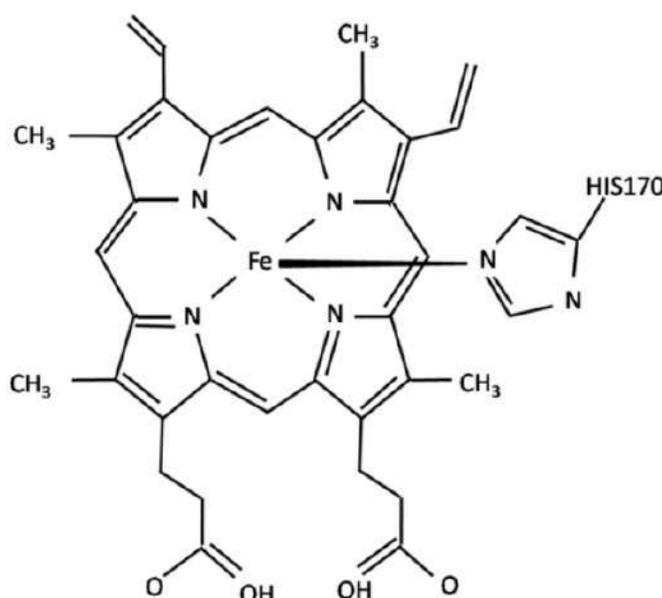


Figura 2.2 Estructura del grupo hemo en la *HRP*

La Figura 2.3 muestra la estructura tridimensional de *HRP-C* (Dunford y Jones 2010). La peroxidasa presenta dos iones de calcio, cada uno de ellos se encuentra en un dominio diferente, el ión calcio del dominio proximal está fuertemente unido, mientras que el distal parece estar más débilmente por su cercanía a la superficie molecular. El grupo hemo (esferas de color negro) está localizado en el centro de la estructura. Los dos átomos de calcio son esferas negras y se encuentran dentro de las regiones helicoidales de la enzima, uno en la región distal y otro en la región proximal. Las hélices α y las láminas β de la enzima se muestran como las estructuras helicoidales multicolores. Cada sitio de calcio es un coordinado de ligandos donantes de oxígeno proporcionados por una combinación de carboxilatos de la cadena lateral y grupos hidroxilo (Veitch, 2004). Tanto el grupo hemo como los átomos de calcio son cruciales para que la enzima pueda funcionar correctamente; la pérdida de alguno de ellos daría lugar a la inestabilidad.

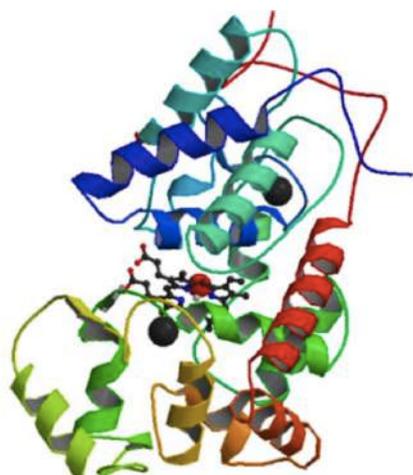


Figura 2.3 Estructura tridimensional de la peroxidasa *HRP*

De acuerdo con estudios realizados se ha encontrado que la peroxidasa de frijol de soya tiene un 57% de similitud de identidad de secuencia que la *HRP-C* (Henriksen *et al.*, 2001). La peroxidasa de la soya (*soybean peroxidase, SBP*), es una peroxidasa con una extraordinaria estabilidad y propiedades catalíticas, considerada como una glicoproteína con una masa molecular de 47 kD (Gillikin y Graham, 1991). Pertenecer a la familia de las peroxidases secretoras de plantas (de clase III) (Welinder *et al.*, 1992). Las aplicaciones potenciales de la *SBP* son considerables como resultado de una alta estabilidad térmica (McEldoon y Dordick, 1996) y una alta reactividad y la estabilidad a pH bajo (McEldoon *et al.*, 1995; Nissum *et al.*, 2001). En la Tabla 2.11 se presentan las características en común que comparten la *HRP* de *Armoracia rusticana* y la *SBP* de *Glycine max*, observando que hay una gran similitud en sus propiedades bioquímicas y estructurales.

Tabla 2.11 Comparación de las propiedades bioquímicas y estructurales de la *HRP* y la *SBP* (Ryan *et al.*, 2006)

PROPIEDADES	<i>HRP</i> de <i>Armoracia rusticana</i>	<i>SBP</i> de <i>Glycine max</i>
Número de amino ácidos	306	306
Clasificación de enzimas	1.11.1.7	1.11.1.7
Masa molecular	44100 Da	44660 Da
Carbohidratos	7580 Da	7400 Da
Grupo hemo	550 Da	550 Da
Iones calcio	80 Da	80 Da
pH rango de actividad	4-8	2-10
Localización <i>in vivo</i>	Raíces, vacuolas, pared celular	Semillas y cubiertas de semillas

2.6.1.2 Mecanismo de reacción

La Figura 2.4 muestra los cinco estados de oxidación de la peroxidasa *HRP* (Berglund *et al.*, 2002). En el ciclo catalítico, la enzima nativa es oxidada por peróxido de hidrógeno formando el Compuesto I (E1). Esto implica una reacción de óxido-reducción de dos electrones en la que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es reducido a agua (H_2O) y la enzima es oxidada. Un equivalente de oxidación reside en el hierro en forma de un intermediario oxoferril ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) y el otro, en la mayoría de las peroxidasas, reside en la porfirina (en forma de radical catiónico π de la porfirina, como $\cdot+$). A continuación, el Compuesto I puede oxidar un sustrato (AH_2) mediante una reacción de transferencia electrónica en la que se forma el radical del sustrato correspondiente ($\cdot\text{AH}$). La enzima queda como Compuesto II (E2) con un centro $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ coordinado con la porfirina que ha recuperado su electrón. Finalmente, el $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ del Compuesto II es reducido a la forma férrica (Fe^{3+}) de la enzima nativa mediante la sustracción de un electrón de otra molécula de sustrato, liberando un segundo radical libre ($\cdot\text{AH}$). A pesar de que las reacciones siguen un curso general, en ocasiones pueden ocurrir reacciones secundarias responsables de la inactivación e inhibición de la enzima (Wariishi y Gold, 1990).

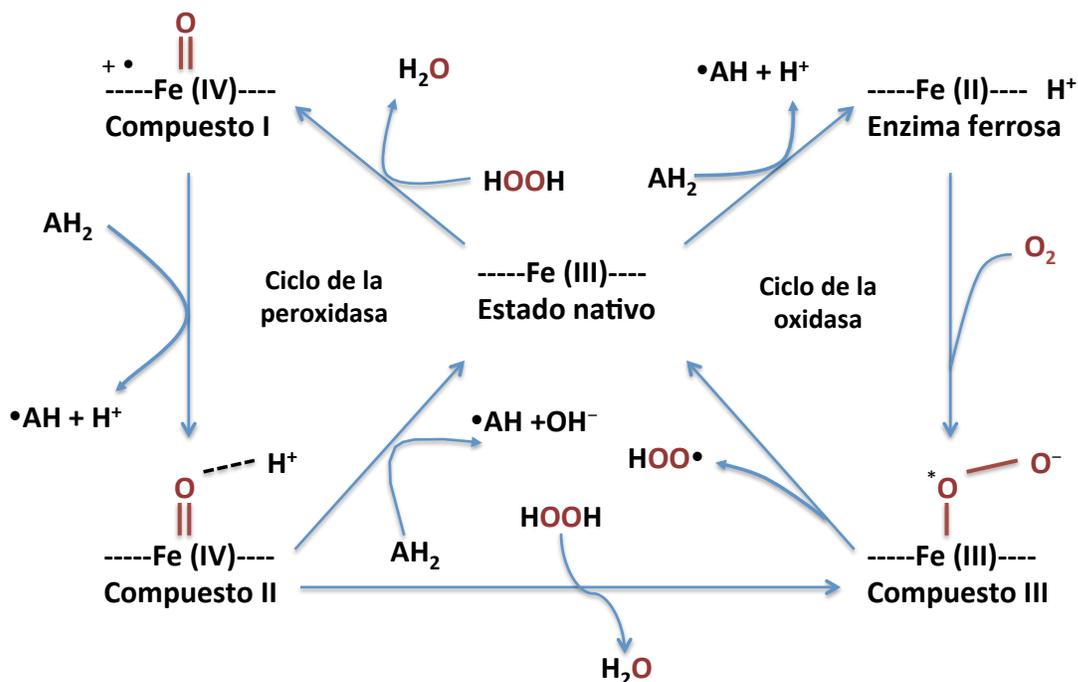
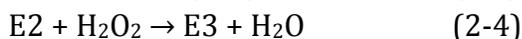
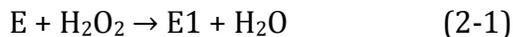


Figura 2.4 Ciclo de óxido-reducción de la peroxidasa *HRP* (Berglund *et al.*, 2002)

Los radicales libres formados durante el ciclo catalítico se unen formando cadenas de polímeros con baja solubilidad y tienden a precipitar en la solución. Biswas (1999) reportó la formación del Compuesto III de la peroxidasa, generado por el exceso de peróxido de hidrógeno que produce la oxidación del Compuesto II:



El Compuesto III es equivalente a la oxi-ferro o superoxi-ferri forma de la enzima. El retorno a la enzima nativa es extremadamente lento. Por lo tanto, una vez en la forma del Compuesto III, la enzima es incapaz de llevar a cabo la oxidación de compuestos aromáticos.

2.6.1.3 Factores que influyen sobre la actividad de la peroxidasa

Los principales parámetros influenciados en la actividad catalítica de las enzimas son: pH, temperatura, concentración de sustrato, concentración de peróxido y enzima (Boucherit *et al.*, 2013; Marchis *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012).

-Valor de pH

Las enzimas tienen un rango de pH en el cual su actividad es máxima, el pH óptimo de una enzima en particular no es necesariamente idéntico para otras (Mohan *et al.*, 2005). El pH afecta la actividad enzimática si se tiene en cuenta su influencia sobre los procesos de unión del sustrato y su transformación catalítica. Los cambios de pH alterarán considerablemente la naturaleza iónica de las enzimas. Sin embargo, la mayoría de las peroxidases son activas en un rango de pH relativamente amplio (3-12), lo que puede deberse a la presencia de diferentes isoenzimas las cuales tienen cada una un pH óptimo para realizar su función catalítica.

-Temperatura

Con respecto a la temperatura existen pocas investigaciones que estudien la temperatura óptima de una enzima específica, sin embargo es bien conocido que las proteínas y enzimas son sensibles a altas temperaturas ya que pueden desnaturalizarse y desactivarse (Kalsoom *et al.*, 2013). En estudios anteriores han reportado que la enzima de SBP es térmicamente estable a T=90.5°C y 8 unidades de pH (McEldoon y Dordick 1996). Se han postulado muchas hipótesis para explicar la termorresistencia de las peroxidases. Algunos trabajos han demostrado que las cadenas de carbohidratos unidas a la molécula de proteína incrementan su estabilidad térmica. Por otro lado, en estudios preliminares de dispersión dinámica de la luz se encontró que la peroxidasa es una proteína con alta tendencia a formar agregados, dichos agregados le confieren o incrementan su termoestabilidad (Duarte-Vázquez *et al.*, 2003).

-Peróxido

La dosis de peróxido de hidrógeno 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 (Mohan *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 1994).

-Sustrato

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). 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 (Mohan *et al.*, 2005). Sin embargo, si se sobrepasa este límite, las eficiencias catalíticas pueden llegar a disminuir.

-Otros factores

Existen otros factores que alteran la actividad enzimática, tales como las radiaciones electromagnéticas, la humedad, la presencia de activadores, los metales pesados, entre otros. En un estudio de la alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus* L.) se evaluó el efecto *in vitro* de metales pesados como: hierro (Fe^{2+} y Fe^{3+}), cobalto (Co^{2+}), estroncio (Sr^{2+}), zinc (Zn^{2+}), mercurio (Hg^{2+}), níquel (Ni^{2+}), aluminio (Al^{2+}) y plomo (Pb^{2+}), obteniendo que ciertas concentraciones de dichos metales inhiben la actividad de la peroxidasa hasta en un 50 % (Güngör, 2008).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se detallan los materiales y métodos empleados en la realización de la tesis doctoral. El desarrollo de esta investigación se dividió en 2 etapas. La primera etapa consistió en la adaptación de técnicas específicas para la obtención de un extracto crudo a partir de un residuo industrial de soya (*OKARA*) y su purificación parcial, para la obtención de enzimas con actividad peroxidasa, mediante cromatografía de intercambio iónico. Empleando el modelo de Michaelis-Menten se determinaron las constantes cinéticas mediante análisis cuantitativos.

En la segunda etapa se estudió la aplicación de la enzima con actividad peroxidasa en la degradación/decoloración de un colorante azo (*AD2*) empleado en la industria textil. Parámetros tales como: pH, temperatura, tiempo de reacción, concentración de H_2O_2 y colorante fueron estudiados utilizando un diseño factorial, con el objetivo de lograr la mayor actividad catalítica. Las mejores condiciones de operación en donde se logró obtener el mayor porcentaje de decoloración, se emplearon para el tratamiento de un efluente industrial textil procedente de la zona industrial de Civac ubicada en Cuernavaca, Morelos, México. La determinación y cuantificación de productos generados en las reacciones se evaluaron utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución (*HPLC*, en inglés). Con el propósito de evaluar la toxicidad de los productos finales se realizaron análisis de toxicidad aguda (mediante pruebas conocidas como *Microtox*). Se realizó un post-tratamiento del efluente obtenido tras la degradación enzimática de *AD2*. Esto se debió a la presencia de colorante residual y productos de oxidación, estudiando como alternativa de tratamiento el Proceso Fenton. En la Figura 3.1 se presenta el diagrama de la estrategia experimental. La metodología específica para cada estudio se describirá posteriormente en cada capítulo.

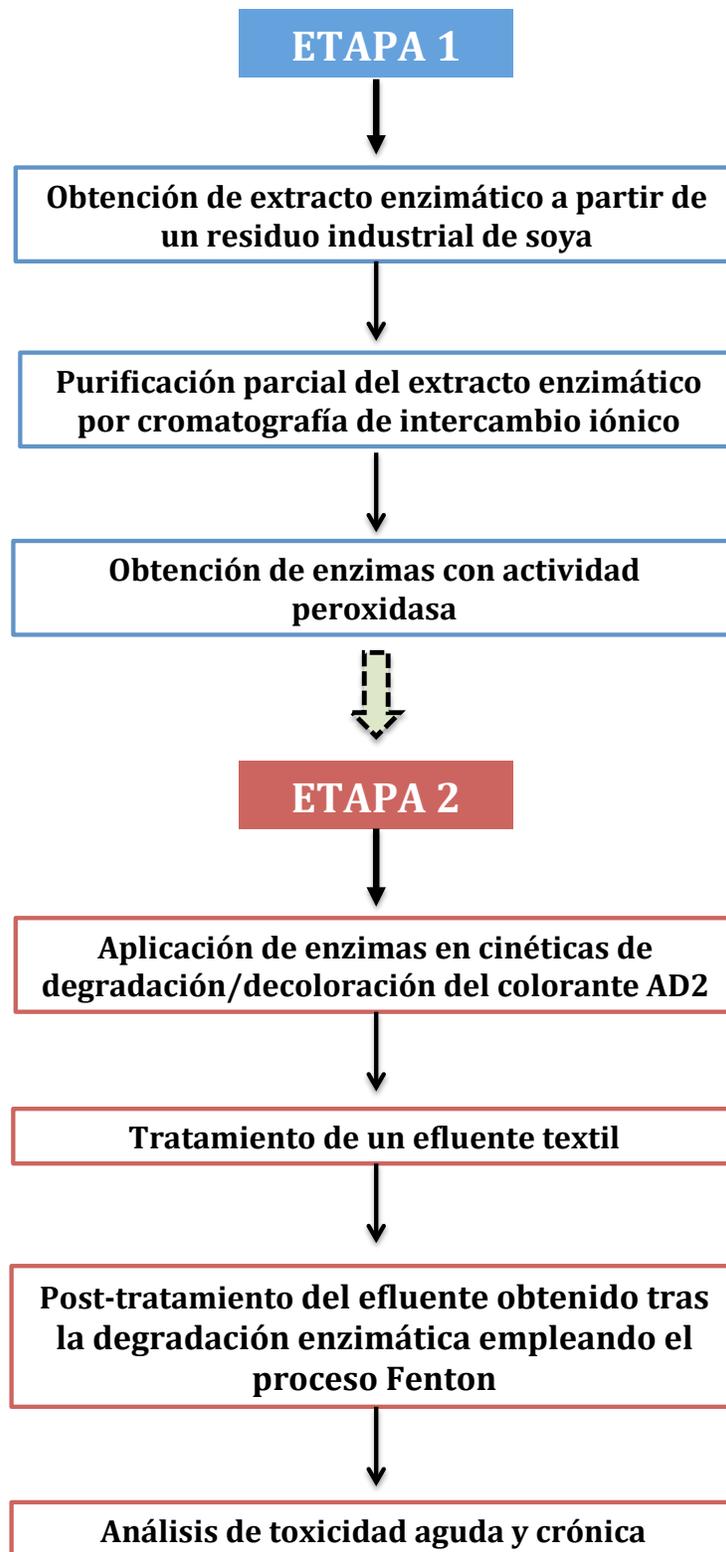


Figura 3.1 Diagrama de la estrategia experimental

3.1 Reactivos químicos y estándares

En la Tabla 3.1 se presentan los reactivos, solventes y estándares utilizados para el desarrollo de esta investigación.

Tabla 3.1 Reactivos y estándares empleados en la investigación

REACTIVO	PUREZA	MARCA
Acetato de amonio	99%	J.T. Baker
Acetato de sodio	100%	Merck
Acetonitrilo	99.9% grado <i>HPLC</i>	Fermont
Ácido acético	99- 100%	J.T. Baker
Ácido fosfórico	75-85%	Merck
Ácido sulfúrico	95-98%	J.T. Baker
Azul directo 2	nd	----
Bencidina	≥98%	Sigma Aldrich
Cloruro de sodio	100%	J.T. Baker
Fenol	≥99%	J.T. Baker
Fosfato dibásico de sodio	98-100%	J.T. Baker
Fosfato monobásico de sodio	98-100%	J.T. Baker
Metanol	≥99.9%	Fermont
Peróxido de hidrógeno	30%	J.T. Baker
Sulfato ferroso heptahidratado	99%	J.T. Baker
4-aminoantipirina	90-100%	J.T. Baker
4-aminobifenilo	≥99%	Sigma Aldrich

3.2 Extracto crudo y enzimas con actividad peroxidasa

El extracto crudo se obtuvo a partir de un residuo industrial de soya llamado *OKARA*, de acuerdo con (Villegas-Rosas *et al.*, 2003). La purificación parcial del extracto crudo para la obtención de enzimas con actividad peroxidasa se llevó a cabo empleando cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna *DEAE53-cellulose* 2.5x15 cm (Himmelhoch, 1971). Para cada fracción obtenida se determinaron: proteínas y actividad enzimática.

3.3 Valoraciones enzimáticas

3.3.1 Valoración de la proteína total

Para medir la proteína total se empleó el método Bradford (Bradford, 1976) en el cual se utiliza el reactivo *Bio-Rad Protein Assay* (BIO-RAD Laboratories GmbH). El método está

basado en el cambio de absorbancia a 595 nm de una disolución ácida de Comassie Brilliant Blue G-250 al quedar este colorante unido a las proteínas. Se empleó albúmina de suero bovino (Sigma Chemical Co., St. Louis) como patrón de proteína. El método permitió trabajar a concentraciones entre 0 y 20 mg/L. La curva de calibración se presenta en la Figura 3.2 la cual relaciona la absorbancia a 595 nm y la concentración de proteína.

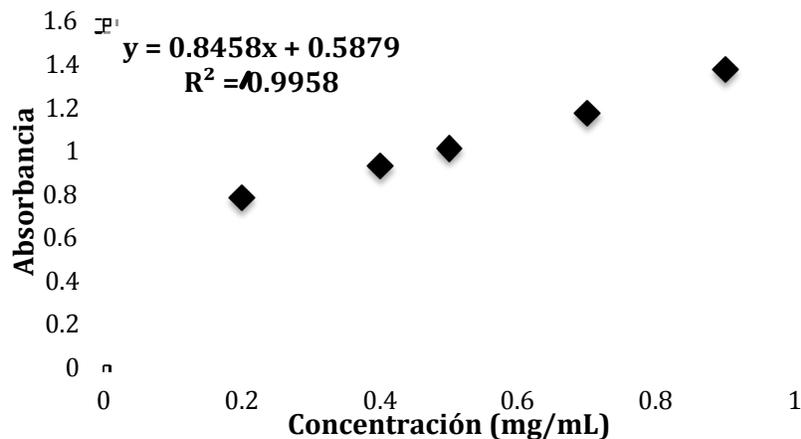


Figura 3.2 Curva de calibración para las proteínas

La ecuación para la determinación de proteínas se presenta a continuación:

$$\text{Concentración de proteína (mg/mL)} = (\text{ABS}_{595\text{nm}} - 0.5879) / 0.8458$$

3.3.2 Determinación de la actividad enzimática

La actividad de la peroxidasa se determina generalmente por métodos espectrofotométricos, que emplean diferentes combinaciones de soluciones amortiguadoras y sustratos, variando las condiciones de ensayo en cuanto a temperatura, volumen, concentraciones y pH. El sustrato primario más empleado es el peróxido de hidrógeno y los sustratos secundarios utilizados son: guayacol (2-metoxifenol), 4-aminoantipirina, o-dianisidina (4-(4-amino-3-metoxifenilo)-2-metoxianilina) y ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiozol-6-sulfónico]). El sustrato oxidable más usado es el guayacol, que es oxidado a un complejo coloreado de tetraguayacol en presencia de peroxidasa (Santiago *et al.*, 2009). Cuando el sustrato a emplearse es el fenol, la actividad de la peroxidasa se determina con la aplicación de 4-aminoantipirina. Este compuesto es un cromógeno que reacciona con los polímeros del fenol y hace que la solución adquiera un color rojizo que absorbe la luz a una longitud de onda de 510 nm (Pramparo, 2008).

La actividad peroxidasa en este estudio fue determinada por el método de la 4-aminoantipirina (Bhunja *et al.*, 2002), la cual consta de una estimación colorimétrica utilizando fenol y H₂O₂ como sustratos y 4-aminoantipirina (Am-NH₂) como cromógeno. La prueba fue desarrollada a 25°C. La mezcla de la reacción contenía una solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 7.4), fenol (0.2 M), H₂O₂ (2X10⁻³ M), 4-aminoantipirina (4.8x10⁻² M) y extracto enzimático. La velocidad de consumo se estimó midiendo la absorbancia del producto a 510 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Agilent Technologies Cary 60). Se utilizó un control paralelo (blanco) que contenía todos los reactivos de la prueba, excepto enzima y otro sin sustrato fue utilizado como control. Una unidad de actividad peroxidasa (U) representa la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 μmol de sustrato durante 1 min.

$$\text{Actividad volumétrica} = (\Delta A / \Delta t) \cdot (V \text{ ensayo}) / (\epsilon) (d) (V \text{ muestra})$$

donde:

- ΔA:** (diferencial del valor de la absorbancia): **A_f - A_i**
Δt: (cambio del tiempo): **t_f - t_i**
V_{ensayo}: volumen total del ensayo
V_{muestra}: volumen de la muestra
ε: coeficiente de extinción molar de la 4-aminoantipirina
d: paso de la luz a través de la celda (1 cm)

3.4 Métodos analíticos

3.4.1 Determinación de la concentración del AD2 por espectrofotometría

El porcentaje de decoloración fue medido con base en los cambios de absorbancia a 576 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Perkin-Elmer UV-25 USA). Previamente se evaluó la longitud de onda para la cual la absorbancia de la muestra es máxima (Figura 3.3).

