



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
COLEGIO INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

***DEGRADACIÓN DEL COLORANTE ALIMENTICIO
(ROJO 40) POR ENTEROBACTERIAS DE LA
MICROBIOTA INTESTINAL***

Tesis presentada para obtener el Título de:
LICENCIATURA EN INGENIERIA EN ALIMENTOS

Presenta:

ANALILIA SÁNCHEZ CALVARIO

Asesora de tesis

D.C EDITH CHÁVEZ BRAVO

Co-asesor de tesis

Dr. ALEJANDRO I. A. ALONSO CALDERON



Noviembre 2015

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. Resumen	1
II. Introducción	2
III. Planteamiento del problema	3
IV. Justificación	4
V. Objetivos	
V.I Objetivo general	5
V.II Objetivos específicos	5
VI. Hipótesis	5

Capítulo I ANTECEDENTES

1.1 Alimentación en México	6
1.1.1 Alimentación infantil	7
1.2 Industria alimentaria	7
1.3 Normatividad y uso de aditivos alimentarios en México	7
1.4 Colorantes tipo azo utilizados en la elaboración de alimentos	8
1.4.1 Colorantes artificiales tipo azo	8
1.4.2 Colorante Rojo 40	9
1.5 Enterobacterias	10
1.6 Mecanismos de biodegradación bacteriana de los colorantes azo	11
1.7 Problemas de salud debido a los colorantes sintéticos	13
1.8 Herramientas para identificación de productos de reacción (Espectroscopia UV/Vis)	15
1.9 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)	16
1.10 Interacción del colorante y la microbiota intestinal	16
1.11 Estudios reportados del efecto del colorante en la salud	17

Capítulo II METODOLOGÍA

2.1 Diagrama del trabajo	19
2.2 Colorante	20
2.3 Obtención de enterobacterias: <i>Enterobacter sp</i> , <i>Citrobacter sp</i> y <i>E. coli</i> de la microflora intestinal infantil	20
2.4 Cepas de laboratorio para comparar la interacción del	21

colorante	
2.5 Interacción bacteriana con el colorante rojo 40	22
2.6 Determinación de la absorbancia máxima del colorante rojo 40	23
2.7 Porcentaje de degradación del colorante azo	23
2.8 Caracterización parcial de los productos de reacción	24
2.8.1 Espectroscopia UV/Vis	24
2.8.2 Cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC)	25

Capítulo III RESULTADOS

3.1 Aislamiento e identificación de enterobacterias	26
3.2 Colorante	27
3.3 Interacción del colorante Rojo 40 con las cepas de estudio	28
3.3.1 Determinación de absorbancias a 30 ppm del colorante rojo 40	28
3.3.2 Porcentaje de decoloración a 30 ppm del colorante rojo 40	30
3.3.3 Determinación de absorbancias a 50 ppm del colorante rojo 40.	32
3.4 Caracterización parcial de los productos de degradación	38
3.4.1 Espectroscopia UV/Vis	38
3.4.2 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)	39

Capítulo IV DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento e identificación de enterobacterias	42
4.2 Decoloración de colorantes tipo azo	43
4.3 Caracterización parcial de los productos degradación	46
4.3.1 Espectroscopia UV/Vis	46
4.3.2 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)	46
VII. Conclusiones	49
VIII. Perspectivas	50
IX. Apéndice A	51
X. Bibliografía	58

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Fig.1 Estructura química del colorante rojo 40	9
Fig.2 Mecanismos biológicos y químicos implicados en la reducción de colorantes azo	12
Fig.3 Degradación reductiva del colorante azo rojo de metilo	13
Fig.4 Medio Stuart con la muestra fecal	20
Fig.5 Crecimiento de microorganismos en placas con agar, Mc Conkey, y verde brillante	21
Fig.6 Placas de agar Lb, sembradas con <i>E. coli DH5α</i> , <i>E. coli E2348/69</i> , <i>Enterobacter sp.</i> y <i>Citrobacter sp.</i>	22
Fig.7 Esterilización del colorante rojo 40	22
Fig.8 Suspensión Bacteriológica, caldo nutritivo estéril, tubos inoculados con el colorante al inicio del estudio.	23
Fig.9 Toma de muestra tras la interacción del colorante y la bacteria y tubos Eppendorff de 5ml con muestra de colorante y sobrenadante	23
Fig.10 Espectrofotómetro UV/Vis Cary 50 Conc	24
Fig.11 Equipo HPLC SHIMADZU PERFORMANCE	25
Fig.12 Agar Mac Conkey donde se observa el crecimiento de <i>Enterobacter sp.</i>	26
Fig.13 Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en medio Mac Conkey y EMB	27
Fig.14 Espectro de absorción del rojo 40 en la región visible	27
Fig.15 Comparación del porcentaje de degradación del Rojo 40 a 30 ppm por las diferentes cepas de estudio	31
Fig.16 Decoloración del rojo 40 con diferente bacteria	32
Fig.17 Comparación del porcentaje de decoloración del Rojo 40 a 50 ppm por las diferentes cepas de estudio	36
Fig. 18 Tubos inoculados con bacteria a 30 y 50 ppm en diferentes días	37
Fig.19 Recuperación bacteriana en el momento de la interacción	37
Fig.20 Espectro de absorción UV después de la interacción bacteriana a 30 ppm	38
Fig.21 Espectro de absorción UV después de la interacción bacteriana a 50 ppm	39
Fig.22 Reducción del monoazo colorante Acid Orange 7	47