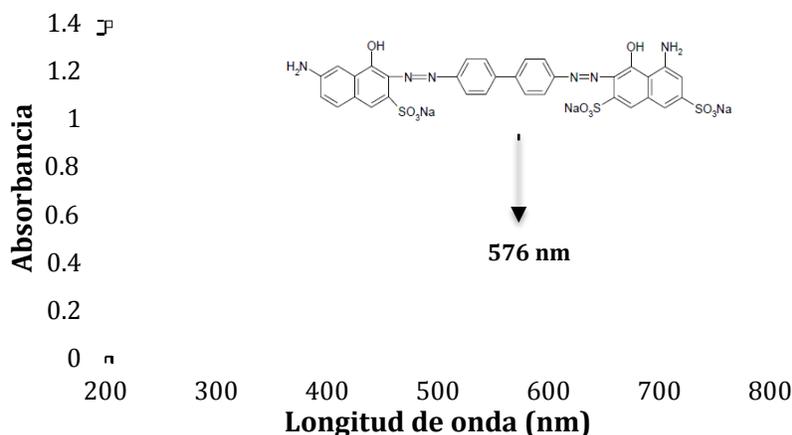


Figura 3.3 Espectro de absorbancia y estructura del AD2

El cálculo para determinar el porcentaje de decoloración se realizó de acuerdo con la ecuación 1:

$$\text{Porcentaje de decoloración: } \left[1 - \frac{ct}{ci} \right] \times 100 \quad (1)$$

donde, ci es la concentración inicial de la muestra y ct la concentración a un tiempo determinado.

La concentración del AD2 en las muestras se calculó a partir de la recta de calibración que se muestra en la Figura 3.4, realizada a una longitud de onda de 576 nm, para la cual la absorbancia del AD2 es máxima.

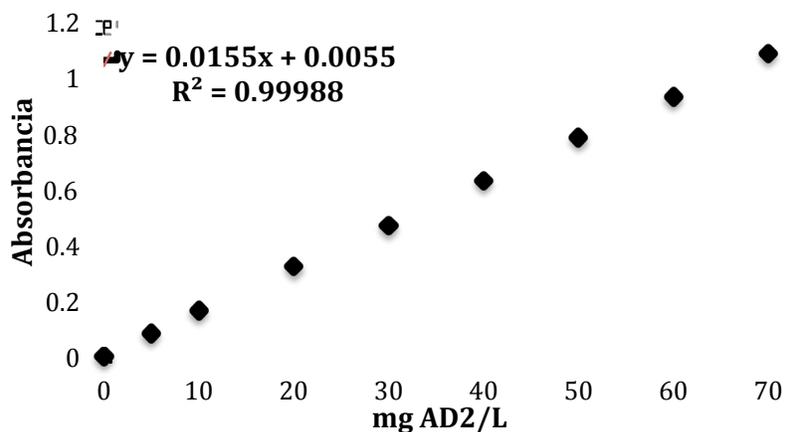


Figura 3.4 Recta de calibración del colorante AD2 por espectrofotometría

3.4.2 Determinación de las concentraciones por cromatografía de líquidos (HPLC, en inglés)

Para la determinación y cuantificación de la degradación del colorante AD2 y sus productos de reacción bencidina y 4-aminobifenilo de acuerdo con: Cobos (2013) e Işik y Spona (2007) (Figura 3.5), se utilizó cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC). Los análisis cromatográficos se llevaron a cabo en un equipo Thermo Surveyor, con automuestreador y detector con arreglo de diodos (DAD). Para la separación cromatográfica se utilizó una columna C18-Ar ACE (150 x 4.5 mm). Las muestras fueron previamente filtradas a través de membranas de 0.2 micras antes de la inyección al cromatógrafo. Se utilizó un volumen de inyección of 30 μ L, la fase móvil estuvo constituida por metanol 35% /acetonitrilo 60%/ácido fosfórico 5% al 0.1% con una velocidad de flujo de 0.7 mL/min en condiciones isocráticas a 30°C metodología adaptada de Cobos (2013). Los cromatogramas se obtuvieron a una longitud de onda de 576, 270 y 275 nm. Los tiempos de retención fueron de 1.5 min para bencidina, 4.2 min para AD2 y 7.2 min para 4-

aminobifenilo. Las rectas de calibración para los compuestos se presentan en **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

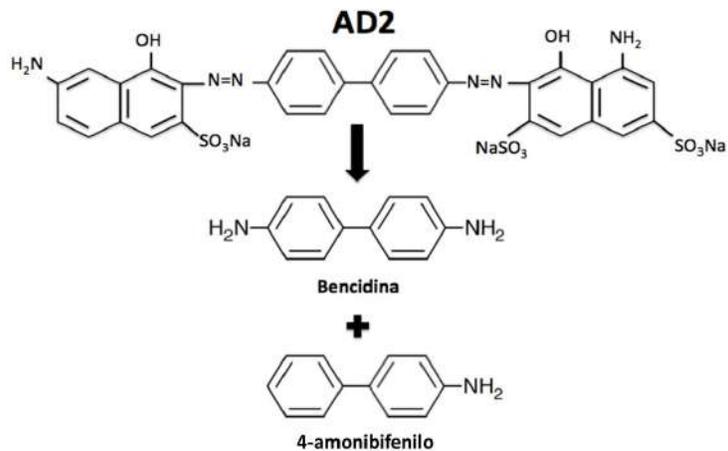


Figura 3.5 Productos resultantes de la degradación del AD2

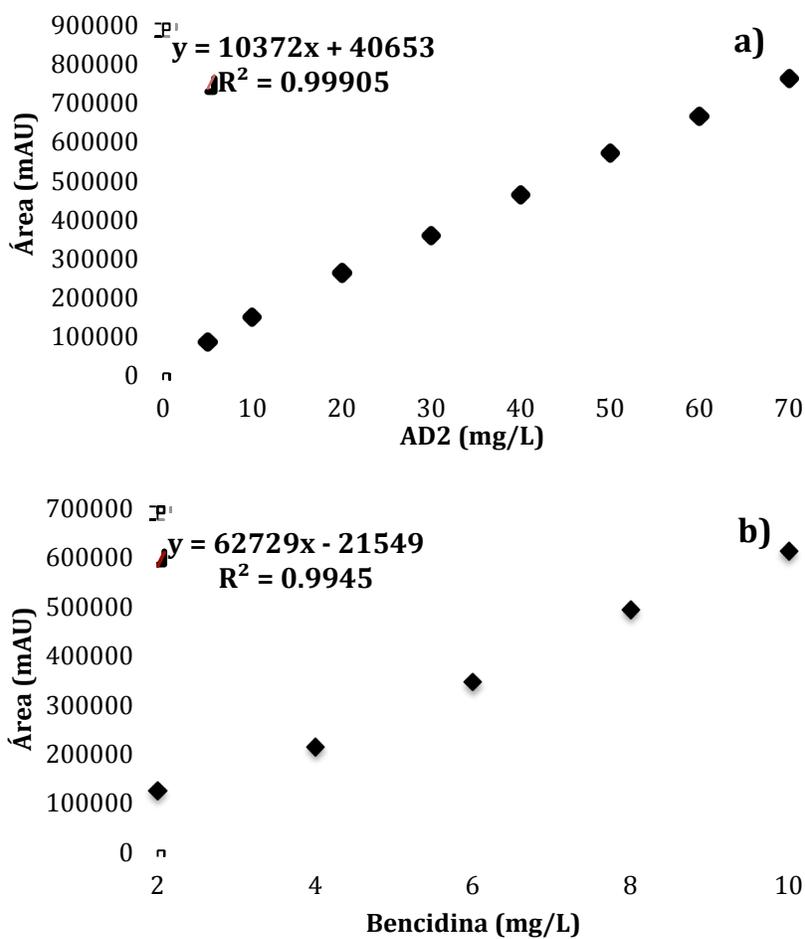


Figura 3.6 Rectas de calibración por cromatografía líquida: (a) AD2, (b) Bencidina, (c) 4-aminobifenilo

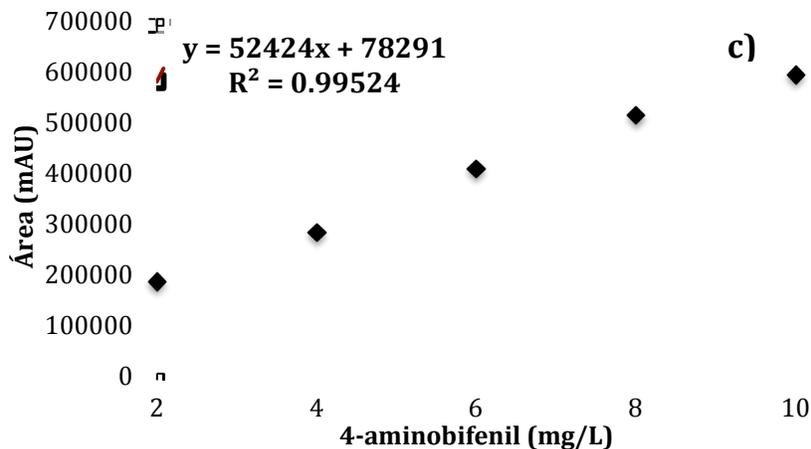


Figura 3.6 Rectas de calibración por cromatografía líquida: (a) AD2, (b) Bencidina, (c) 4-aminobifenilo (continuación)

3.4.3 Pruebas de toxicidad

Las pruebas de toxicidad se llevaron a cabo empleando, el método conocido como 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; EC₅₀= 23 mg/L). La prueba de toxicidad se llevó a cabo con la muestra al inicio y final de la cinética para obtener la EC₅₀. La toxicidad se expresa en unidades de toxicidad (UT), en donde TU= 100/EC₅₀.

4 OBTENCIÓN DE EXTRACTO PARCIALMENTE PURIFICADO

Existe un gran variedad de fuentes de peroxidasas como ya se mencionó: plantas, hongos y bacterias (Passardi *et al.*, 2007). De acuerdo con la literatura, el rábano picante (*HRP*) (Gholami *et al.*, 2013; Maddhinni *et al.*, 2006; Robinson, 1991), el nabo (Silva *et al.*, 2012) y el calabacín (Boucherit *et al.*, 2013) son algunas de las fuentes principales para la obtención de estas enzimas. Sin embargo, una de las principales desventajas que presentan es el empleo de materiales de primer uso, los cuales son insumos de la vida cotidiana de los seres humanos. Aunado a esto, se tienen los elevados costos de obtención de un extracto completamente puro, el cual es principalmente utilizado en cuestiones biotecnológicas, medicina y alimentos (Agostini *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 1996).

Recientemente se ha reportado el uso de la soya para obtención de peroxidasas con actividad enzimática. Varios trabajos presentan el uso eficiente de peroxidasas obtenidas a partir de soya para la degradación oxidativa de colorantes (Kalsoom *et al.*, 2013; Marchis *et al.*, 2011), fenoles (Kennedy *et al.*, 2002; Villalobos y Buchanan, 2002) y una amplia gama de sustratos (Geng *et al.*, 2001; Nissum *et al.*, 2001; Wright y Nicell 1999) obteniendo resultados muy similares al empleo de la peroxidasa *HRP*. Esto es debido a su capacidad altamente resistente a la desnaturalización térmica y química (Boscolo *et al.*, 2006; Kamal *et al.*, 2002, 2003), que hace de esta enzima un reactivo apropiado para aplicaciones industriales. Debido a lo anterior en este trabajo se decidió utilizar soya como fuente principal para la obtención de enzimas con actividad peroxidasa con el objetivo de catalizar la degradación de colorantes azo.

4.1 Soya (*Glycine max*)

La soja o soya (*Glycine max*) es una especie de la familia de las leguminosas *Fabaceae*. Es una planta oleaginosa de gran importancia a nivel mundial por sus usos para la producción de alimentos o productos alimenticios derivados de su alto contenido de proteína y energía (Kasai *et al.*, 2004). En promedio, el grano seco contiene 20% de aceite y 40% de proteína (Luna-Jiménez, 2007).

Las semillas de soya tienen color, forma y dimensiones muy variables. Generalmente son esféricas, pero pueden presentar forma ovalada, más o menos aplastada. Son de color pajizo, aunque pueden presentarse en verde, gris, pardo, bicolor o variegada (Figura 4.1) (Guerrero, 1998; López, 2002; Silveira y Durán 1998).



Figura 4.1 Variedades de soya producidas en el mundo

La producción mundial de semillas de soya en el 2015 está en torno a las 318.6 millones de toneladas, siendo los principales países productores: Estados Unidos, Brasil, Argentina, China, India, Paraguay y Canadá (USDA, 2015), de las cuales la mayoría se procesa para obtener piensos de animales y también, aunque en menor medida, alimentos destinados al consumo humano (Guerrero, 1998). Estos alimentos se agrupan en dos categorías: los alimentos no fermentados (harina de soya, tofu y leche de soya) y los fermentados (tempeh, miso y salsa de soya).

En el año 2009, en México se produjeron 153,000 toneladas 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 (Tabla 4.1), pero son las variedades 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).

Los principales subproductos obtenidos de la soya en México son el aceite y la leche para el consumo humano y la harina utilizada como ingrediente proteico de alimentos balanceados

para animales domésticos (principalmente cerdos y aves). El 97% de la proteína de soya en el país se destina para consumo animal y sólo un 3% para consumo humano (Jiménez, 2009).

Tabla 4.1 Variedad de soya cultivada en México (SAGARPA, 2009)

ACADIAN	TAPACHULA 86	LEE
BM-2	ESPERANZA	JÚPITER
HUASTECA 100	UFV-1	HUASTECA 200
CAJEME	LAGUNA 65	TROPICANA

Debido al empleo de soya como alimento para ganado y actualmente su potencial uso para el consumo humano, en México la industrialización de este grano se ha dividido en dos sectores potenciales: 1.- Procesamiento de semilla o grano completo y 2.- El procesado del grano de donde se obtienen aceite, tofu, leche, jugos, etc. De este último procesado se genera un desecho industrial llamado *OKARA*, el cual de acuerdo con las características que presenta y los volúmenes generados, es una fuente potencial para la obtención de extractos con actividad enzimática.

4.1.1 *OKARA, residuo de soya procesada*

El residuo generado de la industrialización de soya para la producción de jugo, leche, tofu etc., es llamado *OKARA* por su nombre en japonés que significa “corteza honorable” (Noguchi, 1987), en otros países es conocido como: *dou sha* (China), *bejee* (Corea) y *tempe gembus* en Indonesia (Liu, 1997). La *OKARA* es el residuo insoluble que se obtiene durante el proceso de industrialización de la soya (Figura 4.2). Constituye el principal subproducto generado por la industria alimentaria principalmente en Asia (OToole, 1999). Recientemente se ha convertido en un desecho típico de la agricultura, debido a su complicada reutilización ya que presenta, aproximadamente, un 80% de humedad. Este alto contenido de agua hace que sea difícil de manejar y su secado por medios convencionales resulte demasiado caro. Sin embargo, en la actualidad se han realizado una serie de estudios para diversificar su uso. Varias investigaciones han reportado que la *OKARA* contiene un remanente de proteínas, aceite y carbohidratos. Generalmente presenta un 25.4-28.4% de proteínas, 3.8-5.3% de carbohidratos y de 9.3-10.9% de grasas y aceites (Van der Riet *et al.*, 1989).



Figura 4.2 Residuo industrial de soya (OKARA)

Cerca de 1.1 kg de *OKARA* fresca es producida de 1 kg de soya procesada para la obtención de leche (Khare *et al.*, 1995). En Japón se producen enormes cantidades de *OKARA*. Cerca de 700 000 toneladas son generadas en la producción de tofu, quemando la mayoría como un residuo (Ohno *et al.*, 1996). En Hong Kong es depositado en terrenos planos. Sin embargo, se ha observado que se puede utilizar para elaborar diversos productos secundarios. O bien, se puede añadir al pan o a otros productos de panificación. Pero, la mayoría de las veces, debido a la gran cantidad de *OKARA* que se obtiene y lo altamente susceptible que es a la putrefacción, siendo potencialmente un problema ambiental, acaba siendo empleado principalmente como alimento para ganado (Rinaldi *et al.*, 2000).

En México, la producción de *OKARA* está enfocada principalmente a la industria de la leche. Una gran variedad de empresas cuentan con plantas de producción para la elaboración de carne, leche y jugos a base de soya, generando una cantidad considerable de residuo, el cual tiene como principal objetivo fungir como alimento para ganado.

4.2 Metodología

En este trabajo de investigación se utilizó el residuo industrial de una empresa la cual elabora un jugo comercial a base de soya. La *OKARA* fue utilizada como fuente principal para la obtención de extracto con actividad peroxidasa. En la Figura 4.3 se presentan muestras de *OKARA* húmeda y seca obtenidas del proceso de elaboración del jugo.

Las muestras de *OKARA* fueron colectadas cada mes, y transportadas hasta el laboratorio. El almacenaje fue realizado, pesando unidades de 100 g y congeladas para su uso posterior (Figura 4.4).



Figura 4.3 Residuo industrial de soya húmedo y seco



Figura 4.4 OKARA

4.2.1 Obtención del extracto crudo enzimático

Para la obtención del extracto crudo se utilizaron 200g de residuo de soya, el cual se mantuvo homogeneizado en 2 L de agua desionizada durante 15 horas a 4°C. Transcurrido el tiempo fue centrifugado a 10,000 rpm durante 20 min a 4°C en recipientes de 250 mL (Villegas- Rosas *et al.*, 2003). Del extracto obtenido se realizó una diálisis para eliminar las sales que pudiesen permanecer en el líquido extracelular. El extracto enzimático se dializó con una solución amortiguadora de acetato/ácido acético (1/50) a una concentración 10 mM con pH 4.5 a 4°C durante 15 h. Se emplearon membranas de celulosa con un corte de 12 kDa (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.), de modo que la enzima, de mayor tamaño, quedase retenida (Figura 4.5).



**Homogeneización
(Solubilización de
proteínas)**



**Centrifugación
(Eliminación de
fibras y obtención
de clarificado)**



**Diálisis
(Eliminación de
sales)**



**EXTRACTO
CRUDO**

Figura 4.5 Proceso de obtención del extracto crudo

4.2.1 Purificación parcial del extracto enzimático

Existe una gama diversa de procesos para la purificación de enzimas, tales como: precipitación con sulfato de aluminio, cromatografía en filtración de gel, cromatografía de intercambio iónico, entre otras. La purificación parcial del extracto crudo en esta investigación se llevó a cabo por el método de cromatografía de intercambio iónico, utilizando una columna de dietilaminoetil celulosa (*DEAE53-cellulose*) con dimensiones de 2.5x15 cm. La matriz fue equilibrada con una solución amortiguadora de fosfatos 0.2 mM y 0.01 mM (pH 7.4 a 4°C). Se alimentaron 700 mL de extracto crudo a la columna con una velocidad de flujo de 3 mL/min (Figura 4.6). Las proteínas fueron eluidas utilizando 100 mL de una solución de NaCl 1 M. Para cada una de las fracciones se midió la absorbancia a 280 nm, así como la concentración de proteínas y actividad enzimática.

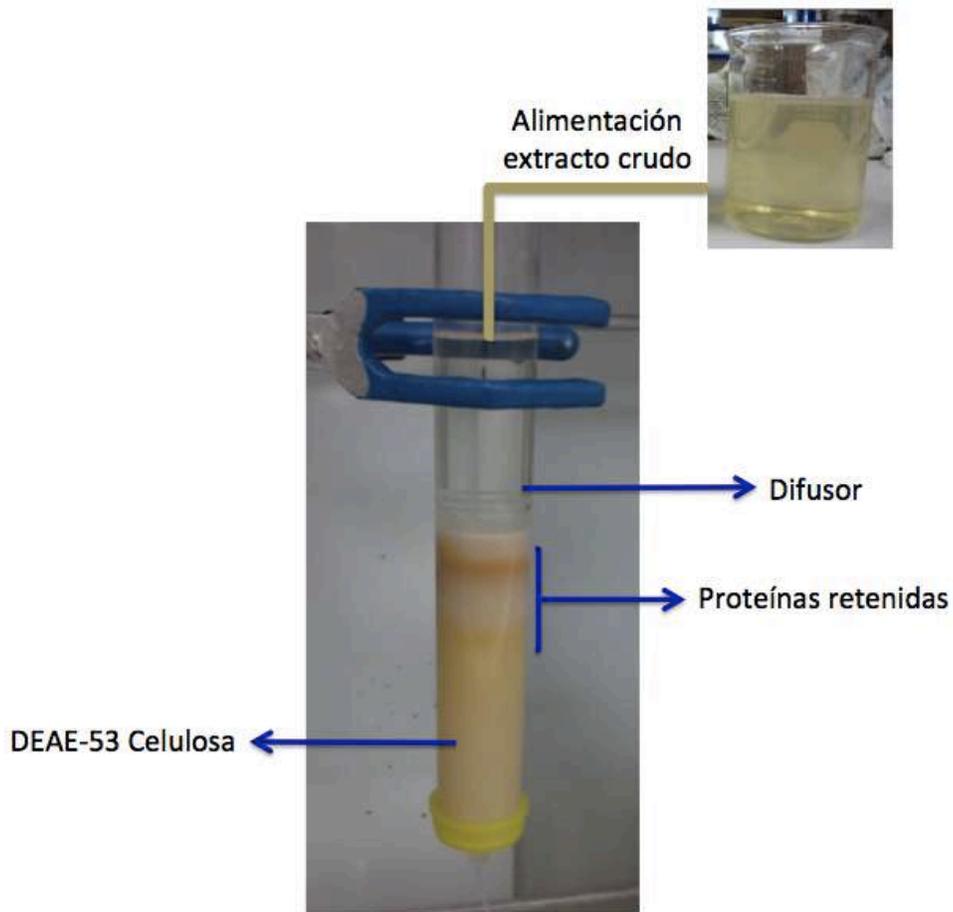


Figura 4.6 Cromatografía de intercambio iónico para la purificación parcial del extracto crudo

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Extracto crudo enzimático

El objetivo de la obtención de un extracto crudo enzimático (enzimas peroxidasas) es con la finalidad de garantizar que la muestra esté libre de sólidos suspendidos y sales, los cuales no interfieran en el proceso de purificación parcial provocando una colmatación del medio o en su caso un taponamiento en el sistema. Considerando la diversidad de técnicas y metodologías empleadas para la obtención de extractos, en este trabajo se adaptó una técnica específica para la solubilización de proteínas, eliminación de fibras y sales presentes en la *OKARA*, residuo de procesamiento de la soya.

En el proceso se observó que los factores clave para lograr obtener el extracto con actividad enzimática radican principalmente en el pH de la solución de diálisis y la velocidad de agitación en la centrifugación. Esto se debe a que, si la velocidad disminuye, los sólidos suspendidos no sedimentan en su totalidad y si la velocidad aumenta se corre el riesgo de arrastrar la enzima. Con respecto al pH de la solución de diálisis se observó que valores de pH menores de 4 unidades afectan el proceso de purificación parcial, limitando la adherencia de la enzima al intercambiador. En la Tabla 4.2 se presentan las condiciones de cada una de las operaciones realizadas para la obtención de extracto crudo.

Tabla 4.2 Condiciones para la obtención de extracto crudo enzimático

PROCESO	TIEMPO
Agitación	15 h 4°C
Centrifugación	10,000 rpm 20 min 4°C
Diálisis	15 h, AcH/AcNa 1/50 pH 4.5 y 4°C
Centrifugación	10,000 rpm 20 min 4°C

No obstante, es de gran importancia comentar que el residuo industrial nunca presentó un comportamiento homogéneo, algunas veces el color, olor y pH, eran diferentes, lo cual, repercutió en el proceso de extracción. Las primeras muestras de residuo industrial (*OKARA*) obtenidas del proceso, fueron las que presentaron mayor actividad enzimática. Sin embargo, en el proceso de extracción, las muestras con menor actividad enzimática fueron homogeneizadas y nuevamente sometidas al proceso para aumentar su actividad. De cada 2 litros de mezcla homogeneizada se obtuvo 1 L de extracto crudo enzimático, el cual presentó actividades enzimáticas de aproximadamente 2.8 ± 0.5 U/L. Comparada con 2 y 2.94 U/L que reportan Gholami *et al.* (2013) y Mohan *et al.* (2005), respectivamente, para el extracto obtenido de raíces de rábano picante, el cual es utilizado como estándar, se pudo observar que no había una diferencia significativa ($p < 0.05$).

En la Figura 4.7 se presentan las muestras del residuo industrial homogeneizado durante 15 horas a 4°C (A) y el extracto crudo al final del proceso (B). El extracto fue posteriormente empleado para llevar a cabo su purificación parcial, mediante cromatografía de intercambio iónico.