Fig.23 Cromatograma de 1-naftol a 285 nm con T_R en 5.585	51
Fig.24 Cromatograma de 1-naftol a 315 nm con T_R en 5.591 min.	51
Fig.25 Cromatograma de anilina a 260 nm con T_R más evidentes en 4.089 min, 5.591 min y 5.908	51
Fig.26 Cromatograma de anilina a 285 nm de con T_R más evidentes en 4.093 min, 5.588min y 5.878 min.	52
Fig.27 Cromatograma del medio con rojo 40 a 285nm para comparación del 1- naftol con T_R en 2.624 min y 5.545min	52
Fig.28 Cromatograma del medio con colorante rojo 40 a 315 nm de con T_R en 2.704 5min ,545min y 5.676 min	52
Fig.29 Cromatograma del medio con colorante rojo 40 a 260 nm de con T_R sobresalientes a los 4.300 min, 41 min, 8.251 min y 12.053.	53
Fig.30 Cromatograma del medio con colorante rojo 40 a 285 nm de longitud de onda para comparación con la anilina con T_R en 2.413 min, 5.545 min, 5.666 min y 8.226min.	53
Fig.31 Cromatograma de rojo 40 degradado por <i>Citrobacter sp.</i> a 285 nm de longitud de onda con T_R en 4.138, 5.591 y 6.342 min.	53
Fig.32 Cromatograma de rojo 40 degradado por <i>Citrobacter sp.</i> a 315 nm de longitud de onda con T_R en 5.591min.	54
Fig.33 Cromatograma de rojo 40 degradado por <i>Citrobacter sp.</i> a 260 nm de longitud de onda con T_R en 5.554 min.	54
Fig.34 Cromatograma de rojo 40 degradado por <i>Citrobacter sp.</i> a 285 nm de longitud de onda con T_R en 5.578min.	54
Fig.35 Cromatograma de rojo 40 degradado por <i>DH5a</i> a 285 nm de longitud de onda con T_R en 5.599 min.	55
Fig.36 Cromatograma de rojo 40 degradado por <i>DH5a</i> a 315 nm de longitud de onda con T_R en 5.595 min.	55
Fig.37 Cromatograma de rojo 40 degradado por <i>DH5a</i> a 260 nm de longitud de onda con T_R en 5.573min.	55
Fig.38 Cromatograma de rojo 40 degradado por <i>Enterobacter sp.</i> de la microbiota intestinal a 285 nm T_R en 5.559.	56
Fig.39 Cromatograma de rojo 40 degradado por <i>Enterobacter</i> de la microbiota intestinal a 260 nm con T_R en 3.383 min, 4.132 min, 5.553.	56
Fig.40 Cromatograma de rojo 40 degradada por <i>Escherichia coli</i> de la microbiota intestinal a 315 nm con T_R en 4.28.	56
Fig.41 Cromatograma de rojo 40 degradado por <i>Enterobacter</i> del acervo bacteriano a 260 nm con T_R en 5.246 min y 5.703 min.	57
Fig.42 Cromatograma de rojo 40 degradado por <i>E2348/69</i> a 285 nm	57

Índice de Tablas

	Pagina
Tabla 1. Cepas que se emplearan durante la investigación	21
Tabla 2. Resultado de las pruebas bioquímicas de las colonias aisladas en medio Mac Conkey y EMB	26
Tabla 3. Absorbancias registradas durante la interacción con el colorante a 30ppm	29
Tabla 4. Absorbancias registradas durante la interacción con el colorante a 50ppm	34
Tabla 5. Longitudes de onda (nm) durante la intersección con el control rojo 40	38
Tabla 6. Tiempos de retención significativos para las muestras obtenidas por las bacterias y el estándar 1- naftol	39
Tabla 7. Tiempos de retención significativos para las muestras obtenidas por las bacterias y el estándar anilina	41

ABREVIATURAS

μl	Microlitro
Abs	Absorbancia
D (%)	Porcentaje de Degradación
Df	Densidad óptica Final
Di	Densidad óptica inicial
EMB	Agar Eosina y Azul de Metileno)
EPEC	E. coli Enteropatógena
FAO	Organización para la Alimentación y la Agricultura
G	Gramo
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
Kg	Kilogramo
L	Litro
LB	Agar Luria Bertani
Mg	Miligramos
ml	mililitro
NaCl	Cloruro de sodio
NOAEL	Nivel sin efecto (adverso) observado
OMS	Organización Mundial de la Salud
Ppm	Partes por millon
Rpm	Revoluciones por minuto
T _R	Tiempo de retención
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
Vis	Visible
IDA	Ingesta Diaria Admisible

I. Resumen

La industria alimentaria utiliza diversos colorantes sintéticos para mejorar la apariencia de los alimentos, como los de tipo azo. Sin embargo, autores señalan que la ingesta de colorantes azoicos se ve relacionada con problemas de salud. Cuando los colorantes son ingeridos suelen ser absorbidos, transformados o eliminados por diversos procesos metabólicos, donde la participación de la microbiota intestinal es fundamental, hasta ahora poco se conoce si las enterobacterias son capaces de degradar dichos compuestos, por lo que, el objetivo de este estudio fue realizar una interacción directa entre el colorante alimenticio rojo 40 con enterobacterias de la microbiota intestinal, para determinar el porcentaje de decoloración del colorante y caracterizar los posibles productos de reacción. Para ello se aislaron e identificaron enterobacterias de la microbiota intestinal (*Escherichia coli* y *Enterobacter*), posteriormente se inocularon a 30 y 50 ppm del colorante rojo 40, cada 24h se registró una lectura espectrofotométrica del colorante hasta alcanzar un lapso de tiempo de diez días y después se llevó a cabo la caracterización parcial de los productos de reacción de las muestras analizadas mediante UV/Vis y HPLC, ésta metodología también se aplicó a cepas de acervos bacterianos: *DH5a*, *E2348/69*, *Enterobacter sp.* y *Citrobacter sp.* De los resultados del estudio se encontró que a 30 ppm del colorante rojo 40, las cepas *DH5a* y *Citrobacter* decoloraron el 83 y 81% respectivamente, en cambio las enterobacterias aisladas de la microbiota intestinal presentaron, un 65% para *Enterobacter* y un 49% para *Escherichia coli*. A 50 ppm, *Citrobacter sp* y *E2348/69* presentaron los porcentajes más altos de decoloración con un 94.36 y 84.29% respectivamente y las bacterias de la microbiota intestinal un 35% para *Enterobacter* y un 42% para *Escherichia coli*. Los resultados de la espectroscopia UV/Vis de los productos de degradación mostraron que hubo una reacción química cuyos cambios se manifestaron entre los 280 y 294 nm con respecto al control para ambas concentraciones, la caracterización parcial por HPLC registró la formación de un compuesto análogo al 1-naftol y otro a una amina aromática.

II. Introducción

La mayoría de los alimentos procesados contienen colorantes que se han considerado de dudosa utilidad en la industria alimentaria, sin embargo, son utilizados para resaltar la apariencia natural de los alimentos y hacerlos más atractivos al consumidor (Francisco E. *et al*, 2012). Los colorantes se clasifican por su grupo cromóforo, encontrándose a los azoicos, estos se caracterizan por tener uno o más enlaces $R_1-N=N-R_2$, son ampliamente utilizados en la industria textil, cosmética, farmacéutica y alimenticia por su facilidad de síntesis y su estabilidad química (Raffi, 1997). Los seres humanos están expuestos a estos compuestos a través de la ingestión, inhalación o contacto físico, los infantes han sido el grupo más vulnerable ya que al consumir dichos productos se asocia la hiperactividad y déficit de atención (Rimblas, 2004). El rojo 40 es un colorante azoico ampliamente utilizado en productos lácteos, cárnicos y confitería, se encuentra asociado a estos problemas por lo que su uso ha sido restringido o eliminado en países como; Nigeria, Suiza, Canadá y la Unión Europea (Kobylewski, 2010).

Sistemas enzimáticos microbianos pueden metabolizar los colorantes azoicos (Platzek, 1999). La liberación de estos componentes en el ambiente no es favorable ya que muchos colorantes azoicos en su degradación dan como resultado productos tóxicos y/o mutagénicos (Chen y Weisburger, 2006, 2002). La biodegradación de colorantes azoicos por bacterias puede ser realizado por procesos anaeróbicos y/o aeróbicos (Dos Santos, 2007), durante una decoloración anaeróbica en la que se involucra la microbiota intestinal la reducción del enlace azo es causado por enzimas azorreductasas, utilizando NADH y/o NADPH como un donador de electrones. Aunque se establecen reportes del uso de bacterias de la microbiota intestinal en la remoción de colorantes en aguas residuales (Lin y Peng, 1994, 1996), existe poca información de la interacción de la microorganismos intestinales con colorantes alimenticios.

Por lo anterior, se despertó el interés de encontrar el papel que desempeñan las enterobacterias (*Enterobacter sp.* y *Escherichia coli*) de la microbiota intestinal al interaccionar con el colorante alimenticio rojo 40, además de caracterizar los posibles productos generados durante la degradación del colorante.

III. Planteamiento del problema

Uno de los colorantes sintéticos más utilizados en la industria alimentaria mexicana es el rojo 40 o rojo allura debido a su bajo costo y accesibilidad. Es obtenido sintéticamente mediante acoplamiento azoico del petróleo y se emplea en golosinas, helados, postres, bebidas sin alcohol, productos cárnicos, mermeladas, yogurt, jugos, refrescos, complementos alimentarios y cosméticos. Diversos estudios de acuerdo a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2008, 2009) han reportado que los colorantes en los alimentos establecen características de toxicidad, de tal forma que en algunos países con excepción al nuestro, han restringido o eliminado su consumo, como el caso del colorante amarillo 5, amarillo 6 y rojo 40.

La ingesta usual y prolongada de alimentos coloreados pone en alerta a la salud humana debido a la frecuente exposición de productos tóxicos en el cuerpo, con posibilidad de ser degradados por los microorganismos de la flora intestinal y formar productos carcinogénicos, así mismo se sabe que la microbiota intestinal juega un papel clave en el metabolismo de diversos productos sintéticos, así como en la homeostasis intestinal del ser humano. Cobrando cada vez más importancia el estudio de las posibles biotransformaciones de los colorantes en el alimento, durante la preparación y almacenamiento e incluso en el interior del organismo.

IV. Justificación

La biodegradación de los colorantes se lleva a cabo mediante diversos procesos anaeróbicos o aeróbicos bacterianos. En el proceso anaeróbico la degradación de colorantes tipo azo da como resultante la formación de productos secundarios como aminas aromáticas como la bencidina, que son resistentes a la desintoxicación en condiciones de bajo oxígeno, dichos productos alteran y destruyen los cuerpos de agua y producen serios problemas a la salud poblacional.

Existen distintas afirmaciones como la de Chung, (1992) de los problemas causados por los colorantes en los ecosistemas acuáticos, pero aún existe poca información de las interacciones que se establecen entre la microflora intestinal y los colorantes azo que se utilizan en la industria alimentaria con sus posibles implicaciones, ya que, si la microbiota se involucra en la biodegradación de estos compuestos pueden formarse metabolitos secundarios más peligrosos que el propio colorante, representando un serio problema a la salud del consumidor.

Por lo que en este estudio se pretenden estudiar la interacción del colorante rojo 40 con enterobacterias (*Enterobacter sp.* y *Escherichia coli*) de la microbiota intestinal con la finalidad de encontrar el papel que desempeñan las enterobacterias al interaccionar con los colorantes alimenticios como el rojo 40, además de hallar una posible vía para adquirir genotóxicos y/o mutagénicos en el cuerpo, mediante el reconocimiento de los productos de reacción que se generen.

Objetivo (s)

Objetivo General

Determinar el porcentaje de decoloración del colorante rojo 40 y los posibles metabolitos generados después de la interacción de enterobacterias de la microbiota intestinal con el colorante.

Objetivos Específicos

- Aislar e identificar géneros enterobacterianos: *Enterobacter sp.* y *Escherichia coli* a partir de una muestra fecal infantil.
- Determinar el porcentaje de decoloración del colorante rojo 40, a 30 y 50 ppm por las enterobacterias aisladas de la microbiota intestinal.
- Comparar la interacción del colorante rojo 40 con las enterobacterias aisladas de la microbiota intestinal y con las enterobacterias de acervos bacterianos.
- Realizar la caracterización parcial de los productos de degradación del colorante rojo 40 mediante espectroscopia UV/Vis y HPLC.

VI. Hipótesis

Ho: Al realizar la interacción del colorante rojo 40 con cada una de las enterobacterias No existe ningún porcentaje de decoloración del colorante artificial ni productos de degradación.

H1: Al realizar la interacción del colorante rojo 40 con cada una de las enterobacterias, existe un porcentaje de decoloración del colorante rojo 40, con la posibilidad de hallar productos de degradación.

Capítulo I

ANTECEDENTES

1.1 Alimentación en México

La falta de ingresos es una de las causas más importantes que impiden a la población obtener una dieta adecuada. Con la información de la Encuesta de Ingresos y Gastos de los Hogares (ENIGH), del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), se observó que en los hogares más pobres el aporte dietético estriba en pocos alimentos, entre los que destaca el consumo del maíz; en los hogares que cuentan con alto ingreso, la energía y los nutrientes se adquieren de una variedad más amplia de éstos, entre los que destacan frutas, vegetales y carnes (Martínez y Villezca, 2003).