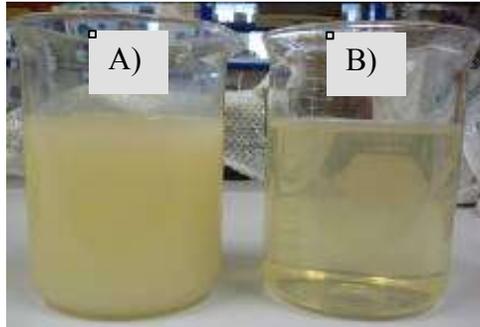


Figura 4.7 Muestras de residuo industrial A) Residuo industrial homogeneizado durante 15 h B) Extracto crudo de peroxidasa obtenido

4.3.2 Extracto enzimático con actividad peroxidasa

El proceso de cromatografía de intercambio iónico (CII) es ampliamente utilizado en el proceso de purificación de proteínas. Este proceso requiere un concentrado completamente clarificado y libre de sales (Aruna y Lali, 2001). En la Figura 4.8 se presenta la formación de 2 bandas características generadas por la retención de proteínas y su posterior elución.

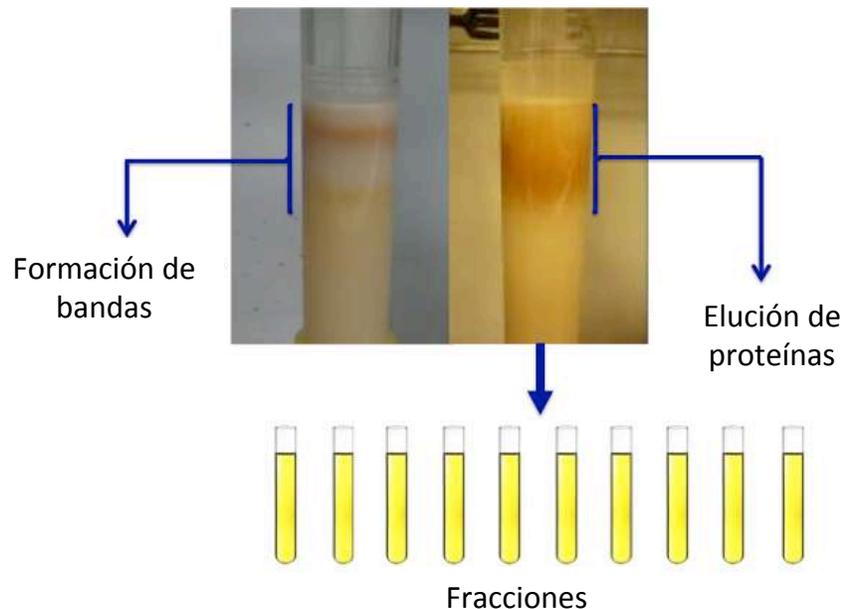


Figura 4.8 Elución de proteínas

En la determinación de proteínas y actividad enzimática se logró observar que de las 20 fracciones obtenidas de cada CII, las fracciones que presentan mayor actividad peroxidasa corresponden de la 9 a la 11, las cuales presentaron una tonalidad amarillo paja (**Figura 4.9**). Sin embargo, las fracciones (1-8) se observaron incoloras, mientras que las fracciones de la 12 en adelante su tonalidad fue marrón. Este evento permitió agilizar el proceso de recolección de fracciones y con ello determinar mediante la formación de la banda amarillo paja, si las muestras de extracto crudo enzimático presentarían actividad peroxidasa. Para generalizar este punto, se realizaron pruebas por triplicado, observando el mismo comportamiento.

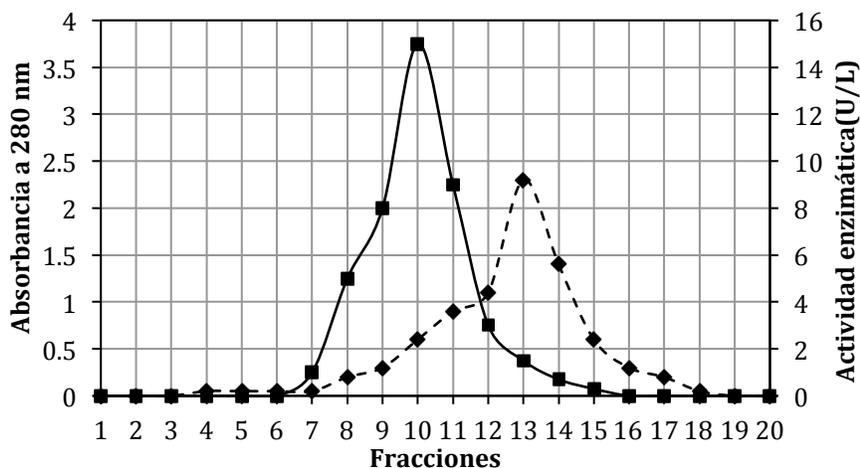


Figura 4.9 Perfil de elución de CII : (■) peroxidasa U/L, (◆) absorbancia a 280 nm

En la **Figura 4.10** se presenta la actividad enzimática del extracto crudo y su purificación parcial.

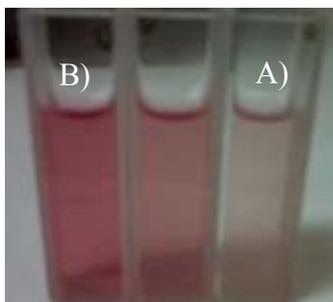


Figura 4.10 Actividad enzimática del extracto crudo (A) y su purificación parcial (B)

Para la obtención de un extracto con actividad peroxidasa se realizaron cerca de 100 CII. En la Figura 4.11 se presentan las más representativas. De acuerdo con los resultados, la actividad enzimática que presentó el extracto crudo fue de 2.8 U/L. Sin embargo, los datos experimentales para este estudio mostraron que cuando una purificación parcial se lleva a cabo mediante cromatografía de intercambio iónico, la actividad peroxidasa puede aumentar hasta 15 ± 5 U/L presentando en promedio 0.7 mg/mL de proteína total.

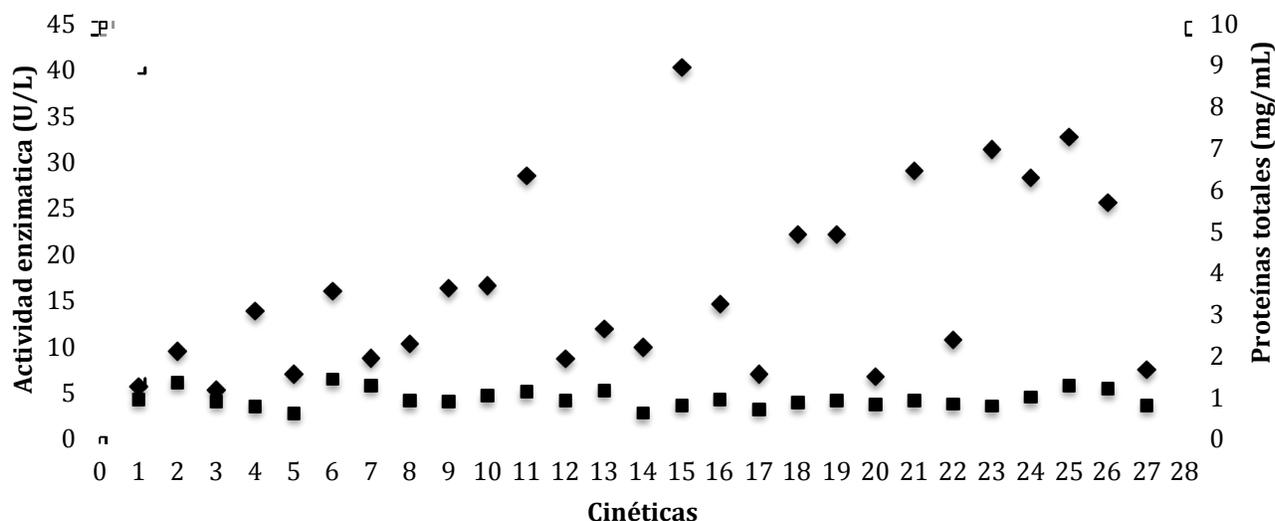


Figura 4.11 Cinéticas representativas en la purificación parcial de extracto crudo: actividad enzimática U/L (◆), concentración de proteínas mg/mL (■)

La caracterización de la purificación parcial del residuo industrial (*OKARA*) se presenta en la Tabla 4.3. Utilizando CII como primer paso de purificación los grados de la enzima aumentan 20 veces con un porcentaje de recuperación de 20.6% y una actividad específica de 22.7 U/mg. El extracto obtenido fue congelado hasta su uso posterior. Se han reportado en la literatura resultados similares donde las peroxidasa son obtenidas de plantas y vegetales por procesos convencionales. Shaffiqu *et al.* 2002 demostraron la obtención de peroxidasa con alta actividad enzimática utilizando plantas de *I. palmata* and *S. spontaneum* colectadas en Trivandrum, India. El extracto fue purificado por intercambio iónico y cromatografía en gel logrando un factor de purificación del 77.8%. Gholami *et al.* (2013) reportan la obtención de un extracto de raíces de rábano de una planta local de Irán con actividades enzimáticas de 2.36 U/L empleando la precipitación mediante sulfato de amonio como la primer etapa de purificación logrando incrementar la actividad peroxidasa a 18.5 U/L. Boucherit *et al.* (2013) utilizaron calabacín de Argelia para obtener peroxidasa utilizando el método de precipitación con acetona, obteniendo actividades enzimáticas de 2.19 U/L y un factor de purificación de 1.34.

Tabla 4.3 Purificación parcial de la peroxidasa a partir de residuos de soya procesada, *OKARA*

Fracciones	Enzima total (U)	Proteínas totales (mg)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Recuperación (%)
Extracto crudo	2.8	2.5	1.1	1	
CII	15	0.66	22.7	20	20.6

5 DEGRADACIÓN DEL COLORANTE AZUL DIRECTO 2

Los colorantes de tipo azo son los más consumidos en este sector. Corresponden al 70% de los colorantes empleados actualmente para teñir materiales textiles, de piel, cosméticos y alimentos. Se consideran compuestos xenobióticos recalcitrantes a los procesos biodegradativos, debido a su alta estabilidad a la luz y al ataque microbiano. A escala industrial estos colorantes tienen un elevado rendimiento económico, debido a la naturaleza de los procesos utilizados en su fabricación. Por estas razones, estos colorantes ocupan 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). De acuerdo con esto frecuentemente se emplean colorantes azo como modelo en el estudio del tratamiento de efluentes coloreados. En la actualidad existe una gran cantidad de procesos para el tratamiento de colorantes azo. Los procesos biológicos son los tratamientos más utilizados en la remoción de colorantes presentes en los efluentes industriales (Barragán *et al.*, 2007; Dos Santos 2007; Frijters *et al.*, 2006). Sin embargo las bajas eficiencias de degradación, altos tiempos de residencia, generación de productos tóxicos y altos costos han limitado el uso eficiente de estos procesos.

Las investigaciones más recientes se han enfocado al estudio de procesos enzimáticos como un pretratamiento potencial y una alternativa viable a los métodos convencionales debido a su naturaleza altamente selectiva (Husain, 2006; Kumar *et al.*, 2007) lo cual ha demostrado ser una tecnología eficiente para el manejo de efluentes con presencia de colorantes azo. En la literatura existen varias investigaciones que han reportado el uso de peroxidasas para la remoción de colorantes azo en fase acuosa, obteniendo porcentajes de decoloración entre 50 y 90% empleando diferentes condiciones de operación (de Souza *et*

al., 2007; Kalsoom *et al.*, 2013; Marchis *et al.*, 2011; Mohammad *et al.*, 2010; Mohan *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2012).

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de la aplicación del extracto con actividad peroxidasa para la degradación del colorante AD2, empleando un diseño factorial para determinar las mejores condiciones del tratamiento.

5.1 Metodología

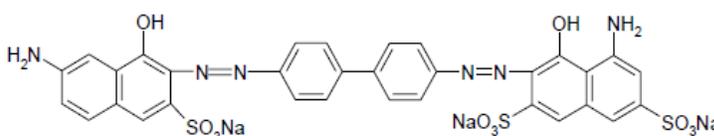
5.1.1 Preparación del extracto crudo enzimático

El extracto parcialmente purificado procedente del residuo industrial (*OKARA*), una vez descongelado se centrifugó en tubos de 10 mL en una centrífuga. El sobrenadante obtenido se separó y fue filtrado a través de filtros de membrana de celulosa de 0.45 mm (Millipore). La actividad enzimática del extracto obtenido osciló entre 15 y 20 U/L.

5.1.2 Agua sintética

El colorante empleado para las pruebas experimentales fue el colorante Azul Directo 2 (AD2), el cual fue proporcionado por la industria cooperante de Civac, Morelos, México. El colorante AD2 es un colorante diazo principalmente constituido a base de bencidina. Debido a la naturaleza tóxica de este colorante, no está permitida su aplicación a nivel mundial. Sin embargo en México es uno de los colorantes más empleados para el teñido de mezclilla. Algunas de sus propiedades así como su estructura química se presentan en la Tabla 5.1 (Cobos, 2015). La solución acuosa del colorante fue preparada antes de cada experimento por la disolución de la cantidad de colorante necesaria en agua deionizada.

Tabla 5.1 Propiedades fisicoquímicas y estructura molecular del AD2 (Cobos, 2013)

Nombre	AZUL DIRECTO 2
Colour Index	22590
Fórmula molecular	$C_{32}H_{21}N_6Na_3O_{11}S_3$
Masa molecular	830.71 g/mol
Solubilidad en agua	45 g/L (25°C)
Estructura molecular	

5.1.3 Estrategia experimental para la decoloración del AD2 y diseño de experimentos utilizado

Para la decoloración del AD2 se utilizó un diseño factorial 2^6 , utilizando el programa *STATGRAPHICS CENTURION*. Siendo 6 el número de factores experimentales utilizando dos intervalos de trabajo, alto y bajo.

En la Tabla 5.2 se presenta el diseño experimental utilizado en esta investigación, siendo los parámetros a evaluar: temperatura, pH, tiempo de contacto, dosis de enzima, dosis de peróxido y concentración de colorante. La selección de los intervalos de trabajo se basaron en estudios previos en los que se determinaron las condiciones más adecuadas para la degradación del colorante. La remoción de color medida espectrofotométricamente se fijó como parámetro de respuesta. Se obtuvo un total de 64 experimentos para determinar las cinéticas más 6 puntos centrales.

Tabla 5.2 Diseño experimental para la determinación de los mejores parámetros de operación para el tratamiento enzimático

Factores	Bajo	Alto	Unidades
Temperatura	25	50	°C
pH	3.5	7.5	unidades
Tiempo de contacto	2	6	h
Dosis de enzima (15 U/L)	1000	2000	μL
Dosis de peróxido (20 mM)	1000	2000	μL
Concentración de colorante	10	60	mg/L

Los estudios de decoloración se desarrollaron en una parrilla de agitación y calentamiento de nueve plazas (Dataplate Serie 730 PMC), utilizando matraces Erlenmeyer de 50 mL con un volumen de trabajo de 30 mL (Figura 5.1). La mezcla de la reacción se realizó utilizando un agitador magnético a 150 rpm. La reacción se inició al añadir H_2O_2 , el cual fue adicionado manualmente. Para estimar la concentración del colorante residual en la fase acuosa, se tomó una muestra cada 10 min. En todos los ensayos se realizó un seguimiento de la concentración del AD2 mediante espectrofotometría, análisis de *HPLC* y toxicidad, tal y como se describió en el Capítulo 3 de materiales y métodos. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. En las pruebas se utilizó un medio sin enzima como control de los experimentos, para excluir la posibilidad de que la degradación fuese debida a un proceso distinto a la reacción enzimática de la peroxidasa.

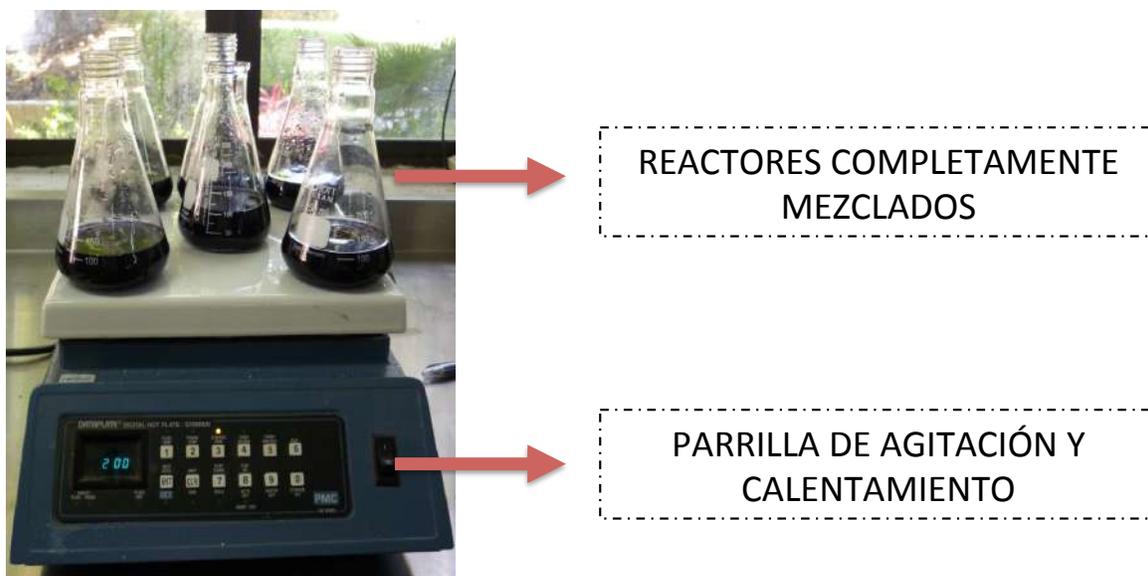


Figura 5.1 Sistema experimental para estudios de degradación del colorante AD2 usando una enzima obtenida de un residuo de soya

5.2 Resultados y discusión

En este apartado se presentan los resultados obtenidos de acuerdo con el diseño experimental planteado. En la Figura 5.2 se presenta el gráfico de efectos principales el cual muestra cómo afecta cada factor en el rendimiento. Las líneas indican el cambio estimado en el rendimiento conforme cada factor es movido de su nivel inferior a su nivel superior, manteniendo constantes todos los demás factores, con un valor a la mitad de sus respectivos niveles. Se puede observar que son 4 los efectos principales estadísticamente significativos que tienen un mayor impacto en la respuesta que los otros ($p < 0.05$). El rendimiento promedio a temperatura baja en la experimentación es aproximadamente del 50%, mientras que el rendimiento promedio a temperatura alta es de 65%. Se puede observar con precisión que empleando una temperatura promedio entre los valores seleccionados, la decoloración del tratamiento aumenta hasta un 72%. Un caso similar se observa con los parámetros de pH y concentración de colorante, observando que a concentraciones bajas de colorante las eficiencias disminuyen hasta un 58%. A la diferencia de porcentaje obtenido en cada uno de los parámetros en el rango bajo medio y alto se le conoce como “efecto principal”.

En la Tabla 5.3 se presentan los valores obtenidos de la regresión que se ha ajustado a los datos significativos. La ecuación del modelo ajustado resultante es:

$$\text{Decoloración} = -175.711 + 3.76027 \cdot \text{Temperatura} + 26.0379 \cdot \text{pH} + 12.3478 \cdot \text{Tiempo de contacto} + 0.0552966 \cdot \text{Dosis de enzima} + 0.97637 \cdot \text{Colorante} - 0.0472776 \cdot \text{Temperatura}^2 - 2.33293 \cdot \text{pH}^2 - 1.36065 \cdot \text{Tiempo de contacto}^2 - 0.0000161135 \cdot \text{Dosis de enzima}^2 - 0.0113951 \cdot \text{Colorante}^2$$

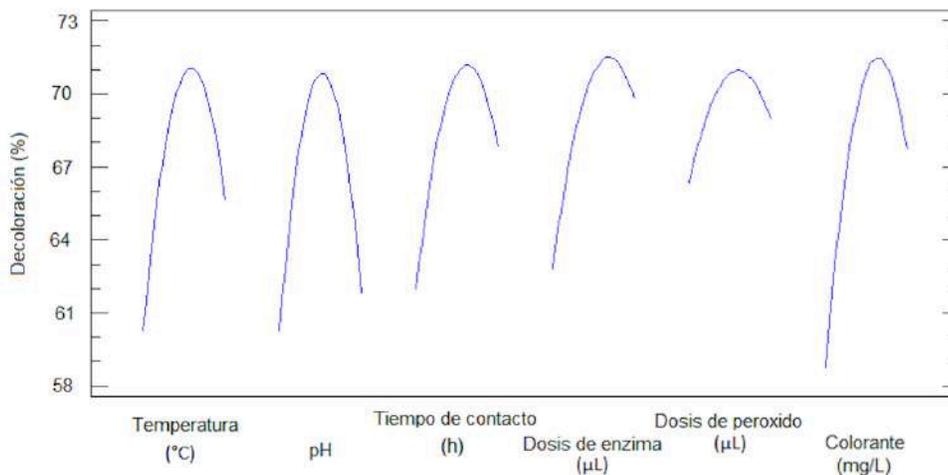


Figura 5.2 Gráfico de efectos principales para la decoloración.

Tabla 5.3 Coeficiente de regresión para decoloración

Coeficiente	Estimado
Constante	-175.711
A:Temperatura	3.76027
B:pH	26.0379
C:Tiempo de contacto	12.3478
D:Dosis de enzima	0.0552966
F:Colorante	0.97637
AA	-0.0472776
BB	-2.33293
CC	-1.36065
DD	-0.0000161135
FF	-0.0113951

Para visualizar el modelo ajustado se realizaron gráficos de respuesta empleando la ecuación obtenida utilizando los factores de interés.

5.2.1 Tiempo de reacción

De acuerdo con Guillard *et al.* (2003), Chen *et al.* (2003) y Chivukula y Renganathan (1995) el tiempo de decoloración muestra una relación con la estructura química de los colorantes. Colorantes con estructuras simples y masas moleculares bajas generalmente presentan mayores tasas de remoción de color.

La eficiencia de decoloración del AD2 está en función del tiempo de contacto con la enzima, como se puede observar en la Figura 5.3. De acuerdo con el diseño estadístico el tiempo óptimo para alcanzar la mayor eficiencia de decoloración es de 4 horas alcanzando una eficiencia del $70 \pm 1.95\%$. Después de este tiempo la decoloración es despreciable. Marchis *et al.* (2011), reportaron que 240 min es el tiempo de reacción para catalizar la degradación del colorante Azul Turquesa Remazol G133, logrando un porcentaje de decoloración del 60%. En otros trabajos empleando peroxidasa de *I. palmata* para la decoloración de colorantes tales como: Verde Brillante, Azul Directo y Chrysoidine, se requirió un tiempo de reacción de 60 a 120 min logrando porcentajes de decoloración de 54, 15 y 44%, respectivamente, con una concentración de trabajo de 25 mg/L (Shaffiq *et al.*, 2002). Mohan *et al.* (2005) han reportado que, 45 min de reacción es suficiente para la máxima decoloración del colorante Negro ácido a una concentración de 20 mg/L empleando peroxidasa de *HRP*, logrando porcentajes de decoloración cercanas al 60%. Maddhinni *et al.* (2006) reportaron que 105 min es el tiempo de contacto óptimo para lograr la máxima decoloración del colorante Amarillo Directo 12 a una concentración de 10 mg/L empleando peroxidasa de *HRP* obteniendo un porcentaje de decoloración del 70%.

En general, los colorantes con estructuras simples y bajas masas moleculares usualmente presentan velocidades de decoloración más rápidas. Sin embargo, la remoción del colorante es menos efectiva con colorantes altamente sustituidos y con altas masas moleculares (Chen *et al.*, 2003; Chivukula y Renganathan, 1995).

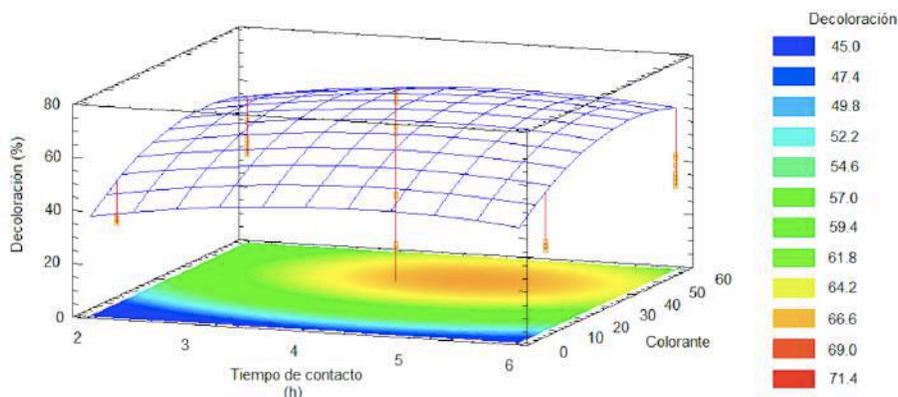


Figura 5.3. Gráfico de respuesta del tiempo de reacción

5.2.2 Valor de pH y temperatura

Las enzimas tienen un rango de pH y temperatura óptimo en el cual su actividad es máxima, el pH y T (°C) óptimo de una enzima en particular no es necesariamente idéntico para otras (Mohan *et al.*, 2005). Los experimentos mostraron que el proceso de decoloración es estrictamente dependiente del pH de la solución (Figura 5.4). La actividad enzimática de la peroxidasa aumenta considerablemente cambiando el pH de 3 a 5.5. Trabajando con valores de pH altos de la solución disminuye la decoloración. El pH para obtener la mayor decoloración del AD2 fue de 5.5 logrando un $73.9 \pm 1.5\%$. Estudios previos han reportado que 4 es el pH óptimo para la decoloración de colorantes diazo empleando peroxidasa de soya. Kalsoom *et al.* (2013) reportaron que el pH óptimo para obtener la mayor decoloración era de 4 unidades y Marchis *et al.* (2011) indicando que era de 3.9 unidades. Sin embargo se han llegado a reportar trabajos donde emplean valores de pH de 2.5 hasta 7 unidades (Bhunja *et al.*, 2002; Gholami *et al.*, 2013). Esto debido a que cada reacción enzimática posee un pH óptimo, el cual depende del sustrato involucrado y las condiciones de la reacción. Si la enzima es sometida a valores de pH muy bajos o muy altos, por lo general se causa su desnaturalización, la cual podría ser irreversible. Con respecto del parámetro de 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 con el diseño experimental, las temperaturas de 25 a 40°C causan un aumento en la decoloración del 56 al 70%, como se muestra en la Figura 5.4. No obstante, se puede observar la resistencia térmica de la peroxidasa, ya que a una temperatura de 50°C se logra obtener el 60% de decoloración. Resultados similares fueron reportados por Gholami *et al.* (2013), Boucherit *et al.* (2013) y Marchis *et al.* (2011). En estudios anteriores se ha reportado que la enzima peroxidasa de soya es térmicamente estable a T=90.5°C y 8 unidades de pH (McEldoon y Dordick, 1996). Por los resultados que presentó la peroxidasa de soya y su estabilidad a altas temperaturas y actividad enzimática en un rango de pH de 4 a 6.5, es prometedora para ser empleada en aplicaciones industriales.

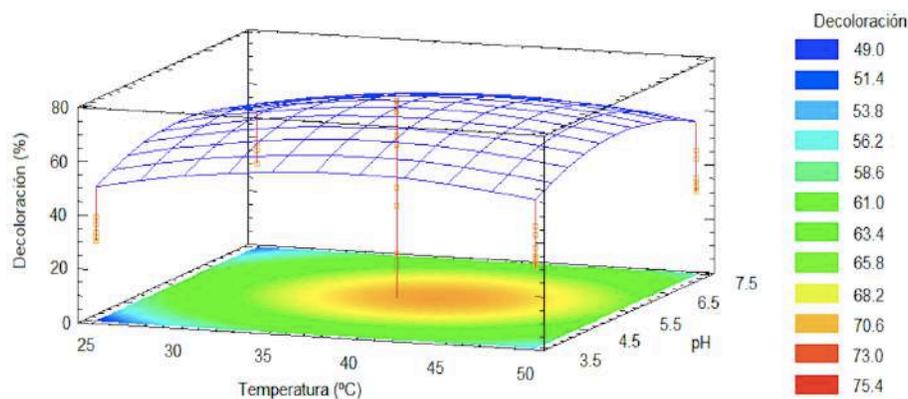


Figura 5.4. Gráfico de respuesta de temperatura y pH

5.2.3 Mejor concentración de H₂O₂

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 bajas puede ser un factor limitante en la velocidad de reacción (Mohan *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 1994). En la Figura 5.5 se puede observar que 1500 µL [1 mmol/L] es la dosis de H₂O₂ donde se obtiene la mayor actividad enzimática logrando decolorar un 70 ±2%. Concentraciones menores de 1200 µL [0.8 mmol/L] presentan una disminución en la velocidad de reacción. Silva *et al.* (2012), reportan resultados similares obteniendo porcentajes de decoloración del 57% utilizando peroxidasa de nabo. En la Figura 5.6 se presentan las muestras al final del tratamiento, observando la diferencia de decoloración para cada una de las concentraciones de peróxido.

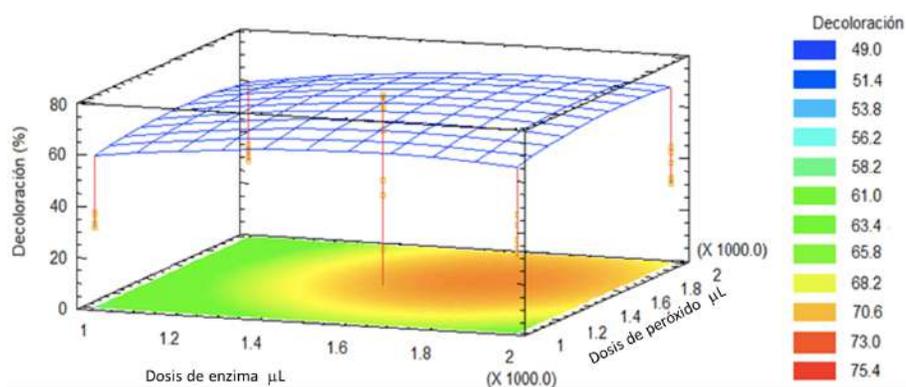


Figura 5.5 Gráfico de respuesta de dosis de enzima y peróxido

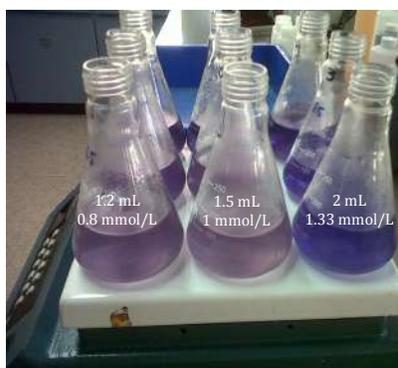


Figura 5.6 Muestras al final de la reacción en función de la dosis de peróxido

5.2.4 Mejor concentración de colorante

La concentración del sustrato presente en la fase acuosa es un factor clave que afecta la velocidad de oxidación catalizada por una enzima (Silva *et al.*, 2012). Los resultados se muestran en la Figura 5.7 donde se observa que el mayor porcentaje de decoloración se obtiene a concentraciones mayores de 40 mg/L logrando decolorar un 71%, mientras que a concentraciones menores de 30 mg/L los resultados en relación con la decoloración resultaron ser bajos. En la Figura 5.8 se presentan las muestras al final del tratamiento. Boucherit *et al.* (2013), Silva *et al.* (2012), Yu *et al.* (2006) y Mohan *et al.* (2005), reportaron resultados similares en estudios de decoloración enzimática empleando peroxidadas y concluyendo que la velocidad de decoloración aumenta con el incremento de la concentración. La concentración de sustrato presente en la fase acuosa tiene una influencia significativa sobre las reacciones enzimáticas. Esto se debe a la existencia de una relación óptima entre la concentración de enzima y la de sustrato para lograr la máxima actividad. Si la cantidad de enzima se mantiene constante y la concentración de sustrato se incrementa gradualmente la velocidad de reacción puede aumentar hasta alcanzar su máximo valor. Después de obtener el equilibrio, el aumento de sustrato no representará cambios en la velocidad de reacción (Mohan *et al.*, 2005).

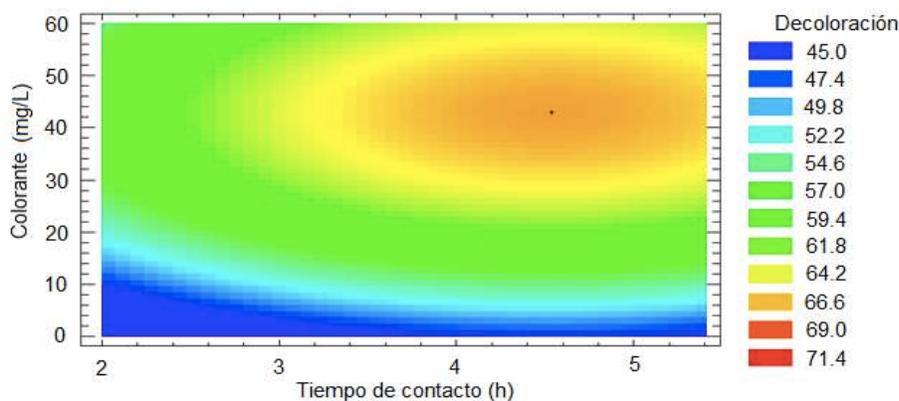


Figura 5.7 Gráfico de respuesta de concentración de colorante



Figura 5.8 Muestras al final de la reacción en función de la concentración del AD2

5.2.5 Optimización del proceso de decoloración

De acuerdo con los resultados obtenidos del diseño experimental, para lograr un porcentaje máximo de decoloración de AD2 del 73%, las mejores condiciones encontradas para cada uno de los factores que influyen en el tratamiento se presentan en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4 Diseño optimizado del proceso de decoloración del AD2

Factor	Bajo	Alto	Óptimo*
Temperatura (°T)	25	50	40.03
pH	3.5	7.5	5.57
Tiempo de contacto (h)	2	6	4.08
Dosis de enzima (μL/30 mL)	1000	2000	1735.54
Dosis de peróxido (μL/30 mL)	1000	2000	1518.71
Colorante (mg/L)	10	60	40.67

*A las condiciones estudiadas

Para determinar que las mejores condiciones encontradas para el tratamiento del colorante AD2 mediante peroxidasas de soya realmente fuera exitoso, se realizó una serie investigativa sobre la cinética con esas condiciones, concluyendo que las eficiencias de decoloración se mantuvieron constantes en 70 ± 3 %. En la Figura 5.9 se presentan las muestras al inicio y final del tratamiento enzimático, empleando las mejores condiciones de operación, arriba mencionadas.



Figura 5.9 Muestras al inicio y final del tratamiento enzimático

El espectro de absorbancia del colorante AD2 con una concentración de 40 mg/L antes y después del tratamiento enzimático empleando las mejores condiciones de operación se presenta en la Figura 5.10. El espectro presenta un pico principal con una máxima absorbancia de 576 nm correspondiente al colorante AD2. La disminución del pico principal tomó lugar debido a la decoloración, la cual se pudo llevar a cabo debido a la precipitación o abertura de la estructura del anillo aromático transformándolo en otros

productos después del tratamiento enzimático. Esto podría suponer que los enlaces del colorante azo ($-N=N-$), cromóforos conjugados característicos de las moléculas azo se pudieron romper (Wang *et al.*, 2009). Sin embargo, algunos picos adicionales aparecen en el espectro a longitudes de onda de 212 y 265 nm, lo cual probablemente es el resultado de la absorbancia de algunos metabolitos o fragmentos degradados de la molécula del colorante (Boucherit *et al.*, 2013).

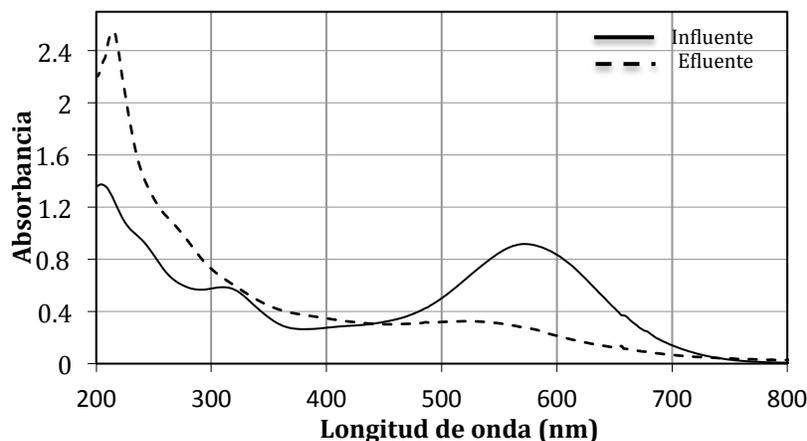


Figura 5.10 Espectro UV-Vis del colorante a una concentración de 40 mg/L de solución de AD2 antes y después del tratamiento enzimático

Para identificar los productos de decoloración en el tratamiento enzimático empleando las mejores condiciones de operación, las muestras fueron analizadas mediante *HPLC*. De acuerdo con las pruebas cromatográficas se logró identificar al colorante en un tiempo de retención de 4.2 min (Figura 5.11a). Después del tratamiento enzimático el pico correspondiente al colorante disminuyó. Sin embargo, 2 picos nuevos aparecieron con tiempos de retención de 1.5 y 7.2 min, correspondiendo a la formación de bencidina y 4-aminobifenilo (Figura 5.11b). De acuerdo con la literatura, estos compuestos son los principales productos de la degradación de los colorantes azo (Bafana *et al.*, 2007; Golka *et al.*, 2004). Sin embargo, de acuerdo con la estequiometría de la reacción sólo el 20% de la bencidina y el 10% del 4-aminobifenilo pudieron recuperarse (Figura 5.12). Esto pudo deberse en primer lugar, a la forma paralela de otros productos que son generados por diferentes vías de degradación o por la degradación natural de los intermediarios. Por otro lado, puede ser que éstos no sean los productos finales y que el proceso de reacción continúe de tal forma que las aminas sean oxidadas o, en su caso, que existan otras maneras alternativas de generar los productos de la degradación, los cuales no fueron estudiados en esta investigación.

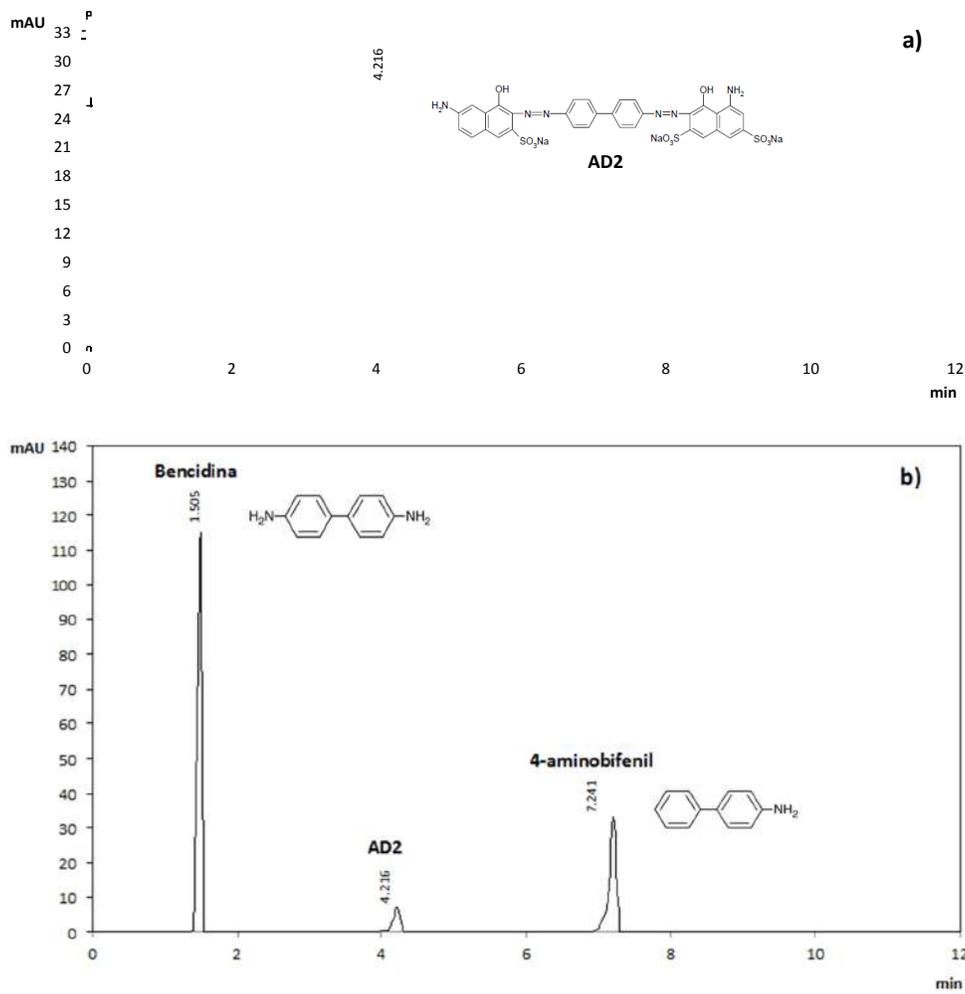


Figura 5.11 Cromatogramas de la solución de AD2 antes (a) y después (b) del tratamiento enzimático

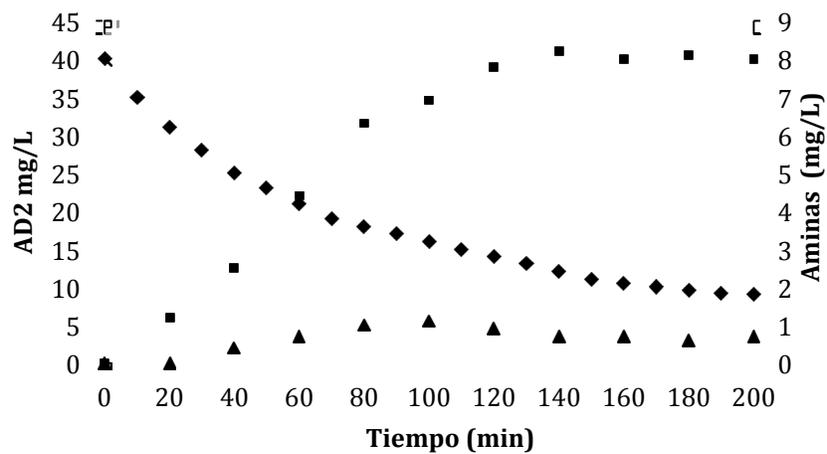


Figura 5.12 Perfil de la oxidación enzimática del AD2 medida por HPLC: (◆) AD2; (■) Bencidina; (▲) 4-aminobifenil

5.3 Constantes cinéticas

Se proponen dos tipos de métodos para evaluar los parámetros cinéticos de las reacciones enzimáticas: i) métodos diferenciales, en los que se obtiene la velocidad de reacción directamente de la pendiente de la curva de concentración de sustrato o de producto frente al tiempo; ii) métodos integrales, en los que se integra la ecuación de velocidad y se obtiene una expresión para la variación de la concentración frente al tiempo (Bódalo *et al.*, 1999).

Los métodos diferenciales se aplican sobre pruebas en discontinuo, donde se obtiene la curva de la variación de la concentración con el tiempo. Estos métodos presentan la ventaja de que un solo ensayo proporciona un gran número de pares de puntos, aunque cuanto más suave es la pendiente de la curva, más difícil es determinar el valor con precisión. Otro inconveniente de estos métodos es que la actividad enzimática debe permanecer constante durante la reacción. Para solventar estas desventajas se trabajó con el método de las velocidades iniciales, en el que las concentraciones de productos, sustratos y enzima se consideran constantes y la pendiente inicial de la curva se puede determinar fácilmente.

Se realizaron pruebas de degradación a distintas concentraciones iniciales del colorante con el fin de observar el efecto de la concentración de sustrato en la cinética de degradación (Figura 5.13). Para la determinación de este estudio, se trabajó con los datos donde la enzima se mantuvo constante en todas las pruebas, y se siguió la concentración del colorante durante 4 h, a intervalos de 20 min. Los perfiles de decoloración para las concentraciones iniciales de 10,20,30, 40 y 50 mg/L se muestran en la Figura 5.13.

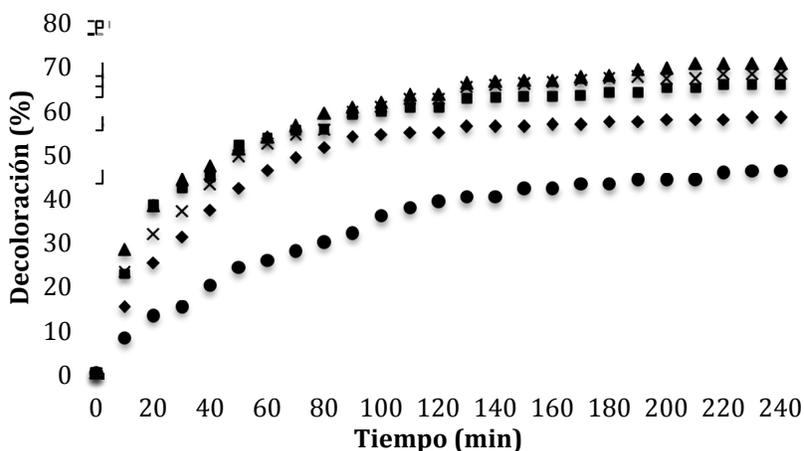


Figura 5.13. Decoloración del colorante AD2 en pruebas en discontinuo a las concentraciones iniciales: (○) 10 mg/L; (◇) 20 mg/L; (□) 30 mg/L; (x) 40 mg/L; (△) 50 mg/L

Aplicando el método de las velocidades iniciales, se consideraron las pendientes de degradación de cada ensayo en el intervalo de tiempo tal que los pares de puntos proporcionaran una cinética de primer orden con respecto al sustrato. Para determinar ese intervalo se realizó una representación de $\ln(S/S_0)$ con respecto al tiempo y se calculó la constante cinética k de cada ensayo como la pendiente de los puntos que constituyen una recta. Los valores de dichas constantes y las velocidades de reacción calculadas a partir de las mismas se representan en la Tabla 5.5 .

Tabla 5.5. Parámetros cinéticos de la degradación del colorante AD2 a diferentes concentraciones iniciales

S_0 mg/L	$k 10^{-2}$ (min^{-1})	$r_0=k*S_0$ (mg/L*min)
10	8.88	0.888
20	8.18	1.636
30	7.74	2.20
40	5.93	2.37
50	4.61	2.3
60	3.89	2.33

Como se puede observar en la Tabla 5.5, las mayores velocidades de degradación se obtuvieron en concentraciones mayores de 40 mg/L, tal como lo indica el análisis estadístico. También se observa que a concentraciones mayores no hay diferencia significativa. Esto se debe a que si la cantidad de enzima se mantiene constante y la concentración de sustrato se incrementa gradualmente, la velocidad de reacción puede aumentar hasta alcanzar su máximo. Después de obtener el equilibrio, el aumento de la concentración del sustrato no provocará cambios en la velocidad de reacción (Mohan *et al.*, 2005).

5.4 Pruebas de toxicidad

La toxicidad aguda de colorantes se puede evaluar utilizando *Daphnia magna*, *Salmonella typhimurium*, peces, ensayos en ratas etc. (Dönbak *et al.*, 2006; Kwon *et al.*, 2008; Mathur *et al.*, 2003). Otra manera de evaluar la toxicidad es mediante ensayos de Microtox®, donde se calcula la EC_{50} (concentración necesaria para reducir 50% de la luminiscencia) de una cepa de *Vibrio fischeri* después de 5 min de incubación.

Se evaluó la EC_{50} para determinar la toxicidad del compuesto original, encontrando que no solamente algunos colorantes pueden ser tóxicos sino también sus productos de degradación (Ramsay y Goode, 2004). Por lo tanto, no solamente es necesario evaluar la

toxicidad del colorante sino también la de los subproductos generados durante su degradación. Las pruebas de toxicidad pueden verificar la eficiencia de enzimas o microorganismos no sólo para remover el color sino para disminuir la toxicidad. La pérdida de toxicidad junto con la pérdida de color permitirán que el efluente pueda ser descargado al ambiente de manera segura (de Souza *et al.*, 2007).