Un aspecto de las características alimentarias de la población mexicana corresponde al valor modal de los gastos reportados por las familias. Por lo que el consumo de los alimentos se clasifican según el estrato socioeconómico (bajo, medio y alto) según deciles del ingreso familiar. A partir de dicha clasificación y la encuesta nacional de “*Los 20 productos de mayor frecuencia de gasto en los hogares*”, se producen diferencias en la posición modal de los productos; por ejemplo, el 20% de los que cuentan con más alto ingreso (estrato alto) la leche se ubica en el segundo lugar de frecuencia de gasto, mientras que el mismo producto aparece en el decimocuarto lugar en el 20% de los que tienen menor ingreso (estrato bajo) y en el quinto lugar en 60% de los hogares del segmento medio. De acuerdo con los datos obtenidos por la encuesta, la mayor frecuencia de gasto de los hogares mexicanos se da en productos como la tortilla de maíz, tomate, huevos, refrescos, leche, frijol, cebolla, papa, pan de dulce, pollo y pasta para sopa. Por otro lado, en una familia mexicana promedio, el aporte nutricional de los 20 productos sobre el total de cada nutriente fue de 63% de calorías, 55% de proteínas y 55% de grasas (Martínez y Villezca, 2003).

1.1.1 Alimentación infantil

En la actualidad ha existido una expansión en los procesos de globalización los cuales afectan el estilo de vida de muchas poblaciones y familias debido a estos cambios y procesos ha existido un cambio en la forma de alimentación de las personas principalmente en niños ya que se relacionan con el excesivo consumo de alimentos industrializados con contenidos elevados de hidratos de carbono (Serra, 2006). De acuerdo con la Secretaría de Salud, en “México se gasta alrededor de 240 mil millones de pesos al año en la compra de comida chatarra y sólo 10 mil millones en la compra de alimentos básicos”. Se destina el 40% del gasto escolar en comida chatarra, ocho de cada diez niños la consumen, acompañado con el sedentarismo aumenta hasta el 85%. El secretario de Salud, José Ángel Córdova Villalobos, declaraba que los niños gastan al año 20 mil millones de pesos en golosinas (García, 2011).

1.2 Industria alimentaria

Los alimentos pueden actuar como vehículos de diferentes productos químicos como los aditivos alimentarios (Schmidt, 1990). Se entiende como Aditivo alimentario: cualquier sustancia que no se consume normalmente, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo y cuya adición se realiza con fines tecnológicos de producción, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, y/o transporte o almacenamiento (Chertoviski, 2012). Dentro de los aditivos encontramos colorantes, saborizantes, emulsificantes, espesantes, potenciadores de sabor, edulcorantes y gelificantes (Schmidt-Hebbel, 1990). Dentro de los colorantes más utilizados en la industria alimentaria están la tartrazina usado en alimentos como: cereales, bebidas, postres y dulces; el negro brillante usado casi exclusivamente para colorear sucedáneos de caviar; amarillo oca, de gran uso en refrescos de naranja, cárnicos, helados, caramelos y el amarillo de quinoleína utilizado en bebidas refrescantes y alcohólicas, y en la elaboración de productos de repostería, conservas vegetales, derivados cárnicos o de pescado.

1.3 Normatividad y uso de aditivos alimentarios en México

Existe a nivel mundial diversas organizaciones para controlar la cantidad y el uso de los aditivos como: la Organización para la Alimentación y la

Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Ibáñez, 2003).

En México la normatividad está sustentada básicamente por la Comisión del Código Alimentarius, la Ley General de Salud y las Normas Oficiales Mexicanas referentes a los alimentos (NOM-036-SSA1-1993, NOM-086-SSA1-1994, NOM-120-SSA1-1994, NOM-131-SSA1-1995, NOM-147-SSA1-1996, NOM-185-SSA1-2002, NOM-213-SSA1-2002) quienes establecen las dosis recomendada de colorantes para su uso en la industria alimentaria.

En diversos países como la Unión Europea y Estados Unidos han establecido especificaciones para certificar colorantes y que no tengan efectos secundarios en los consumidores, es así, como diversos colorantes han sido limitados, ejemplo la Carmoisina (E-122) no está autorizada en países Nórdicos, Estados Unidos y Japón; el rojo Cochinilla y el negro brillante (E-151) no se usa en Estados Unidos, Países Nórdicos, Canadá y Japón; amarillo de Quinoleína (E-104) no se permite en Australia, Estados Unidos, México, Japón y Noruega. En el caso de la Tartrazina debe declararse independiente de la lista de ingredientes en la etiqueta de los productos, como advertencia al consumidor (Kobylewski, 2010)

1.4 Colorantes tipo azo utilizados en la elaboración de alimentos

Los colorantes han sido utilizados desde tiempos atrás y se emplean de manera muy común en la industria alimentaria para mejorar la apariencia de los alimentos y hacerlos más atractivos al consumidor. Por ejemplo en la India y en China, en el año 1500 a. C., se utilizaban extractos de especias y vegetales para colorear los platillos, el vino se coloreaba ya en el 400 a.C., y hasta 1850, todos los colorantes añadidos en la alimentación eran de origen natural, vegetales, animales o minerales, en la actualidad se hace uso de colorantes artificiales (Astiasarán, 2003).

1.4.1 Colorantes artificiales tipo azo

Los colorantes artificiales son sustancias obtenidas mediante síntesis química, presentan en su estructura grupos cromóforos que le confieren coloración (Berzas, 2005). Dentro de estos se encuentran los colorantes azoicos, todos ellos presentan en su estructura uno o más enlaces dobles nitrógeno-nitrógeno (grupo azo $N=N$), las coloraciones de estos compuestos son amarillo, naranja, rojo y marrón. Algunos ejemplos de ellos son:

Carmoisina, Amaranto, Ponceu 4R, Amarillo anaranjado, Rojo 40, MarronPn, entre otros (O'Neill et al., 1999). Los colorantes azoicos constituyen la clase más grande y más versátil de los tintes sintéticos utilizados en la industria textil, farmacéutica, cosmética y en la de alimentos como: bebidas, dulces, helados, salsas, embutidos entre otros (Dos Santos et al., 2007).