El estudio de toxicidad del efluente después del tratamiento se llevó a cabo con el propósito de evaluar si los productos de reacción podrían ser más tóxicos que el colorante original. Con el fin de evitar las interferencias de los productos químicos empleados en la reacción enzimática se analizaron cada uno de los parámetros de control por separado: colorante, enzima, peróxido y ácido sulfúrico, el cual fue empleado para ajustar el pH, así como la muestra final del tratamiento. En la Tabla 5.6 se presentan los resultados obtenidos de la prueba de toxicidad utilizando *Vibrio fischeri*. De acuerdo con los resultados obtenidos se observó que los productos químicos utilizados no contribuyen con el aumento de toxicidad. Sin embargo, al final del tratamiento del colorante a una concentración de 40 mg/L, las unidades de toxicidad que presentaron las muestras fue en promedio de 4 UT. Estos resultados muestran que después del tratamiento hay un incremento del valor de la toxicidad. 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-aminobifenilo (Bafana *et al.*, 2007; Golka *et al.*, 2004) las cuales son aminas aromáticas altamente tóxicas que pueden contribuir con el incremento de toxicidad. Silva *et al.* (2012) reportaron la toxicidad aguda del tratamiento del colorante Azul Reactivo 21 empleando *L. sitiva*, observando que al final del tratamiento enzimático hay un incremento en la toxicidad debido a la formación de metabolitos que son más tóxicos que la propia molécula del colorante. La toxicidad del efluente puede ser eliminada por la combinación de un proceso biológico en el cual los subproductos formados en el tratamiento enzimático podrían ser degradados por un consorcio microbiano.

Tabla 5.6 Prueba de toxicidad aguda empleando *Vibrio fischeri*

REACCIÓN	Toxicidad (UT)
Colorante +Agua	No tóxico
Peróxido +Agua	No tóxico
Enzima + Agua	No tóxico
H₂SO₄ +Agua	No tóxico
Colorante + Peróxido + Enzima+ H₂SO₄	3.91

6 TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DE UN EFLUENTE TEXTIL

Los aportes científicos en el tema del tratamiento de colorantes azo por procesos: físicos, químicos y biológicos ha sido muy estudiado, obteniendo resultados satisfactorios (Gupta y Suhas 2009; Gutowska *et al.*, 2007; Hai *et al.*, 2007; Moeller *et al.*, 2012; Muthukumar y Selvakumar, 2004; Prato y Buitrón, 2012; Verma *et al.*, 2012). Sin embargo estos procesos se ven limitados al momento de proponerlos para el tratamiento de un efluente real, ya que su estudio es a nivel de laboratorio, trabajando con una formulación de agua sintética en condiciones controladas. Y considerando las características heterogéneas de los efluentes industriales esto limita la aplicación de su tratamiento. Debido a lo anterior, resulta complejo plantear una alternativa capaz de tratar de una manera eficiente todos los contaminantes presentes en los efluente textiles (Hai *et al.*, 2007), ya que éstos presentan una gran variedad de contaminantes con un efecto potencialmente nocivo para los sistemas de tratamiento (dos Santos, 2007). La presencia de mezclas de colorantes y los cambios en su concentración conducen por lo general a una inestabilidad operativa principalmente en procesos biológicos y sus combinaciones (Buitrón *et al.*, 2004; Rai *et al.*, 2005). Adicionalmente la presencia de agentes auxiliares químicos y la tecnología instalada contribuyen al aumento de la complejidad y al volumen de las descargas producidas (Işik y Sponza, 2007; Rai *et al.*, 2005).

Debido a las limitaciones que presentan los procesos convencionales para el tratamiento de compuestos recalcitrantes, en la actualidad los tratamientos enzimáticos suelen ser prometedores para su degradación. En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de la aplicación de un extracto con actividad peroxidasa procedente del tratamiento de *OKARA* para la degradación del colorante AD2 presente en un efluente real procedente de una industria de teñido. La capacidad oxidativa del extracto enzimático preparado,

utilizando como medio de reacción un efluente del proceso de teñido, se evaluó empleando las mejores condiciones encontradas descritas en el Capítulo 5 con un efluente sintético.

6.1 Metodología

6.1.1 Agua residual de la industria textil

Se realizaron 2 muestreos compuestos a efluentes de la industria textil que emplean colorantes azo (Figura 6.1) analizando los parámetros de la NOM 001-SEMARNAT-1996 incluyendo color (Pt-Co), concentración de colorante (mg/L) y DQO (mg/L) para la caracterización de los efluentes industriales:

- Uno se realizó en la zona de Santa Ana Xamimilulco, Puebla, México, en una lavandería de mezclilla en donde utilizan principalmente colorantes azo y la otra en;
- Una industria ubicada en la zona industrial de Civac, Cuernavaca, Morelos, México, donde realizan la fabricación y teñido de hilos.

El proceso de producción en cada una de las empresas se realiza utilizando operaciones unitarias en lote ya que, de acuerdo con la demanda de producto que se tenga, es la tinción de la fibra. Debido a esto, las muestras para la experimentación se tomaron cuando el colorante de estudio fue utilizado en el proceso. Obtenidas las muestras fueron almacenadas en un cuarto frío a 4°C, para su análisis posterior.



Figura 6.1. Descarga general a) lavandería de mezclilla b) industria textil

6.1.2 Estrategia experimental para la decoloración de un efluente textil

En el capítulo anterior se determinaron las mejores condiciones de operación en donde el extracto enzimático obtenido a partir de la *OKARA* alcanzó su mayor actividad catalítica (Tabla 6.1). Estas condiciones se emplearon para la decoloración del efluente textil.

Tabla 6.1. Mejores condiciones de operación para la decoloración del AD2 en agua desionizada

FACTOR	ÓPTIMO
Temperatura (°T)	40.03
Valor de pH	5.57
Tiempo de contacto (h)	4.08
Dosis de enzima 15 U/L (μ L/30 mL)	1735.54
Dosis de peróxido 20 mM (μ L/30 mL)	1518.71
Concentración de colorante (mg/L)	40.67

**A las condiciones estudiadas*

Los estudios de decoloración se desarrollaron en una parrilla de agitación y calentamiento de nueve plazas (Dataplate Serie 730 PMC), utilizando matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de trabajo de 100 mL (Figura 6.2). La mezcla de la reacción se realizó utilizando un agitador magnético a 150 rpm. La reacción inicio al adicionar el peróxido de hidrógeno. Para estimar la concentración del colorante residual en la fase acuosa, se tomó una muestra cada 10 min de cada reactor. En todos los ensayos se realizó un seguimiento de la concentración del AD2 mediante espectrofotometría, análisis de *HPLC* y toxicidad, tal y como se describió en el Capítulo 3 de materiales y métodos. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. En las pruebas se utilizó un medio sin enzima como control de los experimentos, para excluir la posibilidad de que la degradación fuese debida a un proceso distinto a la reacción enzimática.



Figura 6.2 Sistema experimental para el tratamiento del efluente textil

6.2 Resultados y discusión

6.2.1 Caracterización de los efluentes textiles

El primer muestreo se realizó en la zona de Santa Ana Xalmimilulco Puebla, México. Esta población se caracteriza por tener un sector productivo de microempresas familiares para el lavado de mezclilla y debido a estas actividades, se ha generado un problema local de contaminación del agua, afectando de manera potencial al río Xochiac. La ubicación de la zona de muestreo así como su descarga general al cuerpo receptor se presenta en la Figura 6.3. Debido a las características heterogéneas que presentan estos efluentes se realizó un muestreo compuesto durante una jornada de trabajo.



Figura 6.3. Ubicación de la zona de muestreo: Santa Ana Xalmimilulco, Puebla, México, incluyendo la descarga del efluente general

La lavandería cuenta con 3 procesos de teñido y sólo tiene un canal de descarga donde se unen todos los efluentes del proceso (Figura 6.4) los cuales llegan a una planta de tratamiento de tipo fisicoquímico basado en la operación coagulación-floculación la cual no funciona satisfactoriamente por falta de productos y técnicos capacitados para su operación, provocando que la descarga salga prácticamente sin ningún tratamiento previo.



Figura 6.4. Efluente general de la lavandería de mezclilla en Santa Ana, Xamimilulco, Puebla, México

El muestreo se realizó en un día laboral de 7 am a 2 pm. En este día se tiñeron más 1000 pantalones de mezclilla utilizando el colorante Azul Directo 2. En la Figura 6.5 se observa el muestreo realizado. Cabe hacer mención que el efluente general era muy heterogéneo, iniciando por el caudal, ya que se tuvieron flujos de 0.5 hasta 5 L/s. El efluente presentó temperaturas entre 15 y 35°C y las tonalidades cambiaban constantemente pudiendo observar algunas precipitaciones por el aumento del pH oscilando entre 5 a 12 unidades provocado por el NaOH utilizado en el proceso.



Figura 6.5. Toma de muestras del efluente general

Los resultados obtenidos del muestreo se presentan en la Tabla 6.2. Se observó que la concentración de DBO_5 es de 451 mg/L, la DQO de 1393 mg/L y el color es de 382 UPt-Co, que comparados con la normatividad aplicable, son mayores y algunos no se encuentran normados.

La caracterización del efluente general de una fábrica de hilos ubicada en Cuernavaca Morelos, México se presenta a continuación. En esta ciudad se cuenta con un corredor industrial ubicado en la zona conocida como Civac. Toda el agua residual generada se concentra en un colector que la conduce hasta la planta de tratamiento llamada ECCACIV (Empresa para el Control de la Contaminación del Agua de Civac). Dentro de las principales industrias generadoras de aguas residuales con alto contenido de color se encuentra una industria productora de hilos ubicada en el centro del corredor industrial (Figura 6.6), empresa dedicada a la generación y teñido de hilos (Figura 6.7).

Tabla 6.2 Caracterización del efluente general de la lavandería de mezclilla en estudio

PARÁMETRO	CONCENTRACIÓN	NOM-001-SEMARNAT-1996 (Protección de vida acuática)	UNIDADES
DBO	451.16	60	mg/L
DBO soluble	149.3	n. a.	mg/L
DQO	1393.63	n. a.	mg/L
DQO soluble	361.73	n. a.	mg/L
Grasas y aceites	44.24	25	mg/L
SST	970.03	60	mg/L
SDT	2298	n. a.	mg/L
Color aparente	382.86	n. a.	U Pt/Co
Color verdadero	77.14	n. a.	U Pt/Co
Fenoles	0.04	n. a.	mg/L
N-Total	37.05	25	mg/L
N-NH₄	26.62	n. a.	mg/L
N-Nitratos	1.63	n. a.	mg/L
N-Nitritos	0.04	n. a.	mg/L
P-Total	7.21	10	mg/L
P-Orgánico	3.21	n. a.	mg/L
P-Orto	2.19	n. a.	mg/L
P-Total disuelto	2.34	n. a.	mg/L
Sulfuros	20.34	n. a.	mg/L
Cloruros	338.04	n. a.	mg/L
Cloro residual	0.21	n. a.	mg/L
Toxicidad <i>Vibrio fischeri</i>	9.49	n. a.	Unidades de toxicidad
pH	8.33	5 - 10	-
Conductividad eléctrica	4023.19	n. a.	mS/cm
Alcalinidad total CaCO₃	956.65	n. a.	mg/L
Oxígeno disuelto	1.38	n. a.	mg/L
Coliformes fecales	3.47x10 ⁵	1000 - 2000	NMP/100mL

n.a., no aplicable



Figura 6.8. Tanque de almacenamiento de agua residual de una de las industrias en estudio

Tabla 6.3. Caracterización del efluente general de la industria cooperante

PARÁMETRO	VALOR
DQO (mg/L)	9313
DBO (mg/L)	794
Color verdadero (UPt/Co)	2000
AD2 (mg/L)	60 mg/L
Fosfatos totales	113.53
Sulfatos (mg/L)	1566
N-NH ₃ (mg/L)	404
N-Total (mg/L)	471
G y A (mg/L)	24.3

6.2.2 Cinéticas de degradación del colorante AD2 presente en el efluente textil

Para el estudio de las cinéticas experimentales se utilizó el efluente de la industria productora de hilos por dos motivos: el uso del colorante AD2 para el teñido de hilos y la cercanía de la empresa con el laboratorio donde se realizó la experimentación. Las cinéticas de decoloración se realizaron con 6 lotes diferentes de las descarga de aguas residuales de un reactor empleado para teñido. En la Figura 6.9 se presentan los resultados por triplicado obtenidos del tratamiento enzimático empleando las mejores condiciones de operación. Las muestras analizadas del efluente del reactor presentaron concentraciones de AD2 entre 47 y 60 mg/L. La mayor eficiencia obtenida correspondió al 52 ±2% de decoloración del

colorante AD2 presente en el efluente textil (Lote 4). Se obtuvo un 40% de remoción de color en promedio para las demás muestras. La principal causa de este comportamiento fue debido a la gran variedad de aditivos, fijadores y suavizantes que se emplean para esta etapa de teñido, aunado esto al aumento de concentración de AD2. Sin embargo, se pudo observar que aún en presencia de productos químicos, la enzima logró decolorar, empleando el colorante como sustrato principal, lo que indica que conserva su capacidad oxidante pese a la presencia de estos productos.

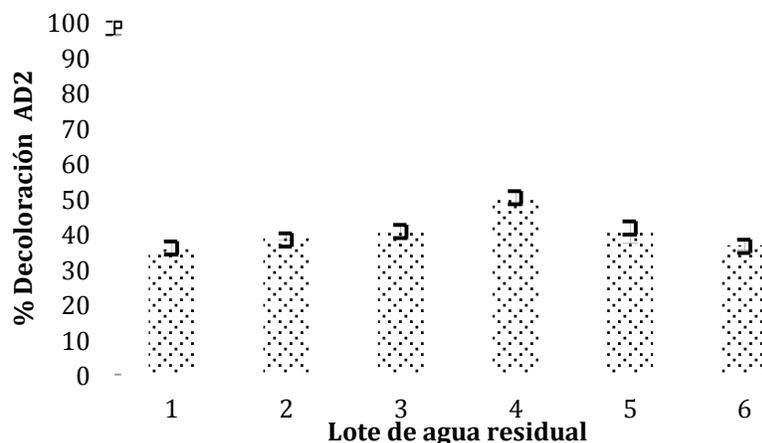


Figura 6.9. Eficiencias de decoloración obtenidas del tratamiento del efluente textil

El espectro de absorbancia del efluente textil antes y después del tratamiento enzimático empleando las mejores condiciones de operación se presenta en la Figura 6.10. En esta figura el espectro presenta un pico principal con una máxima absorbancia de 576 nm correspondiente al colorante AD2. Así mismo se puede observar interferencia entre 200 y 300 nm, debido a que la principal característica del efluente textil es la presencia de sustancias químicas auxiliares utilizadas en el proceso. En la literatura se ha reportado que las enzimas peroxidadas pueden ser una alternativa idónea para el tratamiento de efluentes textiles e incluso para aguas contaminadas con otros tipos de contaminantes. Sin embargo, a pesar de la alta eficiencia para decolorar efluentes coloreados (principalmente, aguas sintéticas) se observó que el extracto parcialmente purificado logró un 52% de decoloración con un tiempo de reacción de 4 horas.

En la Figura 6.11, se presenta la evolución de la decoloración del AD2 presente en el efluente textil (Lote 4). La muestra presentó una concentración inicial de 53 mg/L. Empleando el método de las velocidades iniciales, se determinó una k de $0.028 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ con una velocidad de 1.48 mg/L-h , observando que para el agua sintética para esta concentración osciló en 2.3 mg/L-h .

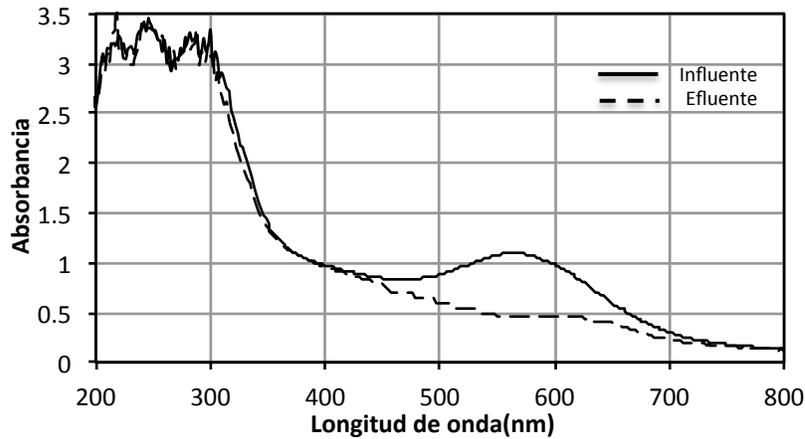


Figura 6.10. Espectro UV-Vis del colorante a una concentración de 40 mg/L influente y efluente del tratamiento enzimático

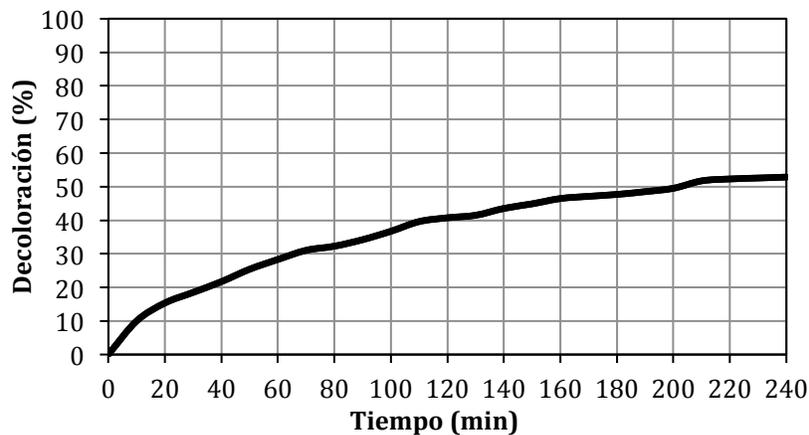


Figura 6.11. Decoloración del efluente textil con respecto al tiempo

En la Figura 6.12, se presentan las muestras del efluente textil al inicio y final del tratamiento enzimático. Como se puede observar la muestra al final del tratamiento aún presenta color. Sin embargo debido a la complejidad de este tipo de agua residual, el proceso enzimático puede ser empleado, requiriendo un postratamiento para la remoción de color y carga orgánica presente en el efluente.

En las pruebas mediante *HPLC*, se logró identificar al colorante al inicio y final del tratamiento con un tiempo de retención de 4.2 min. Sin embargo sólo se logró cuantificar 1 de las 2 aminas al final del tratamiento, obteniendo 1.2 mg/L de bencidina.



Figura 6.12. Muestras del efluente textil al inicio y final del tratamiento enzimático

Con respecto a los valores de DQO(mg/L), no se presentó algún cambio significativo. Esto pudiera deberse a que, mediante pruebas preliminares, la enzima en suspensión presentó un valor de DQO de 1200 mg/L. Considerando que la enzima es específica en la reacción, no se observó cambio alguno respecto de la oxidación de la materia orgánica. Sin embargo, se observó que empleando un proceso de filtración mediante filtros con tamaño de poro de 0.45 μm se obtiene un 30% de remoción.

6.2.3 Pruebas de toxicidad

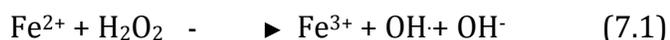
En la Tabla 6.4 se presentan los resultados obtenidos en la prueba de toxicidad utilizando *Vibrio fischeri*. La toxicidad al inicio y final del tratamiento no presentó diferencias significativas; sin embargo, se observa que la toxicidad en el efluente tratado es alta, esto puede ser debido a la presencia de auxiliares o productos químicos coadyuvantes para el teñido, los cuales no fueron oxidados en el tratamiento. La combinación de procesos empleando el proceso enzimático puede ser una alternativa para la decoloración de este tipo de efluentes.

Tabla 6.4. Valores obtenidos para la prueba de toxicidad aguda empleando *Vibrio fischeri* en el influente y efluente textil después del tratamiento

MUESTRA	Toxicidad (UT)
Agua residual textil	8.08
Agua residual textil tratada	7.94

7 POSTRATAMIENTO QUÍMICO

En este capítulo se estudia el pos-tratamiento del efluente obtenido tras la degradación enzimática del AD2. Está constituido por colorante residual, productos de su oxidación y extracto crudo enzimático. Se estudió, como alternativa de tratamiento, el proceso Fenton, clasificado como un proceso avanzado de oxidación (PAO). El proceso de Fenton ha resultado efectivo para degradar compuestos alifáticos y aromáticos clorados, PCBs, nitroaromáticos, colorantes azo, clorobenceno, fenoles (Parag y Aniruddha, 2004; Pignatello *et al.*, 2006; Prato y Buitron 2012). El proceso de oxidación de Fenton es un método de oxidación catalítico homogéneo que usa una mezcla de iones de Fe^{2+} y peróxido de hidrógeno en un medio ácido. La principal ventaja es la completa descomposición de los contaminantes en compuestos más simples logrando la decoloración de efluentes coloreados con bajos tiempos de reacción. El mecanismo que describe la reacción de Fenton principalmente incluye las siguientes reacciones (Neyens y Baeyens, 2003).



El ion ferroso inicia y cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno, resultando en la generación de radicales hidroxilo. Los radicales hidroxilo pueden rápidamente y no selectivamente reaccionar con un amplio rango de contaminantes orgánicos para mineralizarlos hasta CO_2 , H_2O y productos inorgánicos (Sun *et al.*, 2009). El ion ferroso es generado lentamente entre la formación del ion férrico y el peróxido de hidrógeno, como se indica en las siguientes reacciones:



El proceso de oxidación de Fenton tiene doble ventaja, la oxidación y la coagulación reduciendo contenido de color y, a su vez, la DQO de las aguas residuales (Kuo, 1992).

Las condiciones de operación en las que el proceso se lleva a cabo, así como la composición del agua residual, afectan sustancialmente a la eficacia y velocidad del proceso de oxidación.

El sistema de Fenton depende del pH del medio de reacción. La velocidad de reacción tiende a ser máxima en un pH cercano a 2.8 (Neyens y Baeyens, 2003; Pignatello *et al.*, 2006). El valor óptimo se encuentra entre 2.5 y 2.8, donde el Fe(III) existe en solución mayoritariamente como $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}(\text{H}_2\text{O})_5$. A valores de pH altos, la velocidad disminuye debido a la precipitación de hierro en forma $\text{Fe}(\text{OH})_2$. A valores de pH excesivamente bajos ($\text{pH} < 2.0$) y, a partir del Fe(II), se produce la formación de $\text{Fe}(\text{OOH})^{2+}$ que reacciona muy lentamente con el H_2O_2 obstaculizando la generación de $\bullet\text{OH}$.

La dosis de H_2O_2 influye fundamentalmente sobre la eficacia del proceso mientras que la concentración de hierro afecta la cinética (Pignatello *et al.*, 2006, Parag y Aniruddha, 2004, Neyens y Baeyens, 2003). Tanto la eficacia como la velocidad de reacción tienden a aumentar con la concentración de reactivos. Sin embargo, un exceso de hierro da lugar a una disminución de la eficacia debido a la activación de reacciones secundarias no deseadas, como es el caso de la formación de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ que puede precipitar. Por otro lado un exceso de peróxido daría lugar a la degradación del mismo por los radicales hidroxilos la cual es una reacción no deseada (Arslan *et al.*, 2009, Pignatello *et al.*, 2006). La reacción de oxidación de Fenton es endotérmica.

7.1 Metodología

7.1.1 Estrategia experimental

Las pruebas realizadas para determinar las mejores condiciones en las cuales se lograra la oxidación de los subproductos generados y la eliminación del color residual se realizaron empleando el programa STATGRAPHICS Centurion utilizando un diseño factorial 2^5 . En la Tabla 7.1 se presentan los factores analizados en esta parte experimental : FeSO_4 (mg/L), H_2O_2 (mg/L), agitación rápida, agitación lenta, sedimentación (min).

- ✓ Se realizaron 37 pruebas experimentales incluyendo 5 puntos centrales.
- ✓ Las pruebas fueron totalmente aleatorias.
- ✓ Utilizando como factor de respuesta el porcentaje (%) de decoloración y la remoción de materia orgánica medida como DQO.