1.4.2 Colorante Rojo 40

El Rojo 40 es la versión aprobada por la FDA del rojo Allura que fue producido por primera vez por Allied Chemical Corp en el año de 1980 y fue evaluado en EU por el Comité Científico de Alimentos (SCF) en 1984 y 1989 European Food Safety Authority (EFSA) (2009).

El colorante aniónico rojo 40, es ampliamente utilizado en la industria alimentaria: en bebidas, productos de panadería, cárnicos, polvos de postre, dulces, cereales, medicamentos, y cosméticos, y en tintas de tatuajes (Soylac, 2008).

Es nombrado FD&C Rojo No. 40 por la FDA, también es llamado: rojo Allura, rojo alimenticio 17, C.I. 16035, 2 -naphthalenesulfonic acid, 6-hydroxy-5 -((2 -methoxy-5 -methyl-4 -sulfophenyl) azo)-,disodiumsalt, y disodium 6 -hydroxy-5 -((2 -methoxy-5 -methyl-4 -sulfophenyl) azo)-2 naphthalenesulfonate, posee el número E-129 en la lista de aditivos alimenticios en la Unión Europea (Calvo, 2015).

Es un colorante ácido de la clase de los monoazos, con fórmula química $C_{18}H_{14}N_2Na_2O_8S_2$; PM 496.42gmol⁻¹. Tiene propiedades ácidas y una estructura aromática constituida por tres anillos bencénicos (Fig. 1) (Srinivasan, 2009).

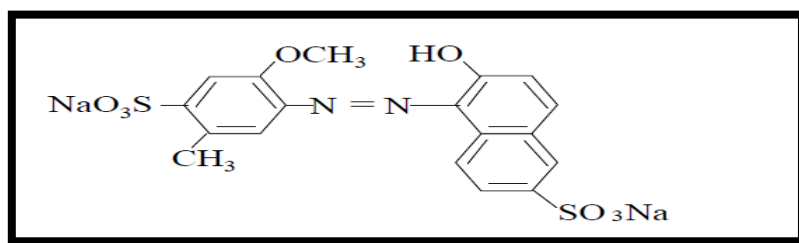


Fig. 1 Estructura química del colorante rojo 40 AC

Este colorante fue emitido por la FDA (Food and Drug Administration) para su uso en la industria alimentaria de los Estados Unidos a mediados de la década de los ochenta para reemplazar el colorante amaranto (E-123, C.I. 16185), ya que este fue prohibido por mostrar efectos nocivos en la salud (Wilson y Bahaa, 2005; Umer et al., 2008; Holmberg, 1978).

El rojo 40 tiene una IDA (Ingesta Diaria Admisible) de 7 mg /kg por peso/día señala la FDAf (Federal Drug Agents Foundation), que se traduce en 210 mg para un niño de 30 kg (Calvo, 2015).

Se estima que las empresas producen diariamente alrededor de 25 mg de rojo 40 por persona, pero debido al uso en gran medida, este valor podría incrementarse inclusive varias veces.

Este colorante ha sido restringido por algunos países de la Unión Europea como: Dinamarca, Bélgica, Francia, Alemania, Suiza, Suecia, Austria y Noruega, debido a que se encuentra implicado en la salud infantil como la hiperactividad, déficit de atención y liberador de histamina intensificando los síntomas de asma (Gupta, 2009).

1.5 Enterobacterias

La familia Enterobacteriaceae constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias gramnegativas. Reciben su nombre por la localización habitual como saprofitos en el tracto digestivo del ser humano y animales, aunque se trata de gérmenes ubicuos, también se pueden encontrar en el suelo, el agua y la vegetación (Puerta & Mateos, 2010). En el hombre se localizan en las vías aéreas superiores (en pequeña proporción), en la piel (sobre todo en la región perianal), en la uretra anterior y en el intestino. Desde el estómago al intestino grueso, la concentración va aumentando a lo largo del tubo digestivo (Giglio, 2013). Son fermentadores, anaerobios facultativos, no esporulados, reducen nitratos a nitritos, oxidasa negativa, catalasa positiva, movilidad variable y son patógenos oportunistas. (Orn, 2005), su forma es de bastón, por lo general de 1-3 µm de largo y 0,5 µm de diámetro.

Una fermentación es el proceso metabólico de óxido-reducción que tiene lugar en un entorno anaeróbico, en el que el sustrato orgánico sirve como aceptor final de hidrógenos (electrones) en lugar de oxígeno. Los miembros de la familia Enterobacteriaceae pueden llevar a cabo dos tipos de fermentación:

La primera es la fermentación ácido mixta: en esta vía se produce ácido acético, etanol, H_2 , CO_2 y proporciones diferentes de ácido láctico o propiónico (fórmico) que varían con el microorganismo y con las condiciones de cultivo. En esta ruta de fermentación se produce ATP además de la reoxidación del $NADH^+H^+$. La producción de formiato ($CO_2 + H_2$) depende de la presencia de la enzima denominada formiato-liasa responsable del paso en la bacteria. No todas las bacterias la tienen y su actividad es detectable por la producción de grandes cantidades de gas (el H_2 es insoluble) como consecuencia de la fermentación del azúcar (Madigan, 2009).

Por otra parte está la fermentación butanodiólica: en esta ruta la glucosa es fragmentada, se desprende CO_2 y se logra como producto final el 2,3-butanodiol. Como paso intermedio de la ruta se produce acetoina que puede servir para la identificación de las bacterias que presentan esta ruta mediante la reacción de Voges-Proskauer (Kataoka et al 1999).

1.6 Mecanismos de biodegradación bacteriana de los colorantes azo

Actualmente se conocen varios mecanismos mediante los cuales se reducen los colorantes azo (Fig. 2). El mecanismo más estudiado implica la reducción biológica de colorantes azo por una amplia gama de microorganismos anaerobios. Al respecto, se conocen diferentes formas de reducción microbiana; en algunos casos la reducción se lleva a cabo en el citoplasma de las bacterias, mientras que en otros casos, la reducción de los colorantes está asociada a enzimas de la membrana celular (Dos Santos et al., 2007). Otro mecanismo de reducción de colorantes azo involucra la participación de distintos mediadores redox que canalizan los electrones generados por microorganismos, gracias a la oxidación de diferentes sustratos, hacia los enlaces azo de los colorantes.

Reducción enzimática directa: De acuerdo con los mecanismos de la reducción biológica, la transferencia de equivalentes reductores se origina a partir de la oxidación de sustratos orgánicos, las enzimas especializadas catalizan la reducción de los enlaces azo. La enzima responsable es llamada azoreductasa encontrada en bacterias tanto aerobias como facultativas que toman al colorante azo como única fuente de carbono y energía. También se han aislado enzimas no específicas que catalizan la reducción, de: *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Bacillus sp* (Van der Zee, 2000).

Reducción indirecta: De acuerdo al segundo mecanismos biológico de reducción los colorantes azo son indirectamente reducidos por donadores de electrones enzimáticos como las flavinas (FADH_2 , FMNH_2 , riboflavina) los cuales pueden reducir directamente a los colorantes dentro de una reacción química no específica.

Los compuestos bioquímicos altamente reducidos, tales como NADH, FMN (mononucleótido de flavina) y FAD (Dinucleótido de adenina-flavina), actúan como cofactores para las enzimas azorreductasas. Su presencia en cultivos bacterianos incrementa la tasa de decoloración (Chung y Steven, 1993).

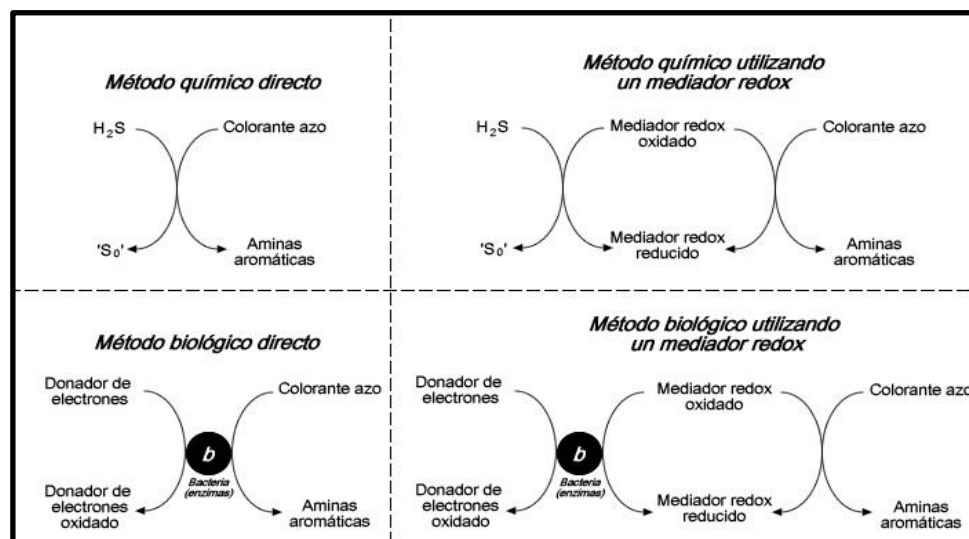


Fig. 2 Principales mecanismos biológicos y químicos implicados en la reducción de colorantes azo a aminas aromáticas (van der Zee *et al.*, 2002).

Los microorganismos que participan en una reducción biológica, se involucran en el rompimiento del grupo funcional de la molécula y en la transformación de los productos metabólicos resultantes (Kandelbaur y Guabitz, 2005). El desarrollo de procesos encaminados hacia la decoloración de efluentes industriales ha permitido conocer hongos y bacterias especializadas para realizar los procesos de remoción de un amplio espectro de colorantes, con un alto porcentaje de degradación (Ren *et al.*, 2006). De acuerdo a sus características, las bacterias pueden participar en procesos de degradación aerobia y anaerobia, algunas de ellas son: *Aeromonas sp.*, *Bacillus subtilis*, *Proetus mirabilis* y *Pseudomonas luteola* entre otras. (Horitsu *et al.*, McMullan *et al.*, 1977, 2001).

El mecanismo por el cual bacterias pueden degradar los colorantes artificiales es mediante la secreción de enzimas azorreductasas (Russ *et al.*, 2000). En condiciones anóxicas estas enzimas facilitan la transferencia de electrones por medio de flavinas solubles al tinte azo, el cual se reduce (McMullan *et al.*, 2001).

El mecanismo de degradación de los tintes azo da lugar a la generación de aminas aromáticas (Baughman *et al.*, 2005), que carecen de color, pero tienen un alto carácter tóxico, mutagénico y con altas posibilidades de ser cancerígena (Forgacs *et al.*, 2004).

Las azorreductasas catalizan el rompimiento reductivo del grupo azo con NADPH (Dinucleótido adenin difosfato nicotinamina) como donador de electrones (Zimmermann *et al.*, 1984). Su actividad es afectada por la presencia de oxígeno, por los aceptores finales de electrones, y por otros factores, tales como el tipo de colorante, y condiciones de operación del proceso anaerobio (Pansward *et al.*, 2000).

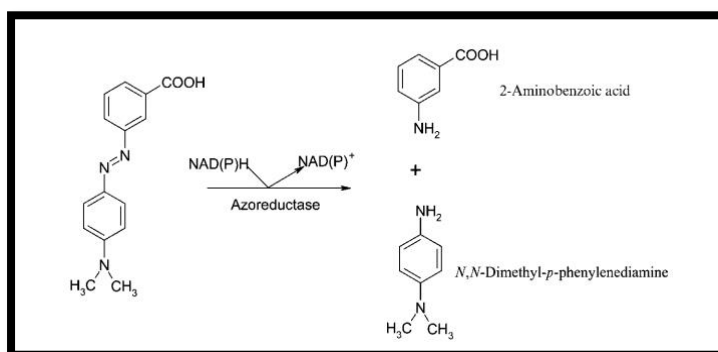


Fig. 3 Degradación reductiva del colorante azo rojo de metilo por azo1 de *S. aureus* expresado en *E. coli* en presencia de NADPH.

Un ejemplo de Enterobacteria capaz de reducir colorantes azoicos es *Citrobacter sp.* pues tiene la capacidad de degradar diversos colorantes recalcitrantes de tipo azo y trifenilmetano, utilizando mecanismos de bisorción y biodegradación (An *et al.*, 2002).