Tabla 7.1. Diseño experimental para la determinación de las mejores condiciones de operación para el tratamiento tipo FENTON

FACTOR	BAJO	ALTO
FeSO₄ (mg/L)	16.2	63.8
H₂O₂ (mg/L)	32.4	127.6
Agitación rápida, 180 rpm	0.6	5.4
Agitación lenta, 5 rpm	9.3	80.7
Sedimentación (min)	30	80.7

Los estudios de decoloración se desarrollaron en una parrilla de agitación y calentamiento de nueve plazas (Dataplate Serie 730 PMC), utilizando matraces Erlenmeyer de 50 mL con un volumen de trabajo de 30 mL (Figura 7.1). La mezcla de la reacción se realizó utilizando un agitador magnético. El pH fue ajustado a 2.5 unidades antes de cada prueba utilizando una solución concentrada de H₂SO₄. El porcentaje de decoloración fue medido con base en los cambios de absorbancia a 576 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Perkin-Elmer UV-25 US) tal y como se describe en el Capítulo 3 de materiales y métodos. El seguimiento de la remoción de materia orgánica medida como DQO se realizó mediante el método 34534 de HACH utilizando un reactor DRB200 para su digestión y un colorímetro DR890 para su lectura. El cálculo para la determinación del porcentaje de remoción de materia orgánica se llevó a cabo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de decoloración: } \left[1 - \frac{c_t}{c_i} \right] \times 100 \quad (7.5)$$

donde c_i es la concentración de materia orgánica medida como DQO (mg/L) al inicio de la prueba y c_t es la concentración (mg/L) a un determinado tiempo de reacción.



Figura 7.1. Prueba de reactores completamente mezclados utilizados en el proceso de Fenton

7.2 Resultados y discusión

7.2.1 Mejores condiciones para eliminar color

En el gráfico de efectos especiales (Figura 7.2) se muestra el comportamiento de cada uno de los factores en sus niveles bajos y altos, observando que no se presentan diferencias significativas a excepción del tiempo de sedimentación, ya que las variaciones en cuanto al porcentaje de decoloración oscilan $\pm 5\%$. De esto se deduce que un aumento de la concentración de FeSO_4 y H_2O_2 no presenta efectos significativos para aumentar la decoloración de los efluentes.

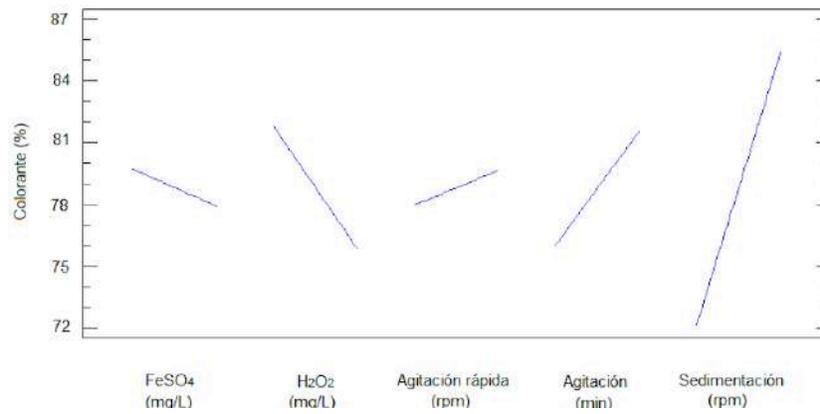


Figura 7.2 Gráfico de efectos principales del tratamiento tipo FENTON

En todo proceso tipo Fenton la relación estequiométrica $[\text{Fe(II)}]/[\text{H}_2\text{O}_2]$ debe considerarse, de acuerdo con las características del efluente a tratar, ya que de este se dependerá para encontrar la relación adecuada entre Fe(II) y agente oxidante obteniendo así las condiciones más favorables de operación desde el punto de vista técnico, económico y ambiental. Un aumento de la dosis de reactivo de Fenton conduce principalmente a dos problemas. La formación de especies de menor poder oxidante y el consumo de reactivos en procesos diferentes a la eliminación de la materia orgánica presente (Neyens y Baeyens, 2003), lo cual podría repercutir en el aumento innecesario de los costos del tratamiento.

En la Figura 7.3 se presentan los gráficos de respuesta del empleo de FeSO_4 , H_2O_2 y tiempo de sedimentación respecto del porcentaje de decoloración. Se puede observar cómo la concentración del reactivo de Fenton en sus niveles bajos y altos se mantienen constantes, obteniendo porcentajes de decoloración del 79.2%. Sin embargo, 44 min es el tiempo de sedimentación donde se logra obtener el mayor porcentaje de decoloración.

La relación $\text{FeSO}_4 - \text{H}_2\text{O}_2$ para estas condiciones es de 1 a 2.4. Esta relación suele ser baja comparada con las reportadas, considerando que la concentración del agua sintética es de

40 mg/L y que el proceso enzimático presentó un 73% de decoloración (sección 5.2.5). La concentración de alimentación al proceso de Fenton es de 10.8 mg/L. Aunado a ello, el peróxido empleado en el tratamiento enzimático puede tener un efecto residual sobre el agua tratada generando un efecto positivo sobre la oxidación del colorante por un tiempo prolongado (Wagner y Nicell, 2002).

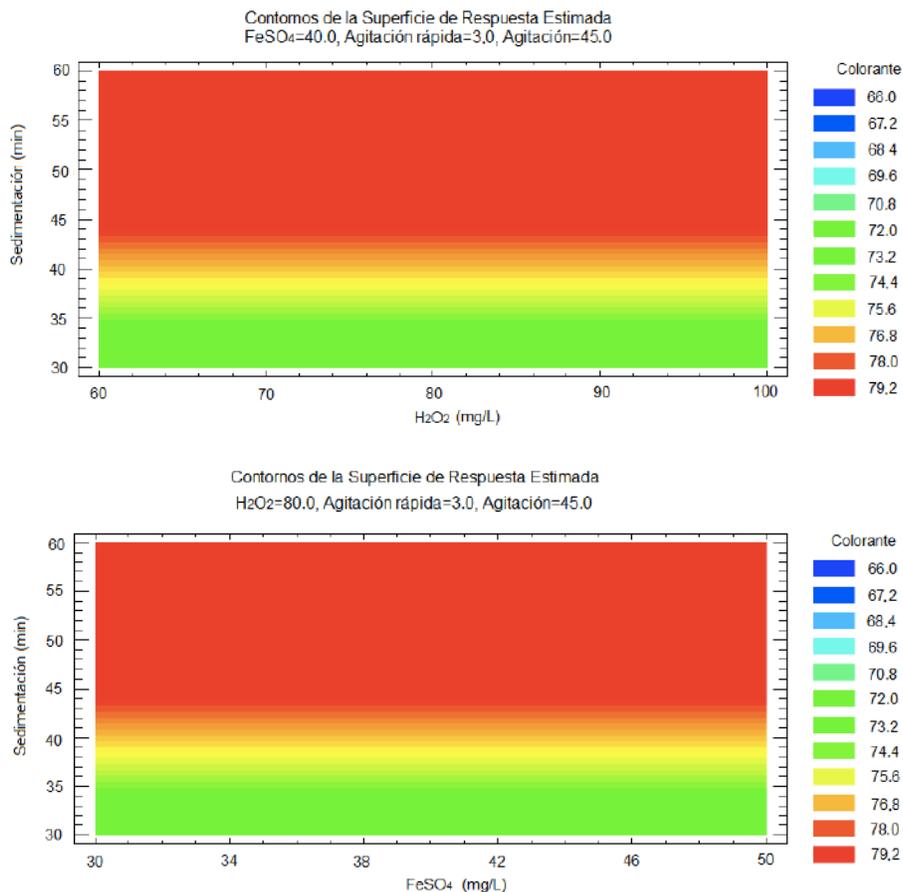


Figura 7.3 Gráfico de superficie de respuesta para la decoloración de los efluentes

En la Figura 7.4 se presentan los espectros al inicio y fin del tratamiento acoplado enzimático-Fenton, observando la eliminación por completo de la curva característica del colorante, esto debido a la ruptura del grupo cromóforo y la oxidación de los subproductos generados. En la Figura 7.5 se presentan las muestras al inicio y al final del tratamiento, observando la eliminación de color, siendo la tonalidad rosada la obtenida después del tratamiento enzimático.

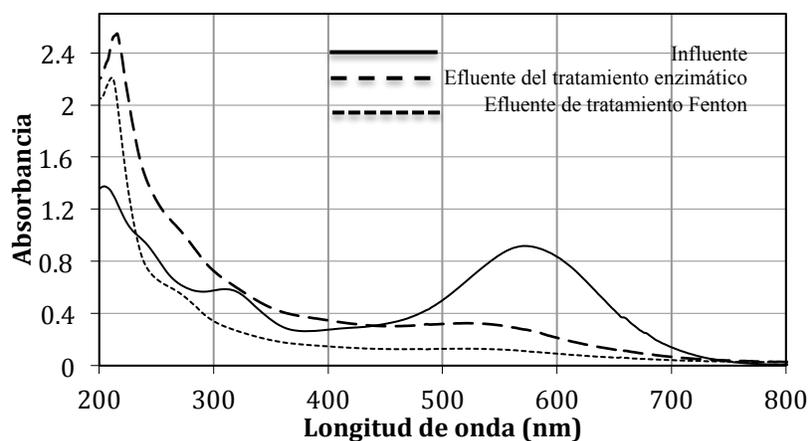


Figura 7.4 Espectro UV-Vis del tren de tratamiento enzimático-Fenton



Figura 7.5. Muestras del tren de tratamiento para la decoloración del AD2

En la Tabla 7.2, se presentan las mejores condiciones para lograr la eliminación de color por completo y la remoción del 30% de materia orgánica.

Tabla 7.2. Diseño experimental para la determinación de las mejores condiciones de operación para el tratamiento tipo FENTON

FACTOR	BAJO	ALTO	ÓPTIMO*
FeSO₄ (mg/L)	16.2	63.8	16.2
H₂O₂ (mg/L)	32.4	127.6	38.5
Agitación rápida, 200 rpm(min)	0.62	5.4	5.4
Agitación lenta, 20 rpm (min)	9.32	80.7	30
Sedimentación (min)	9.32	80.7	45

*A las condiciones estudiadas

Con respecto a la toxicidad, como anteriormente se mencionó, el colorante disuelto en agua no presenta toxicidad, sin embargo después del tratamiento enzimático la toxicidad aumenta a 3.91 unidades, debido a la presencia de 2 aminas producto de oxidación del colorante (bencidina y 4-aminobifenilo), las cuales posteriormente son oxidadas, en el proceso tipo Fenton, quedando así las muestras libres de color y toxicidad; sin embargo, la DQO fue una limitante del tren de tratamiento propuesto.

Tabla 7.3. Diseño experimental para la determinación de las mejores condiciones de operación para el tratamiento de tipo FENTON

MUESTRA	Toxicidad (UT)
Agua sintética	No tóxico
Efluente tratamiento enzimático	3.91
Efluente tratamiento químico	No tóxico

8 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

8.1 Conclusiones

De acuerdo con la hipótesis propuesta y el objetivo establecido a continuación se presentan las conclusiones alcanzadas:

- Las mejores condiciones de operación para la decoloración enzimática del colorante AD2 fueron las siguientes: temperatura 40°C, pH 5.5, tiempo de contacto 4 h, y concentración de AD2 40 mg/L, logrando un 72% de decoloración. La velocidad máxima de oxidación fue de 2.37 mg/L-h.
- La aplicación de la metodología determinada en condiciones de laboratorio para la decoloración del colorante AD2 se llevó a cabo exitosamente para el tratamiento de un efluente textil a nivel piloto observando que el extracto enzimático pudo decolorar el AD2 en presencia de aditivos químicos logrando velocidades de degradación de 1.48 mg/L-h, corroborando el objetivo establecido.
- Se identificaron mediante pruebas de *HPLC* dos aminas aromáticas después del tratamiento del agua sintética, como productos de la oxidación del colorante: bencidina (8 mg/L) y 4-aminobifenilo (1 mg/L). En el tratamiento del efluente textil sólo se logró cuantificar la bencidina (1 mg/L).
- Las pruebas de toxicidad con *Vibrio fischeri* mostraron que después del tratamiento enzimático la toxicidad incrementa a 4 UT. Esto se atribuye a los productos resultantes

de la degradación del colorante (bencidina y 4-aminobifenilo). En el efluente textil no se presentaron cambios significativos obteniendo 8 UT para el agua residual textil y 7.94 UT al final del tratamiento enzimático.

- Se empleó el proceso de Fenton como tratamiento de pulimento, mediante el cual fue posible decolorar el colorante residual del tratamiento enzimático, obteniendo porcentajes de decoloración del 90% y una remoción del 30% de materia orgánica así como la completa eliminación de la toxicidad empleando una relación 1-2.4 de FeSO_4 - H_2O_2 .
- A partir de los resultados obtenidos se confirma la hipótesis de que el proceso enzimático y, en particular, el uso de las peroxidasas obtenidas a partir de un residuo industrial del procesamiento del frijol de soya puede ser útil como un pretratamiento para la decoloración de efluentes con presencia de colorante del tipo azo.

8.2 Recomendaciones

De esta investigación pueden derivarse varias líneas de investigación que deben continuarse. Estas son:

- Evaluación del método de precipitación con sulfato de amonio para la obtención de enzimas con alta actividad peroxidasa a partir de un residuo industrial de soya.
- Determinar la ruta metabólica de la degradación enzimática del colorante AD2 .
- Estudiar el comportamiento de un sistema acoplado enzimático-biológico para la degradación de colorantes azo y la disminución de toxicidad en el efluente.
- Implementación de las mejores condiciones de operación obtenidas para la decoloración del AD2 en el tratamiento de otros colorantes diazo.

ARTÍCULOS PUBLICADOS

- Miranda-Mandujano, Erika Viviana, Moeller-Chávez, Gabriela E, Buitrón Germán y Garzón-Zúñiga, Marco A. (2017). Obtención de peroxidasas a partir de un residuo industrial de soya para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*. **4(12)**: pp 12-21.
- E. Miranda-Mandujano, G. Moeller-Chávez, O. Villegas-Rosas, Germán Buitrón, M. A. Garzón-Zuñiga (2017). Decolorization of Direct Blue 2 by peroxidases obtained from an industrial soybean waste. *Water SA*. **ACEPTADO**

TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS

- **“Decoloracion de un efluente textil empleando peroxidasas obtenidas de un residuo industrial de soya”**

4th IWA Mexico Young Water Profesional Conference 2015. Del 27 al 29 de abril del 2015. Guanajuato México.

- **“Decoloración del AD2 por peroxidasas obtenidas de un residuo industrial de soya”**

III Congreso Internacional de Ingeniería Química, Biotecnología y Alimentaria. Del 24 al 28 de noviembre del 2014. La Habana Cuba.

- **“Decoloración de un agua residual procedente de la industria textil mediante procesos enzimáticos”**

XXXIV Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental “Aspirando a un medio ambiente sostenible”. Del 2 al 6 de noviembre del 2014, Monterrey, Nuevo León.

- **“Tratamiento de un colorante azo empleado en la Industria textil productora de mezcilla utilizando a la peroxidasa de soya”**

XXXIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental AIDIS. Del 3 al 7 de junio del 2012 Bahía, Brasil.

- **“Evaluación de la capacidad de adsorción de un residuo industrial para la remoción de un colorante diazo utilizado en la industria textil”**

XXXIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental AIDIS. Del 3 al 7 de junio del 2012 Bahía, Brasil.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

- AGOSTINI, E., HERNANDEZ, R.J., ARNAO, M.B., MILRAND, S.R., TIGIER, H.A., ACOSTA, M. (2002). A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus*) hairy-root culture inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. **35**: 1-7.
- AHMAD, R., MONDAL, K., USMANI, A. (2010). Hybrid UASFB-aerobic bioreactor for degradation of acid yellow-36 in wastewater. *Bioresource Technology*. **101**: 3787-3790.
- AITKEN, M.D. (1993). Waste treatment applications of enzymes: Opportunities and obstacles. *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal*. **52**: B49-B58.
- AITKEN, M.D., IRVINE, R.L. (1989). Stability testing of ligninase and Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology and Bioengineering*. **34**: 1251-1260.
- AITKEN, M.D., MASSEY, I.J., CHEN, T.P., HECK, P. (1994). Characterization of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants. *Water Research*. **28**: 1879-1889.
- AKHTAR, S., KHAN, A.A., HUSAIN, Q. (2005a). Partially purified bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase catalyzed decolorization of textile and other industrially important dyes. *Bioresource Technology*. **96**: 1804-1811.
- AKHTAR, S., KHAN, A.A., HUSAIN, Q. (2005b). Potential of immobilized bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidases in the decolorization and removal of textile dyes from polluted wastewater and dyeing effluent. *Chemosphere*. **60**: 291-301.
- ALEBOYEH, A., OLYA, M., ALEBOYEH, H. (2009). Oxidative treatment of azo dyes in aqueous solution by potassium permanganate. *Journal of Hazardous Materials*. **162**: 1530-1535.
- ALLEGRE, C., MAISSEU, M., CHARBIT, F., MOULIN, P. (2004). Coagulation-flocculation-decantation of dye house effluents: concentrated effluents. *Journal of Hazardous Materials*. **B116**, 57-64.
- AMJAD, A.K. QAYYUM, H. (2007). Decolorization and removal of textile and non-textile dyes from polluted wastewater and dyeing effluent by using potato (*Solanum tuberosum*) soluble and immobilized polyphenol oxidase. *Bioresource Technology*. **98**: 1012-1019.
- ANOUZLA, A., ABROUKI, Y., SOUABI, S., SAFI, M., RHBAL, H. (2009). Colour and COD removal of disperse dye solution by a novel coagulant: application of statistical design for the optimization and regression analysis. *Journal of Hazardous Materials*. **166** (2-3): 1302-1306.

- ARS-ALATON, I., HANCI, T., TURELI, G. (2009). H₂O/UV-C treatment of the commercially important aryl sulfonates H-, K-, J-acid and Para base: Assessment of photodegradation kinetics and products. *Chemosphere*. **76**: 587-594.
- ARSLAN, I., TURELI, G., OLMEZ, T. (2009). Treatment of azo dye production wastewaters using Photo-Fenton like advanced oxidation processes. Optimization by response surface methodology. *Journal of Photochemistry and Photobiology. A: Chemistry*. **202**: 142-153.
- ARUNA, N. LALI, A. (2001). Purification of a plant peroxidase using reversibly soluble ion-exchange polymer. *Process Biochemistry*. **37**: 431-437.

B

- BABOROVA, P., MODER, M., BALDRIAN, P., CAJTHAMLOVA, K., 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*. **157**: 248-253.
- BAFANA, A., DEVI, S.S., KRISHNAMURTHI, K., CHAKRABARTI, T. (2007). Kinetics of decolourisation and biotransformation of direct black 38 by *C. hominis* and *P. stutzeri*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **74(5)**: 1145-1152.
- BARRAGAN, B.E., COSTA, C., CARMEN-MARQUEZ, M. (2007). Biodegradation of azo dyes by bacteria inoculated on solid media. *Dyes Pigments*. **75**: 73-81.
- BASHEER, S., KUT, O.M., PRENOSIL, J.E., BOURNE, J.I. (1992). Kinetics of enzymatic degradation of cyanide. *Biotechnology and Bioengineering*. **39**: 629-634.
- BERGLUND, G.I., CARLSSON, G.H., SMITH, A.T., SZÖKE, H., HENRIKSEN, A., HAJDU, J. (2002). The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature*. **417**: 463-468.
- BHUNIA, A., DURANI, S., WANGIKAR, P.P. (2002). Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. *Biotechnology and Bioengineering*. **72**: 562-567.
- BILES, C.L., MARTYN, R.D. (1993). Peroxidase, polyphenol oxidase and shikimate dehydrogenase isozymes in relation to the tissue type, maturity and pathogen induction of watermelon seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*. **31**: 499-506.
- BISWAS, K. (1999). Removal of cresols from synthetic wastewater using crude soybean peroxidase. Tesis Doctorado. Universidad de Windsor. Ontario. Canada.
- BÓDALO, A., GÓMEZ, J. L., GÓMEZ, E., BASTIDA, J., LEÓN, G., MÁXIMO, M. F., HIDALGO, A. M., MONTIEL, M. C. (1999). Kinetic calculations in the enzymatic resolution of DL amino acids. *Enzyme and Microbial Technology*. **24**: 381-387.
- BOER, C.G., OBICI, L., DE SOUZA, C.G., PERALTA, R.M. (2004). Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus)* edodes producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. *Bioresource Technology*. **94**: 107-112.

- BOSCOLO, B., LAURENTI, E., GHIBAUDI, E. (2006). ESR spectroscopy investigation of the denaturation process of soybean peroxidase induced by guanidine hydrochloride, DMSO or heat. *Protein Journal*. **25**: 379-390.
- BOUCHERIT, N., ABOUSEOUD, M., ADOUR L. (2013). Degradation of direct azo dye by *Cucurbita pepo* free and immobilized peroxidase. *Journal of Environmental Sciences*. **25(6)**: 1235-1244.
- BOUYAKOUB, A.Z., KACHA, S., LARTIGES, B.S., BELLEBIA, S., DERRICHE, Z. (2009). Treatment of reactive dye solutions by physicochemical combined process. *Desalination and Water Treatment*. **12(1-3)**: 202-209.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**: 248-254.
- BROMLEY-CHALLENGER, K.C.A., KNAPP, J.S., ZHANG, Z., GRAY, N.C.C., HETHERIDGE, M.J., EVANS, M.R. (2000). Decolorization of an azo dye by unacclimated activated sludge under anaerobic conditions. *Water Resources*. **34**: 4410-4418.
- BROWN, D., LABOUREUR, P. (1983a). The aerobic biodegradability of primary aromatic amines. *Chemosphere*. **12(3)**: 405-414.
- BROWN, D., LABOUREUR, P. (1983b). The degradation of dyestuffs: part I. Primary biodegradation under anaerobic conditions. *Chemosphere*. **12(3)**: 397-404.
- BUITRÓN, G., MELGOZA, R.M., JIMÉNEZ, L. (2003). Pharmaceutical wastewater treatment using an anaerobic/aerobic sequencing batch biofilter. *Journal of Environmental Science and Health. Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*. **38(10)**: 2077-2088.
- BUITRÓN G, QUEZADA M, MORENO J. (2004). Aerobic degradation of the azo dye acid red 151 in a sequencing batch biofilter. *Bioresource Technology*. **92**: 143-149.

C

- CALDERÓN, A.I.A., ROMERO, G. (2003). Degradación de colorantes textiles utilizando a la peroxidasa de chayote. Tesis de doctorado. Benemérita Universidad de Puebla, Puebla, México.
- CAMPA, A. (1991). Biological roles of plant peroxidases: known and potential function. In: *Peroxidases iii Chemistry and Biology*. (Eds.: Everse, J., Everse, K.E. y Grisham, M.B.), CRC Press, Boca Raton, pp. 25-50.
- CAMPOS, R., KANDEKBAEUR, A., ROBRA, K., CAVACO, P., GÜBITZ, G. (2001). Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. *Journal Biotechnology*. **89**: 131-139.
- CHATTERJEE, D., PATNAM, V., SIKDAR, A., MOULIK, S.K. (2010). Removal of some common textile dyes from aqueous solution using fly ash. *Journal of Chemical & Engineering Data*. **55**: 5653-5657.
- CHEN, K.C., WU, J.Y., LIOU, D.J., HWANG, S.C.J. (2003). Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. *Journal Biotechnology*. **101**: 57-68.