1.7 Problemas de salud debido a los colorantes artificiales

El exceso del consumo de productos alimenticios industrializados que contienen altas cantidades de aditivos como colorantes ha provocado problemas como: déficit de atención, ansiedad, individualismo, falta de

comunicación, hiperactividad y frustración en los infantes. Una de las causas del consumo desmedido se hace al bombardeo que se realiza a través de los medios de mensajes publicitarios, principalmente dirigidos a este sector de la población.

Los colorantes más utilizados son los artificiales debido a su bajo costo, sin embargo por su toxicidad no todos son seguros para la población. En el Reino Unido la *Agencia de Normas Alimentarias*, (2008) señala que colorantes como amarillo 5 o tartrazina, amarillo oca 6, amarillo de quinoleína, rojo Allura 40, rojo cochinilla se encuentran asociados al síndrome de déficit de atención (TDAH) e hiperactividad, por lo que se ha establecido el uso obligatorio de etiquetado en los productos donde se advierta si contienen alguno de estos colorantes (Calvillo Unna, 2012).

La polémica acerca de los colorantes se desató por primera vez en los años 70's cuando el alergólogo pediatra de California Benjamin Feingold propuso en 1973 que los salicilato y colorantes artificiales causan hiperactividad en niños, posteriormente se llevaron a cabo estudios con Amarillo tartrazina comprobándose sus efectos alérgicos (Ershoff, 1977). La tartrazina promueve una mayor liberación de histamina en pacientes sensibles, lo cual provoca reacciones en los individuos, especialmente en los niños (Tanaka, 2008).

Debido a los problemas de conducta infantil causados por la ingesta de colorantes artificiales, investigadores del Reino Unido de la Universidad de Salud Infantil del Hospital General Southampton (University Child Health Southampton General Hospital) realizaron un estudio doble ciego con niños utilizando diferentes aditivos sintéticos (tartrazina, carmoisina, rojo Allura, amarillo oca, rojo ponceau 4R y benzoato de sodio) observando una asociación positiva a la hiperactividad y conducta de los niños (Bateman, et al, 2003). Este estudio fue de gran impacto para el mundo, ya que Bateman y colaboradores pudieron comprobar el impacto que tienen los colorantes artificiales en la conducta de los niños. En sus conclusiones extrapolan los efectos a toda la población infantil de tres años de edad. A partir de esta información en el 2007, Donna McCann y colaboradores realizaron también un estudio de doble ciego, en niños de 3, 8 y 9 años de edad con la misma metodología de Bateman y colaboradores. Comprobaron que los colorantes artificiales, de uso común, tartrazina, carmoisina, rojo 40, amarillo oca, rojo ponceau 4R y el conservador

benzoato de sodio tienen impactos negativos en el comportamiento de los niños, de todas las edades, provocándoles hiperactividad y déficit de atención (McCann, 2007).

1.8 Herramientas para identificación de productos de reacción (Espectroscopia UV/Vis)

La espectroscopia de absorción ultravioleta- visible fue uno de los primeros métodos físicos que se aplicó al análisis cuantitativo y a la determinación de estructuras. Si bien la espectroscopia infrarroja y de resonancia magnética nuclear (rmn) son las técnicas más idóneas para el análisis cualitativo y estructural, la espectrofotometría ultravioleta – visible supera el resto de los métodos ópticos de análisis en lo referente al análisis cuantitativo y es también una técnica auxiliar útil para la elucidación de estructuras. La región ultravioleta se divide, por comodidad, en ultravioleta lejano (de 10 a 200nm) y ultravioleta próximo (de 200 a 400nm). La región del ultravioleta lejano suele llamarse también ultravioleta de vacío, puesto que el oxígeno absorbe justo por debajo de 200nm y es preciso eliminarlo del espectrofotómetro (hasta 150 nm, donde la absorción empieza a ser intensa, basta con pesar una corriente de nitrógeno). Las radiaciones ultravioleta y visible tienen en común el que la absorción en ambas regiones provoca la excitación de electrones a niveles de energía superiores. Para excitar a los electrones fuertemente unidos se requiere, en general, fotones energéticos (de longitud de onda corta) mientras que los electrones unidos débilmente (deslocalizados) pueden excitarse con radiaciones de longitud de onda más larga (Olsen, 1990).

La base de la espectroscopia visible y ultravioleta consiste en medir la intensidad del color a una longitud de onda específica comparándola con otras soluciones de concentración conocida (soluciones estándar) que contengan la misma especie absorbente. Este tipo de espectroscopia se usa rutinariamente en química analítica para la determinación cuantitativa de diferentes analitos, tales como iones de metales de transición, compuestos orgánicos altamente conjugados y macromoléculas biológicas (Skoog, 1998). Por lo anterior, estudios de biodegradación de colorantes azoicos como los de Wang en 2009 y Cheng en 2005 hacen uso de esta técnica para la identificación de los cambios químicos durante la interacción de microorganismos con colorantes azo.

1.9 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)

Debido a que la espectroscopia no se considera una técnica detallada para la caracterización de productos de reacción Cheng y colaboradores en el 2005 hacen uso de HPLC para la identificación de productos de reacción tras la degradación de rojo de metilo por un gen de *S. aureus* expresado en *Escherichia coli*.

Es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Consiste en una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil. La fase estacionaria es sílica que se ha tratado con RMe_2SiCl . La fase móvil actúa de portador de la muestra. La muestra en solución es inyectada en la fase móvil. Los componentes de la solución emigran de acuerdo a las interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna. Estas interacciones químicas, determinan la separación de los contenidos en la muestra. La utilización de los diferentes detectores dependerá de la naturaleza de los compuestos a determinar (Hanai, 1999).

1.10 Interacción del colorante y la microbiota intestinal

El estudio de la interacción de colorantes y la microbiota intestinal ha sido un tema de interés desde hace años. El primer reporte sobre la reducción de un colorante azo fue publicado por Brohm & Frohwein (1937), cuando estudiaron la reducción de colorantes utilizados en la industria alimentaria por bacterias lácticas aisladas del intestino humano. A partir de entonces, se derivaron múltiples estudios que describen la reducción de colorantes azoicos por diferentes bacterias aisladas del tracto digestivo de mamíferos (McMullan et al., 2001; Stolz, 2001; Rau et al., 2002). Sin embargo estudios sobre la interacción como el reportado por Farah (2011) han demostrado que algunas bacterias de la microbiota intestinal y de la piel pueden degradar ciertos colorantes azoicos a compuestos tóxicos o carcinogénicos (Chung et al., 1992; Cerniglia et al., 1982; Raffi et al., 1992, Brown, 1992).