- CHEN, M., CHEN, Y., DIAO, G. (2010). Adsorption kinetics and thermodynamics of methylene blue onto p-tert-Butyl-calix[4,6,8]- arene-bonded silica gel. *Journal of Chemical & Engineering Data*. **55**: 5109–5116.
- CHENG, M.M., MA, W.H., LI, J., HUANG, Y.P., ZHAO, J.C. (2004). Visible-light-assisted degradation of dye pollutants over Fe(III)-loaded resin in the presence of H₂O₂ at neutral pH values. *Environmental Science Technology*. **38**: 1569–1575.
- CHEREMISINOFF, N.P. (2002). Handbook of Water and Wastewater Treatment Technologies. Butterworth-Heinemann, Boston.
- CHIVUKULA, M., RENGANATHAN, V. (1995). Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. *Applied Environmental Microbiology*. **61**: 4374–4377.
- CHOO, K.H., CHOI, S.J., HWANG, E.D. (2007). Effect of coagulant types on textile wastewater reclamation in a combined coagulation/ultrafiltration system. *Desalination*. **202**: 262-270.
- CHRISTIE, R. M. (2003). La química del color. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- CHRISTIAN, V., SHRIVASTAVA, R., SHUKLA, D., MODI, H.A., VYAS, B.R. (2005). Degradation of xenobiotic compounds by lignin-degrading white-rot fungi: Enzymology and mechanisms involved. *Indian Journal of Experimental Biology*. **43**: 301–312.
- CHUNG, K., FULK, G., EGAN, M. (1978). Reduction of azo dyes by intestinal anaerobes. *Applied Environmental Microbiology*. **35**: 558-562.
- CIABATTI, I., TOGNOTTI, F., LOMBARDI, L., (2010). Treatment and reuse of dyeing effluents by potassium ferrate. *Desalination*. **250**: 222-228.
- CLAUS, H., FABER, G., KONIG, H. (2002). Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Applied Microbiology Biotechnology*. **59**: 672–678.
- COBOS, Y.L. (2013). Filtración biológica de aguas residuales conteniendo colorantes azo. TESIS DOCTORADO. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- CRUZ, A., BUITRÓN, G., ILANGO VAN, K. (1996). Desarrollo de tecnología para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil. En X Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Febrero. Toluca, México.
- CRUZ, A., BUITRÓN, G. (2000). Biotransformation of disperse blue 79 using sequenced anaerobic/aerobic biofilters. *Water Science and Technology*. **42**: 317-320.

D

- DAIYASU, H., TOH, H. (2000). Molecular evolution of the myeloperoxidase family. *Journal of Molecular Evolution*. **51**: 433-445.

- DALLAGO, R.M., SMANIOTTO, A., OLIVEIRA, L.C.A. (2005). Solid waste from tanneries as adsorbent for the removal of dyes in aqueous medium. *Química Nova*. **28**: 433–437.
- DALTON, D.A. (1991). Ascorbate peroxidase. In: Peroxidases in Chemistry and Biology.(Eds.: Everse, J., Everse, K.E. y Grisham, M.B.), CRC Press, Boca Raton, pp. 139-153.
- DAVIES, L.P., Novais, J., Martins-dias, S. (2006). Aerobic Degradation of Acid Orange 7 in a Vertical-Flow Constructed Wetland. *Water Research*, **40**: 2055-2063.
- DELEE, W., O'NEILL, C., HAWKES, F.R., PINHEIRO, H.M. (1998). Anaerobic treatment of textile effluents: a review. *Journal Chemical Technology Biotechnology*. **73**: 323–335.
- DE SOUZA, S.M., DE ARRUDA, G.U., SANTOS, B.K.A., DE SOUZA, A.A.U. (2010). Removal of COD and color from hydrolyzed textile azo dye by combined ozonation and biological treatment. *Journal of Hazardous Materials*. **179**: 35–42.
- DE SOUZA, S.M., FORGIARINI, E., DE SOUZA, A.A.U. (2007). Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *Journal of Hazardous Materials*. **147**: 1073–1078.
- DOF. (2009). Norma Oficial Mexicana. Modificación del inciso O, el encabezado dela Tabla 13, el ultimo párrafo de Anexo B y el apartado signo decimal de la tabla 21 de la Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002. Diario Oficial de la Federación. Poder Ejecutivo Federal. México D.F México.
- DOGAN, D., TURKDEMIR, H., (2005). Electrochemical oxidation of textile dye indigo. *Journal Chemical Technology Biotechnology*. **80**: 916–923.
- DÖNBAK, L., RENCUZOGULLARI, E., TOPAKTAS, M. SAHIN, G. (2006). A biomonitoring study on the workers from textile dyeing plants. *Genetika*. **42**: 613–618.
- DOS SANTOS, A.B., CERVANTES, F.J., VAN LIER, J.B. (2007). Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource Technology*. **98**: 2369–2385.
- DUARTE-VÁZQUEZ, M.A., WHITAKER, J.R., ROJO-DOMÍNGUEZ, A., GARCÍA-ALMENDÁREZ, B.E., REGALADO, C. (2003). Isolation and thermal characterization of an acidic isoperoxidase from turnip roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **5**(117):5096-5102.
- DUNFORD, H.B., JONES, P.A. (2010). Peroxidases and catalases: Biochemistry, biophysics, biotechnology and physiology. 2nd Edition, John Wiley and Sons Inc. New York, EE.UU.
- DURAN, N., ESPOSITO, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: A review. *Applied Catalysis. B: Environmental*. **28**: 83–99.
- DURAN, N., ROSA, M.A., D' ANNIBALE, A., GIANFREDA, L. (2002). Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: A review. *Enzyme Microbiology Technology*. **31**: 907–931.

E

- EIBES, G., LU-CHAU, T., FEIJOO, G., MOREIRA, M.T., LEMA, J.M. (2005). Complete degradation of anthracene by manganese peroxidase in organic solvent mixtures. *Enzyme Microbiology Technology*. **37**: 365–372.
- EKICI, P., LEUPOLD., PARLAR, H. (2001). Degradability of selected dye metabolites in activated sludge systems. *Chemosphere*. **44**:721-728.
- ELMORSI, T., RIYAD, Y., MOHAMED, Z., EL BARY, H. (2010). Decoloration of Mordant red 73 azo dye in water using H₂O₂/UV and photo-Fenton treatment. *Journal Hazardous Materials*. **173**: 352-358.
- EPA. (1996). Best management practices for pollution prevention in the textile industry. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, EE.UU.

F

- FAOUZI, A.M., NASR, B., ABDELLATIF, G. (2007). Electrochemical degradation of anthraquinone dye Alizarin Red S by anodic oxidation on boron-doped diamond. *Dyes Pigments*. **73**: 86–89.
- FEIJOO, C.G., LEMA, R.J.M., MOREIRA, V.M. (2003). Procedimiento de degradación de compuestos orgánicos presentes en efluentes industriales mediante reactores enzimáticos y su aplicación en la decoloración de tintes industriales. Universidad de Santiago de Compostela. Solicitud de patente. La Coruña, España.
- FORGACS, E., CSERHATI, T., OROS, G. (2004). Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environment International*. **30**(7): 953–971.
- FRIJTERS, C.T.M.J., VOS, R.H., SCHEFFER, G., MULDER, R. (2006). Decolorizing and detoxifying textile wastewater, containing both soluble and insoluble dyes, in a full scale combined anaerobic/aerobic system. *Water Resources*. **40**: 1249–1257.
- FURTMULLER, P.G., ZEDERBAUER, M., JANTSCHKO, W., HELM, J.B.M., JAKOPITSCH, C., OBINGER, C. (2006). Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **445**: 199-213.

G

- GAO, B.Y., YUE, Q.Y., WANG, Y., ZHOU, W.Z. (2007). Color removal from dye-containing wastewater by magnesium chloride. *Journal of Environmental Management*. **82**: 167-172.
- GARZÓN-ZÚÑIGA, M.A., SANDOVAL-VILLASANA, A.M., MOELLER-CHÁVEZ, G.E. (2011). Decolorization of the AO24 azo dye and reduction of toxicity and genotoxicity in trickling biofilters. *Water Environmental Resources* **83**(2):107-15.

- GEETHAKARTHI, A., PHANIKUMAR, B.R. (2011). Industrial sludge based adsorbents/ industrial byproducts in the removal of reactive dyes, a review. *International Journal of Water Resources and Environmental*. **3**: 1–9.
- GENG, Z., RAO, K.J., BASSI, A.S., GIJZEN, M., KRISHNAMOORTHY, N. (2001). Investigation of biocatalytic properties of soybean seed hull peroxidase. *Catalysis Today*. **64**: 233–238.
- GEORGIU, D., AIVAZIDIS, A., HATIRAS, J., GIMOUHOPOULOS, K. (2003). Treatment of cotton textile wastewater using lime and ferrous sulfate. *Water Research*. **37**: 2248-2250.
- GHAEMMAGHAMI, F., ALEMZADEH, I., MOTAMED, S. (2010). Seed coat soybean peroxidase: Extraction and biocatalytic properties determination. *Iranian Journal of Chemical Engineering*. **7**(2): 28–38.
- GHOLAMI, B.F., MOHAMMAD, A.F., NEJATZADEH, B.F., HOSSEIN, M.A. (2013). Oxidative degradation and detoxification of textile azo dye by horseradish peroxidase enzyme. *Fresenius Environmental Bulletin*. **22**(3): 739–744.
- GHOROPADE, A. J., SPENCER, H. T. (1993). Azo dyes metabolism by *Pseudomonas putida*. 48th Purdue Ind. Conf. Proc., Lewis Pub: 699-714. Chelsea, Michigan, EE.UU.
- GILLIKIN, J.W., GRAHAM, J.S. (1991). Purification and developmental analysis of the major anionic peroxidase from the seed coat of *Glycine max*. *Plant Physiology*. **96**: 214–220.
- GOLKA, K., KOPPS, S., MYSLAK, Z.W. (2004). Carcinogenicity of azo colorants: Influence of solubility and bioavailability—A review. *Toxicology Letters*. **151**: 203-210.
- GOLOB, V., VINDER, A., SIMONIC, M. (2005). Efficiency of coagulation/flocculation method for treatment of dye bath effluents. *Dyes and Pigments*. **67**: 93-97.
- GOMES, A., GONCALVES, I., DE PINHO, M., (2005). The role of adsorption on nanofiltration of azo dyes. *Journal of Membrane Science*. **255**: 157-165.
- GONCALVES, I., LOPES, L., PINHEIRO, M., FERRA, I. (2009). Behavior of different anaerobic populations on the biodegradation of textile chemicals. *Journal Hazardous Material*. **172**: 1236-1243.
- GOODIN, D.B., MEREE, D.E. (1993). The Asp-His-Fe triad of cytochrome c peroxidase controls the reduction potential, electronic structure, and coupling of the tryptophan free radical to the heme. *Biochemistry*. **32**(13): 3313-3324.
- GUARATINI, C. C. I., ZANONI, M. V. B. (2000). Textile dyes. *Química Nova*. **23**(1): 71-78.
- GUDELJ, M., FRUHWIRTH, G.O., PAAR, A., LOTTSPREICH, F., ROBRA, K.H., CAVACO- PAULO, A., GUEBITZ, G.M. (2002). A catalase-peroxidase from a newly isolated thermoalkaliphilic *Bacillus sp.* with potential for the treatment of textile bleaching effluents. *Extremophiles*. **5**: 423–429.
- GUERRERO, A. (1998). Soja. En: Cultivos herbáceos extensivos. A. Guerrero (ed). Mundi-Prensa, Madrid, España, pp. 755-855.

- GUILLARD, C., DISDIER, J., MONNET, C., DUSSAUD, J., MALATO, S., BLANCO, J. (2003). Solar efficiency of a new deposited titanium photocatalyst: chlorophenol, pesticide and dye removal applications. *Applied Catalysis B: Environmental*. **46**: 319–332.
- GULNAZ, O., KAYA, A., DINCER, S. (2006). The reuse of dried activated sludge for adsorption of reactive dye. *Journal Hazardous Materials*. **B134**: 190-196.
- GÜNGÖR, I. (2008). The effect of heavy metals on peroxidase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *African Journal of Biotechnology*. **7(13)**: 2248-2253.
- GUPTA, V.K., SUHAS, S. (2009). Application of low-cost adsorbents for dye removal. A review. *Journal of Environmental Management*. **90**: 2313-2342.
- GUTIÉRREZ, M.C., CRESPI, M. (1999). Colorantes reactivos en los efluentes textiles: nuevos tratamientos para su eliminación. *Tecnología del Agua*. **195**: 42-49.
- GUTOWSKA, A., KALUZNA, C.J., JOZWIAK, W.K. (2007). Degradation mechanism of Reactive Orange 113 dye by H₂O₂/Fe²⁺ and ozone in aqueous solution. *Dyes Pigments*. **74**: 41–46.

H

- HAI, F.I., YAMAMOTO, K., FUKUSHI, K. (2007). Hybrid treatment systems for dye wastewater. *Critical Review Environmental Science Technology*. **37**: 315-377.
- HAMID, M., UR-REHMAN, K. (2009). Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry*. **115**: 1177–1186.
- HAO, O., KIM, H., CHANG, P. (2000). Decolorization of wastewater. *Criticals Reviews in Environmental Science Technology*. **30**: 449-505.
- HAUG, W., HEMPEL, D., STOLZ, A., KNACKMUSS, H. (1991). Mineralization of the sulfonated azo dye mordant yellow 3 by a 6-aminonaphthalene-2-sulfonate degrading bacterial consortium. *Applied Environmental Microbiology*. **57**: 3144-3149.
- HENRIKSEN, A., MIRZA, O., INDIANI, C., TEILUM, K., SMULEVICH, G., WELINDER, K.G., GAJHEDE, M. (2001). Structure of soybean seed coat peroxidase: A plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions. *Protein Science*. **10(1)** :108–115.
- HERBST, W., HUNGER, K. (1997). Industrial organic pigments: Production, properties, applications. John Wiley & Sons, Inc., 2a edition, New York, EE.UU.
- HESSEL, C., ALLEGRE, C., MAISSEU, M., CHARBIT, F., MOULIN, P. (2007). Guidelines and legislation for dye house effluents. *Journal Environmental Management*. **83**: 171-180.
- HIMMELHOCH, S.R. (1971). Chromatography of proteins on ion-exchange adsorbents. *Methods Enzymology*. **22**: 273-286.

- HIRAGA, S., K. SASAKI, K., ITO, H. OHASHI, Y., MATSUI, H. (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology*. **42**:462-468.
- HUNGER, K. (2003). Industrial dyes: Chemistry, properties, applications. Wiley-VCH, Weinheim. Alemania.
- HUSSAIN, Q. (2009). Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review. *Review Environmental Science and Biotechnology*. **9**: 117-140.
- HUSAIN, Q. (2006). Potential applications of the oxidoreductive enzymes in the decoloration and detoxification of textile and other synthetic dyes from polluted water. *Critical Reviews in Biotechnology*. **26**: 201-221.

I

- INEGI. (2011). La industria textil y del vestido en México; Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, México.
- IPPC. (2003). Reference document on best available techniques for the textile industry. Integrated Pollution Prevention and Control. European Commission.
- IŞIK, M., SPONZA, D.T. (2007). Fate and toxicity of azo dye metabolites under batch long-term anaerobic incubations. *Enzyme Microbiology Technology*. **40**(4): 934-939.

J

- JIAN, H., BISHOP, P.L. (1994). Aerobic biodegradation of azo dyes in biofilms. *Water Science Technology*. **29**(10-11): 525-530.
- JIMÉNEZ, S. (2007). Descripción de los alimentos a base de soya. Boletín bimestral publicado por el Comité Nacional Sistema Producto Oleaginosas. México D.F.
- JOUILIA, H., BOUAZIZIA, H., ROSSIGNOL, M., BORDERIES, G., JAMET, E., EL FERJANI, E. (2008). Partial purification and characterization of a copper-induced anionic peroxidase of sunflower roots. *Plant Physiology and Biochemistry*. **46**(8-9): 760-767.

K

- KALME, S.D., PARSHETTI, G.K., JADHAV, S.U., GOVINDWAR, S.P. (2007). Biodegradation of benzidine based dye Direct Blue 6 by *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112. *Bioresource Technology*. **98**: 1405-1410.
- KALSOOM, U., SALMAN, A.S., MEETANI, M.A., RAUF, M.A., NAWAZ, B.H. (2013). Mechanistic study of a diazo dye degradation by soybean peroxidase. *Chemistry Central Journal*. **7**: 1-10.

- KAMAL, J.K.A., BEHERE, D.V. (2002). Thermal and conformational stability of seed coat soybean peroxidase. *Biochemistry*. **41**: 9034–9042.
- KAMAL, J.K.A., BEHERE, D.V. (2003). Activity, stability and conformational flexibility of seed coat soybean peroxidase. *Journal Inorganic Biochemistry*. **94**: 236-242.
- KAMBOH, A.M., ASIF, A.B., IMAM, B.S., SHERAZI, S.T.H. (2013). Adsorption of direct black-38 azo dye on p-tert-butylcalix[6]arene immobilized material. *Arabian Journal of Chemistry*. **7**: 125–131.
- KAMBOH, A.M., SOLANGI, I.B., SHERAZI, S.T.H., MEMON, S. (2011a). A highly efficient calix[4]arene based resin for the removal of azodyes. *Desalination*. **268**: 83–89.
- KAMBOH, A.M., SOLANGI, I.B., SHERAZI, S.T.H., MEMON, S. (2011b). Sorption of Congo red onto p-tert-butylcalix[4]arene based silica resin. *Iranian Journal of Chemical Engineering*. **8**: 272–279.
- KANG, Q., GAO, B., YUE, Q., ZHOU, W., SHEN, D. (2007). Residual color profiles of reactive dyes mixture during a chemical flocculation process. *Colloids and Surfaces. A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **299**: 45-53.
- KANG, S., LIAO, C., CHEN, M. (2002). Pre-oxidation and coagulation wastewater by the Fenton process. *Chemosphere*. **46**: 923–928.
- KARIM, Z., ADNAN, R., HUSAIN, Q. (2012). A β -cyclodextrinechitosan complex as the immobilization matrix for horseradish peroxidase and its application for the removal of azo dyes from textile effluent. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **72**: 10-17.
- KASAI, N., MURATA, A., HIROSHI, I., SAKAMOTO, T., ISRA, K.R. (2004). Enzymatic high digestion of soybean milk residue (Okara). *Journal Agricultural and Food Chemistry*. **52**: 5709-5716.
- KAUSHIK, P., MALIK, A. (2009). Fungal dye decolorization: Recent advances and future potential. *Environmental International*. **35**: 127-141.
- KENNEDY, K., ALEMANY, K., WARITH, M. (2002). Optimization of soybean peroxidase treatment of 2,4-dichlorephenol. *Water Research*. **28**: 149–158.
- KHALID, A., ARSHAD, M., CROWLEY, D. (2008). Accelerated decolorization of structurally different azo dyes by newly isolated bacterial strains. *Applied Microbiology Biotechnology*. **78**: 361-369.
- KHARE, S, K., JHA, K., GANDHI, A. P. (1995). Citric acid production from okara (soy-residue) by solid-state fermentation. *Bioresource Technology*. **54**: 323-325.
- KHEHRA, M., SINGH, H., KUMAR, D., SINGH, B., SINGH, S. (2005). Decolorization of various azo dyes by bacterial consortium. *Dyes Pigment*. **67(1)**: 55-61.
- KIM, G.Y., LEE, K. B., CHO, S. H., SHIM, J., MOON, S.H. (2005). Electroenzymatic degradation of azo dye using an immobilized peroxidase enzyme. *Journal of Hazardous Materials*. **126(1-3)**: 183–188.
- KIM, S.J., SHODA, M. (1999). Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec I involved in decolorization of dyes. *Applied Environmental Microbiology*. **65**: 1029–1035.

- KUDLICH, M., HETHERIDGE, M., KNACKMUSSS, H., STOLZ, A. (1996). Autoxidation reactions of different aromatic ortho-aminohydroxynaphthalenes which are formed during the anaerobic reduction of sulfonated azo dyes. *Environmental Science and Technology*. **33**: 896-901.
- KULSHRESTHA, Y., HUSAIN, Q. (2007). Decolorization and degradation of acid dyes mediated by partially purified turnip (*Brassica rapa*) peroxidases. *Toxicology Environmental Chemistry*. **89**(2): 255-267.
- KUMAR, P., PRASAD, B., MISHRA, I.M., CHAND, S. (2007). Catalytic thermal treatment of desizing wastewaters. *Journal Hazardous Materials*. **149**: 26-34.
- KUO, G. W. (1992). Decolorizing dye wastewater with Fenton's reagent. *Water Research*. **26**(7): 881-886.
- KUSIC, H., KOPRIVANAC, N., HORVAT, S., BAKIJA, S., BOZIC, A. (2009). Modeling dye degradation kinetic using dark- and photo-Fenton type processes. *Chemical Engineering Journal*. **155**: 144-154.
- KWON, J.H., LEE, H.K., KWON, J., KIM, K., PARK, E., KANG, M.H., KIM, Y.H. (2008). Mutagenic activity of river water from a river near textile industrial complex in Korea. *Environmental Monitoring and Assessment*. **142**: 289-296.

L

- LEE, J.W., CHOI, S.P., THIRUVENKATACHARI, R., SHIM, W.G., MOON, H. (2006). Evaluation of the performance of adsorption and coagulation processes for the maximum removal of reactive dyes. *Dyes Pigments*. **69**: 196-203
- LEIST, K.H. (1982). Subacute toxicity studies of selected organic colorants. *Ecotoxicol Environmental*. **6**(5): 45-63.
- LI, J., BISHOP, P. (2004). Adsorption and biodegradation of azo dye in biofilm processes. *Water Science and Technology*. **49**: 237-245.
- LI, Y., GAOA, B., WUB, T., WANGA, B., LI, X. (2009). Adsorption properties of aluminum magnesium mixed hydroxide for the model anionic dye Reactive Brilliant Red K-2BP. *Journal Hazardous Materials*. **164**: 1098-1104.
- LIN, Z.F., CHEN, L.H., FURTMULLER, L.H. ZHANG, W.Q. (1996). Peroxidase from *Ipomoea cairica* (L) SW. Isolation, purification and some properties. *Process Biochemistry*. **5**: 443-448.
- LIU, K.S. (1997). Soybeans: Chemistry technology and utilization. Chapman y Hall. New York, EE.UU.
- LOPES, A., MARTINS, S., MORÃO, A., MAGRINHO, M., GONÇALVES, I. (2004). Degradation of a textile dye C.I. direct red 80 by electrochemical processes. *Portugaliae Electrochimica Acta*. **22**: 279-294.
- LÓPEZ-AYALA, S. (2004). Degradación de un colorante diazo mediante procesos de oxidación química y biológica. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

LÓPEZ, B.L. (2002). Soja. En: Cultivos industriales L.L. Bellido (ed). Mundi-Prensa, Madrid, España, pp. 755-855.

LU, X., BO, Y. CHEN., J. RUI, S. (2009). Treatment of wastewater containing azo dye reactive brilliant red X-3B using sequential ozonation and upflow biological aerated filter process. *Journal of Hazardous Materials*. **161**: 241-245.

LUNA-JIMÉNEZ, J. (2007). Composición y procesamiento de la soja para consumo humano. *Investigación y Ciencia*. **15** (037): 35-44.

M

MADDHINNI, V.L., HIMA, B.V., ANJANEYULU, Y. (2006). Degradation of azo dye with horseradish peroxidase (HRP). *Journal Indian Institute Science*. **86**: 507-514.

MALL, I.D., SRIVASTAVA, V.C., AGARWAL, N.K. (2006). Removal of Orange-G and Methyl Violet dyes by adsorption onto bagasse fly ash—kinetic study and equilibrium isotherm analyses. *Dyes and Pigments*. **69**(3): 210-223.

MALIK, P.K. (2004). Dye removal from wastewater using activated carbon developed from sawdust: adsorption equilibrium and kinetics. *Journal of Hazardous Materials*. **113**(1-3): 81-88.

MARCHIS, T., AVETTA, P., BIANCO, P.A., FABBRI, D., VISCARDI, G., LAURENTI, E. (2011). Oxidative degradation of Remazol Turquoise Blue G 133 by soybean peroxidase. *Journal Inorganic Biochemistry*. **105**: 321-327.

MATHUR, N., KRISHNATREY, R., SHARMA, S., SHARMA, K.P. (2003). Toxic effects of textile printing industry effluents on liver and testes of albino rats. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **71**:453-457.

MATTIOLI, D., DE FLORIO, L. GIORDANO, A. (2005). Efficient use of water in the textile finishing industry. E- Water: Official Publication of the European Water Associationpp, 1-18.

MATTO, M., HUSAIN, Q. (2007). Decolorization of direct dyes by salt fractionated turnip proteins in the presence of hydrogen peroxide and redox mediators. *Chemosphere*. **69**:338-345.

McELDOON, J.P., DORDICK, J.S. (1996). Unusual thermal stability of soybean peroxidase. *Biotechnology Progress*. **12**: 555-558.

McELDOON, J.P., POKORA, A.R., DORDICK, J.S. (1995). Lignin peroxidase-type activity of soybean peroxidase. *Enzyme Microbiology Technology*. **17**: 359-365.

McMULLAN, G., MEEHAN, C., CONNEELY, A., KIRBY, N., ROBINSON, T., NIGAM, P., BANAT, I. M., MARCHANT, R., SMYTH, W. F. (2001): Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **56**: 81-87.

MELGOZA, A.R.M. (2003). Biodegradación de compuestos nitroaromáticos y un colorante azo por medio de un biofiltro discontinuo anaerobio/aerobio. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

- MELGOZA, A.R., CRUZ, A. BUITRÓN, G. (2004). Anaerobic/aerobic treatment of colorants present in textile effluents. *Water Science and Technology*. **50**:149-155.
- MERIC, S., KAPTAN, D., TUNAY, C. (2003). Removal of color and COD from a mixture of four reactive azo dyes using Fenton oxidation process. *Journal of Environmental Science and Health Part A Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*. **38**: 2241-2250.
- METCALF y EDDY (2003). Wastewater Engineering. Treatment, Disposal, Reuse. Ed. Mc Graw Hill, 4a. Ed. EE.UU.
- MIELGO, I., LÓPEZ, C., MOREIRA, M.T., FEIJOO, G., LEMA, J.M. (2003). Oxidative degradation of azo dyes by manganese peroxidase under optimized conditions. *Biotechnology Progress*. **19**(2): 325-331.
- MISHRA, A., BAJPAI, M., PANDEY, S. (2006). Removal of dyes by biodegradable flocculants: a lab scale investigation. *Science Technology*. **41**: 583-593.
- MOELLER, G., GARZÓN, M. (2006). Decoloración y reducción de toxicidad de efluentes de la industria química de colorantes y pigmentos. Informe, primera etapa; Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, Jiutepec, México.
- MOELLER, G., SANDOVAL, L., MIJAYLOVA, P., MIRANDA, E., MEJIA, M., FARFÁN, M., MENDOZA, A., BAHENA, E. (2012). Evaluación de diferentes procesos de tratamiento para la remoción de colorantes sintéticos utilizados en la industria textil. PROYECTO INTERNO. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, Jiutepec, México.
- MOHAMMAD, M.A., STEEVENSZ, A., TAYLOR, K.E., BEWTRA, J.K. BISWAS, N. (2010). Soybean peroxidase-catalyzed removal of an aromatic thiol, 2-mercaptobenzothiazole, from water. *Water Environmental Resources*. **82**: 2285-2289.
- MOHAN, S.V., PRASAD, K.K., RAO, N.C., SARMA, P.N. (2005). Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process. *Chemosphere*. **58**: 1097-1105.
- MUTHUKUMAR, M., SELVAKUMAR, N. (2004). Studies on the effect of inorganic salts on decolourisation of acid dye effluents by ozonation. *Dyes Pigments*. **62**: 221-228.

N

- NAMASIVAYAM, C., ARASI, D.J.S.E. (1997). Removal of Congo Red from wastewater by adsorption onto waste red mud. *Chemosphere*. **34**(2): 401-417.
- NEVES, F.I.G., VIEIRA, M.C., SILVA, C.L.M. (2012). Inactivation kinetics of peroxidase in zucchini (*Cucurbita pepo L.*) by heat and UV-C radiation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **13**: 158-162.
- NEYENS, E., BAEYENS, J. (2003). A review of classic Fentons peroxidation as an advanced oxidation technique. *Journal of Hazardous Materials*. **98**: 33-50.

NIGAM, P., ARMOUR, G., BANAT, I.M., SINGH, D., MARCHANT, R. (2000). Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues *Bioresource Technology*. **72**(3): 219-226.

NISSUM, M., SCHIØDT, C.B., WELINDER, K.G. (2001). Reactions of soybean peroxidase and hydrogen peroxide pH 2.4–12.0, and veratryl alcohol at pH 2.4. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1545**(1-2): 339-348.

NOGUCHI, A. (1987). Method for the preparation of textured soybean draft. U. S. Patent US 4 642 241. *Food Science Technology*. **87**(07): V0076.

NOM-001-SEMARNAT-1996. Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas residuales en aguas y bienes nacionales. Diario Oficial de la Federación. Poder Ejecutivo Federal. Estados Unidos Mexicanos.

0

OCHOA, G. J. R. (1995). Técnicas electroquímicas para el tratamiento de efluentes industriales. *Ingeniería Química*. **4**: 125-131.

OHNO, A., ANO, T., SHODA, M. (1996). Use of soybean curd residue, okara, for the solid-state substrate in the production of a lipopeptide antibiotic, iturin A, by *Bacillus subtilis* NB22. *Process Biochemistry*. **31**: 801-806.

OLIVEIRA, F.H., OSUGI, M.E., PASCHOAL, F.M.M., PROFETI, D., OLIVI, P., ZANONI, M.V.B. (2007). Electrochemical oxidation of an acid dye by active chlorine generated using Ti/Sn(1-x)Ir O_x(2) electrodes. *Journal Applied Electrochemical*. **37**: 583–592.

OLLIKKA, P., ALHOMAKI, K., LEPPAREN, V.M., GLUMOFF, T., RAIJOLA, T., SUOMINEN, Y. (1993). Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental Microbiology*. **59**: 4010–4016.

O'NEILL, C., HAWKES, F.R., HAWKES, D.L., LOURENÇO, N.D., PINHEIRO, H.M., DELÉE, W. (1999). Colour in textile effluents-sources, measurement, discharge contents, and simulation: A review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **74**: 1009-1018.

OTOOLE, D.K. (1999). Characteristics and use of okara, the soybean residue from soybean milk production- a review. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **47**: 363-371.

OZACAR M., SENGIL, A. (2005). A kinetic study of metal complex dye sorption onto pine sawdust. *Process Biochemistry*. **40**: 565-572.

- PANDEY, A., SINGH, P., IYENGAR, L. (2007). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *International Biodeterioration y Biodegradation*. **59**: 73-84.
- PAPADOPOULOS, A., FATTA, D. LOIZIDOU, M. (2007). Development and optimization of dark Fenton oxidation for the treatment of textile wastewaters with high organic load. *Journal Hazardous Materials*. **146**: 558-563.
- PARAG R. C., ANIRUDDHA B. P. (2004). A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions. *Advances in Environmental Research*. **8**: 501-555.
- PARIDA, S.K., DASH, S., PATEL, S. MISHRA, B.K. (2006). Adsorption of organic molecules on silica surface. *Coll. Int. Sci*. **121**: 77-110.
- PARK, C., LEE, M., LEE, B., KIM, S.W., CHASE, H.A., LEE, J., KIM, S. (2007). Biodegradation and biosorption for decolorization of synthetic dyes by *Funalia trogii*. *Biochemical Engineering Journal*. **36**: 59-65.
- PARK, C., LEE, B., HAN, E.J., LEE, J., KIM, S. (2006). Decolorization of Acid Black 52 by fungal immobilization. *Enzyme Microbiology Technology*. **39**: 371-374.
- PARK, T., LEE, H., JUNG, J., KIM, W. (1999). Removal of refractory organics and color in pigment wastewater with Fenton oxidation. *Water Science and Technology*. **39**: 189-192.
- PASSARDI, F., ZAMOCKY, M., FAVET, J., JAKOPITSCH, C., PENEL, C., OBINGER, C., DUNAND, C. (2007). Phylogenetic distribution of catalase-peroxidase: are there patches of order in chaos? *Gene*. **397**(1-2): 101-113.
- PIGNATELLO, J. J., OLIVEROS, E., MACKAY, A. (2006). Advanced oxidation process for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. *Environmental Science Technology*. **31**: 2399-2406.
- PINHEIRO, H.M., TOURAUD, E., THOMAS, O. (2004). Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. *Dyes and Pigments*. **61**(2): 121-139.
- PRAMPARO, L. (2008). Study of a torus bioreactor for the enzymatic elimination of phenol. Tesis de Doctorado. Universitat Rovira I Virgili. Tarragona, España.
- PRATO, D. (2009). Tratamiento de colorantes azo mediante un sistema híbrido químico biológico. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autonoma de México. México.
- PRATO, G.D., BUITRÓN, G. (2012). Evaluation of three reagent dosing strategies in a photo-Fenton process for the decolorization of azo dye mixtures. *Journal Hazardous Materials*. **217**: 293-300.

Q

QUEZADA, M., LINARES, I., BUITRÓN, G. (2000). Use of sequencing batch biofilter for degradation of azo dyes (acids and basics). *Water Science and Technology*. **42**: 329-336.

QIU YUE, Z., PING, Y., YAN, W., LEI, J. (2010). Study on adsorption of Congo red in water on calcined oyster shell powder. *Technology & Development of Chemical Industry*, **6**: 48-50.

R

RAI, H.S., BHATTACHARYYA, M.S., SINGH, J., BANSAL, T.K., VATS, P., BANERJEE, U.C. (2005). Removal of dyes from the effluent of textile and dyestuff manufacturing industry: a review of emerging techniques with reference to biological treatment. *Critical Review Environmental Science Technology*. **35**: 219-238.

RAMSAY, J., GOODE, C. (2002). Decoloration of a carpet dye effluent using *Trametes versicolor*. *Biotechnology Letters*. **26**: 197-201.

RAZO-FLORES, E., DONLON, B., FIELD, J., LETTINGA, G. (1996). The effect of granular sludge on the strategies to obviate the problem of biological persistence. *Journal Biotechnology*. **94**:101-123.

RINALDI, V.E.A., NG., P.K.W., BENNINK, M.R. (2000). Effects of extrusion on dietary fiber and isoflavone contents of wheat estrudates enriched with wet okara. *Cereal Chemical*. **77**:237-240.

ROBINSON, S.D. (1991). Peroxidases and their significance in fruits and vegetables. In: Food Enzymology. Fox P.F. (Ed). Elsevier Applied Science. Vol 1, US; Londres, Inglaterra, pp. 399-426.

ROBINSON, T., McMULLAN, G., MARCHANT, R. NIGHAM, P. (2001). Remediation of dye in textile effluents: A critical review on current treatment technologies with proposed alternative. *Bioresearch Technology*. **77**: 247-255.

RODRÍGUEZ, C.N.A. (2011). Expresión y caracterización de una peroxidasa recombinante de nabo (*Brassica napus*) en un sistema bacteriano. Tesis Doctorado. Universidad Autónoma de Querétaro. México.

RODRIGUEZ-COUTO, S., DOMINGUEZ, A., SANROMAN, A. (2002). Production of manganese-dependent peroxidase in a new solid-state bioreactor by *Phanerochaete chrysosporium* grown on wood shavings: application to the decolorization of synthetic dyes. *Folia Microbiology*. **47**: 417-421.

RUIZ, D.F.J., PÉREZ, B.M., MARTÍNEZ, M.J., MARTINEZ, A.T. (2001). A new versatil peroxidase from *Pleurotus*. *Biochemical Society Ttansaction*. **29**:116-122.

RUIZ, F. (1998). Caracterización molecular de un nuevo tipo de peroxidasa ligninolítica. Tesis Doctorado. Universidad Complutense de Madrid. España.

RYAN, B.J., CAROLAN, N., Ó'FÁGÁIN, C. (2006). Horseradish and soybean peroxidases: comparable tools for alternative niches? *Trends in Biotechnology*. **24**(8): 355-363.

- SAFARZADEH, A., BOLTON, J., CATER, S. (1997). Ferrioxalate-mediated photodegradation of organic pollutants in contaminated water. *Water Resources*. **31(4)**: 787-798.
- SAGARPA. (2009). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Boletín de Agricultura. México, D. F., México.
- SALDAÑA, F.P., SANDOVAL, M.J.C., LÓPEZ, L.R., SALCEDO, S.E. (2001). Utilización de un índice de diversidad para determinar la calidad del agua en sistemas lóticos. *Ingeniería Hidráulica de México*. **16(2)**: 57-66.
- SANGHI, R., BHATTACHARYA, B., DIXIT, A., SINGH, V. (2006). *Ipomoea dasysperma* seed gum: An effective natural coagulant for the decolorisation of textile dye solutions. *Journal of Environmental Management*. **81**: 36-41.
- SANTIAGO, R., FONTANIELLA, B., VICENTE, C. (2009). Guión de prácticas de la asignatura Fisiopatología Vegetal. Reduca (Biología). *Serie Fisiología Vegetal*. **2 (3)**: 146-166.
- SCHÖNBERGER, H., SCHÄFER, T. (2002). Best available techniques in textile industry. Research report 200 94 329 UBA-FB 000325/e. Federal Environmental Agency. Berlín, Germany.
- SELVAM, K., SWAMINATHAN, K. CHAE, K., S. (2003). Decolourization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora sp.* *Bioresource Technology*, **88(2)**: 115-119.
- SEMARNAT-CONAGUA. (2015). Estadísticas del agua en México, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Comisión Nacional del Agua, México, D.F., México.
- SHAFFIQU, T.S., ROY, J.J., NAIR, R.A. ABRAHAM, T.E. (2002). Degradation of textile dyes mediated by plant peroxidases. *Applied Biochemical Biotechnology*. **102-103**: 315-326.
- SHAUL, G. M., HOLDSWORTH, T. J., DEMPSEY, C. R., DOSTAL, K. A. (1991). Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. *Chemosphere*. **22(1-2)**, 107-119.
- SHI, B.Y., LI, G.H., WANG, D.S., FENG, C.H., TANG, H.X., (2007). Removal of direct dyes by coagulation: the performance of preformed polymeric aluminum species. *Journal Hazardous Material*. **143**: 567-574.
- SHIRZAD-SIBONI, M., KHATAEE, S.A., JOO, W. (2014). Kinetics and equilibrium studies of removal of an azo dye from aqueous solution by adsorption onto scallop. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. **20(2)**: 610-615.
- SHORE, J. (1996). Advances in direct dyes. *Indian Journal of Fibre & Textile Research*. **21**:1-29.
- SIDDIQUE, M.H., SAINT-PIERRE, C.C., BISWAS, N., BEWTRA, J.K. TAYLOR, K. E. (1993). Immobilized enzyme catalyzed removal of 4-chlorophenol from aqueous solutions. *Water Research*. **27**: 883-890.

- SILVA, M.C., DUARTE, C.A., SOUSA, P.M.T., AMORIM, P.P., 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*. **77**: 9-14.
- SILVEIRA, J.M. y DURÁN, J.M. (1998). La soja: un cultivo poco conocido en España. *Vida Rural*: **75**:28-33.
- SOARES, O.S.G.P., O' RFÃO, J.J.M., PORTELA, D., VIEIRA, A. y PEREIRA, M.F.R. (2006). Ozonation of textile effluents and dye solutions under continuous operation: Influence of operating parameters. *Journal Hazardous Materials*. **137**: 1664-1673.
- SPONZA, D.T. (2006). Toxicity studies in a chemical dye production industry in Turkey. *Journal of Hazardous Materials*. **A138**: 438-447.
- SRINIVASAN, A. VIRARAGHAVAN T. (2010). Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: a review. *Journal Environmental Management*. **91**: 1915-1929.
- SUN, D.X., ZHANG, WU, Y. LIU, X. (2010). Adsorption of anionic dyes from aqueous solution on fly ash. *Journal of Hazardous Materials*. **181**(1-3): 335-342.
- SUN, Y., PIGNATELLO, J. (1992). Chemical treatment of pesticide wastes. Evaluation of Fe(III) chelates for catalytic hydrogen peroxide oxidation of 2,4-D at circumneutral pH. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **40**: 322-327.
- SUN, S. P., LI, C. J., SUN, J. H., SHI, S. H., ZHOU, Q. (2009). Decolorization of an azo dye Orange G in aqueous solution by Fenton oxidation process: effect of system parameters and kinetic study. *Journal Hazardous Materials*. **161** (2-3): 1052-1057.
- SUNDRARAJAN, M., VISHNU, G. JOSEPH, K., (2007). Ozonation of light-shaded exhausted reactive dye bath for reuse. *Dyes Pigments*. **75**: 273-278.
- 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*. **99**: 169-176.
- STOLZ, A. (2001). Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **56**: 69-80.

T

- TABATABAEI, Y.M., KHALEGHPARAST, S. RAFATI, H. (2000). Purification and partial characterization of two peroxidases from cultivated black radish (*Raphanus martimus sm.*) root. *Journal of Sciences (Islamic Republic of Iran)*. **11**(1): 11-18.
- TAN, N. (2001) Integrated and sequential anaerobic/aerobic biodegradation of azo dyes. Tesis Doctorado, Wageningen University, Wageningen, Holanda.

TAN, N. C. G., BORGER, A. SLENDERS, P. (1999). Degradation of azo dye Mordant Yellow 10 in a sequential anaerobic and bioaugmented aerobic reactor. *Wastewater Science and Technology*. **42**(5-6): 337-344

TAN, N., VAN LEEUWEN, A., SLENDERS, P., TEMMINK, H., LETTINGA, G. FIELD, J. (2005). Fate and biodegradability of sulfonated aromatic amines. *Biodegradation*. **16**: 527-537.

TORRES, E., AYALA, M. (2010). Biocatalysis based on heme peroxidases: Peroxidases as potential industrial biocatalysts. Springer. Berlin, Alemania.

U

USDA, (2015). United States Department of Agriculture:
<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>.

V

VAMOS-VIGYAZO, L. (1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Critical Review of Food Science and Nutrition*. **15**(1):49-127.

VAN DER RIET, W. B., WIGHT, A. W., CILLIERS, J.J.L. DATEL, J. M. (1989). Food chemical investigation of tofu and its byproduct okara. *Food Chemistry*. **34**: 193-202.

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*. **72**: 289-302.

VAN DER ZEE, F.P, CERVANTES, F. (2009). Impact and application of electron shuttles on the redox (bio) transformation of contaminants: A review. *Biotechnology Advantages*. **27**: 256-277.

VAN DER ZEE, F.P., LETTINGA, G., FIELD, J. (2001). Azo dye decolourisation by anaerobic granular sludge. *Chemosphere*. **44**: 1169-1176.

VAN DER ZEE, F.P., VILLAVERDE, S. (2005). Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes – a short review of bioreactor studies. *Water Resources*. **39**: 1425–1440.

VEITCH, N. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*. **65**(3): 249-259.

VERMA, A.K., DASH, R.R. BHUNIA, P. (2012). A review on chemical coagulation-flocculation technologies for removal of colour from textile wastewater. *Environmental Management*. **93**: 154-168.

VERMA, P. MADAMWAR, D. (2002). Decolorization of synthetic textile dyes by lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Folia Microbiology*. **47**: 283–286.

VILLALOBOS, D.A., BUCHANAN, I.D. (2002). Removal and aqueous phenol by *Arthromyces ramosus* peroxidase. *Environmental Engineer Science*. **1**: 65-73.

VILLEGAS-Rosas, O., GEISLER, G., SILVA, H.A. VERGARA, G.E. (2003). Inmovilización de una peroxidasa de chayote y su potencial aplicación en la remoción de sustancias fenólicas en aguas contaminadas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. **19**: 73-81.

W

WAGNER, M., NICELL, J. A. (2002). Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Resources*. **36**: 4041-4052.

WAKAMATSU, K., TAKAHAMA, U. (1993). Changes in peroxidase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus. *Physiology of Plant*. **68**: 167-171.

WALKER, G.M., HANSEN, L., HANNA, J.A. ALLEN, S.J. (2003). Kinetics of a reactive dye adsorption onto dolomitic sorbents. *Water Research*. **37**(9): 2081-2089.

WANG, L., ZHANG, J., ZHAO, R., LI, C. LI, Y. ZHANG., C. (2010). Adsorption of basic dyes on activated carbon prepared from *Polygonum orientale* Linn: equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Desalination*. **254**(1): 68-74.

WANG, M., LI, H., WU, J., HUO, Y., GUO, G., CAO, F. (2006). Flocculant for purification of printing and dyeing wastewater. Univ. Shanghai Normal.

WANG, S., BOYJOO, Y., CHOUEIB, A., ZHU, Z.H. (2005). Removal of dyes from aqueous solution using fly ash and red mud. *Water Research*. **39**(1):129-138.

WANG, X., FU, L., LI, Y. (2008). Determination of four aromatic amines in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction combined with HPLC. *Journal of Separation Science*. **31**: 2932-2938.

WANG, H., LI, P., PANG, M., ZHAI, Z.J., YU, G.L., LIU, G., YAO, J. (2009). Rapid decolourization of azo dyes by a new isolated higher manganese peroxidase producer: *Phanerochaete sp. HSD*. *Biochemical Engineering Journal*. **46**: 327-333.

WARIISHI, H. GOLD, M.H. (1990). Lignin peroxidase compound III. Mechanism of formation and decomposition. *Journal of Biological Chemistry*. **265**: 2070-2077.

WEISBURGER, J.H. (2002). Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. *Mutation Research*. **506-507**: 9-20.

WELINDER, K.G., MAURO, J.M., NØRSKOV L. (1992). Structure of plant and fungal peroxidases. *Biochemical Society Transactions*. **20**: 337-340.

WORLD BANK GROUP. (2011). Pollution Prevention and Abatement: Textiles Industry. Draft Technical Back-ground Document. Environment Department, Washington, D. C. EE. UU.

- WRIGHT, H. NICELL, J.A. (1999). Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols. *Bioresource Technology*. **70**(1): 69–79.
- WU, J., BEWTRA, J.K., BISWAS, N. TAYLOR, K.E. (1994). Effect of H₂O₂ addition mode on enzymatic removal of phenol from wastewater in the presence of polyethylene glycol. *Canadian Journal of Chemical Engineering*. **72**: 881 - 886.
- WU, J., DOAN, H., UPRETI, S. (2008). Decolorization of aqueous textile reactive dye by ozone. *Chemicals Engineering*. **142**: 156–160.

Y

- YAMAMOTO, H.Y., STEINBERG, M.P. NELSON, A.I. (1962). Kinetic studies on the heat inactivation of peroxidase in sweet corn. *Journal of Food Science*. **27**(2): 113-119.
- YESILADA, O., ASMA, D., CING, S. (2003). Decolourization of textile dyes by fungal pellets. *Process Biochemical*. **38**: 933-938.
- YU, Y., ZHUANG, Y.Y., LI, Y., QIU, M.Q. (2002). Effect of dye structure on the interaction between organic flocculant PAN-DCD and dye. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. **41**(6): 1589-1596.
- YUE, Q.Y., GAO, B.Y., WANG, Y., ZHANG, H., SUN, X., WANG, S.G., GU, R.R. (2008). Synthesis of polyamine flocculants and their potential use in treating dye wastewater. *Journal Hazardous Material*. **152**: 221–227.
- YU, G., WEN, X., LI, R. QIAN, Y. (2006). *In vitro* degradation of a reactive azo dye by crude ligninolytic enzymes from nonimmersed liquid culture of *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry*. **41**: 1987–1993.

Z

- ZAHRIM, A.Y., HILAL, N. (2013). Treatment of highly concentrated dye solution by coagulation/flocculation–sand filtration and nanofiltration. *Water Resources and Industry*. **3**: 23–34.
- ZAHRIM, A.Y., TIZAOU, C., HILAL, N. (2010). Evaluation of several commercial synthetic polymers as flocculant aids for removal of highly concentrated C.I. Acid Black 210 dye. *Journal of Hazardous Materials*. **182**: 624-630.
- ZEYBEK, Z., YUCE, C.S., ALIOGLU, F., ALPBAZ, M. (2007). Determination of optimum operating conditions for industrial dye wastewater treatment using adaptive heuristic criticism pH control. *Journal of Environmental Management*. **85**: 404-414.
- ZHANG, Y., MA, C., YE, F., KONG, Y., LI, H. (2009) The treatment of wastewater of paper mill with integrated membrane process. *Desalination*, **236**: 349-356.

- ZHANG, X.-B., DONG, W.-Y., YANG, W. (2013). Decolorization efficiency and kinetics of typical reactive azo dye RR2 in the homogeneous Fe(II) catalyzed ozonation process. *Chemical Engineering Journal*. **233**: 14–23.
- ZHAO, X., LU, PHILLIPS, D., HWANG, H. HARDIN, I. (2006). Study of biodegradation products from azo dyes in fungal degradation by capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. **1159**: 217-224.
- ZHOU, Y., LIANG, Z., WANG, Y. (2008). Decolorization and COD removal of secondary yeast wastewater effluents by coagulation using aluminum sulfate. *Desalination*. **225**: 301–311.
- ZOLLINGER, H. (2001). *Color Chemistry: Syntheses, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments*. John Wiley & Sons, 3ª Edición. New York, EE. UU.