El papel de los microorganismos en la reducción de colorantes azoicos no solo se ha registrado en tintes alimenticios, varios grupos de investigación han demostrado recientemente la posibilidad de utilizar comunidades microbianas para la degradación de colorantes azoicos de las industrias textiles (Hu, 2001; Sponza, 2002).

Hassan y colaboradores (2007), llevaron a cabo el estudio de la capacidad de *Lactobacillus paracasei* para modificar tintes azoicos; Tartrazina, Rojo Allura y Amaranto, aislando bacterias ácido lácticas (BAL) de leche en polvo e identificadas por API 50 CHL Kit, estas fueron seleccionadas por su capacidad de modificar el color en la comida, el ensayo se realizó en condiciones anaeróbicas, inoculando en caldo MRS las bacterias ácido lácticas, y se incubaron a (0, 4, 24, 72) horas, a diferente pH (5,6, 7). Se concluyó que el colorante con mayor decoloración fue el amaranto a comparación de tartrazina y rojo 40, el tiempo óptimo para decolorar era de 24 horas, en condiciones óptimas de pH de 5. 6 y 8 a 37°C de temperatura, Hasan declara que existe una fragmentación reductora del enlace azo, capaz de producir aminas incoloras y señala que el aumento del pH hacia el intervalo alcalino puede ser atribuido a la acumulación de estas aminas aromáticas básicas y/o otros metabolitos (Hasan, 2007).

1.11 Estudios reportados del efecto del colorante en la salud

El rojo 40 es el colorante más utilizado en la industria alimentaria, y debido a implicaciones en la salud de los consumidores El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) ha realizado estudios para dar a conocer los aspectos metabólicos del rojo40.

En un estudio no publicado, ratas fueron alimentadas con 5,19% del colorante rojo 40 en sus dietas, 29% del colorante intacto se excreto en las heces mientras que sólo el 0,1% se excreto en la orina (White 1970).

En otro estudio, ratas y perros fueron pre-tratados diariamente con colorante rojo 40 marcado como ³⁵S-Red 40 hasta 72 horas. Dentro de las 72 horas, 92-95% y 76- 92% del colorante era recuperada en las heces fecales de perros y ratas, respectivamente. En el caso de la orina el colorante representó sólo el 5.7- 19.8% y 2.7- 3.6% de la dosis total en perros y ratas, respectivamente. Después del sacrificio de los animales se identificó una retención significativa del colorante en el intestino de ambas especies, esto se cree que es debido a la adherencia del compuesto a la pared intestinal, ya que la carcasa total, y vísceras de estos animales contenían menos de 0,4% de la dosis administrada (White 1970).

También se ha llevado a cabo el estudio de hipersensibilidad, donde 52 pacientes que sufrían de urticaria y angioedema durante más de 4

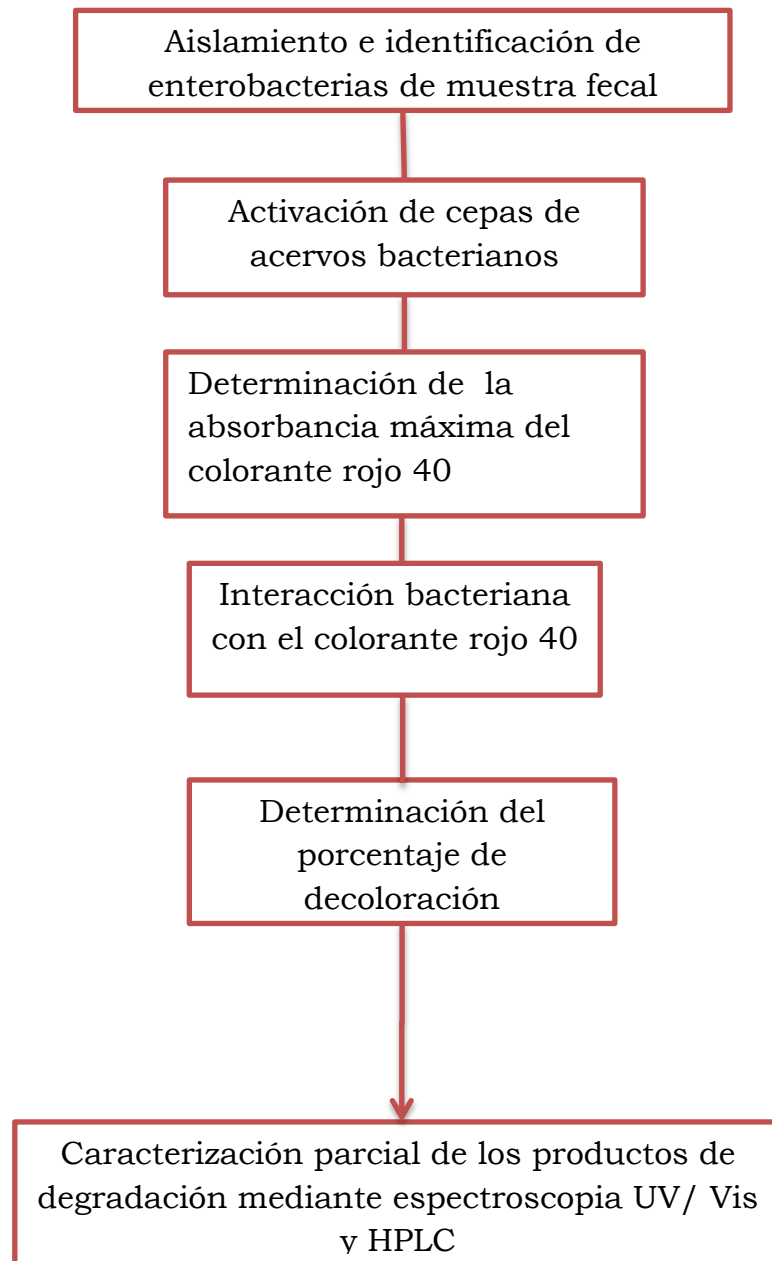
semanas, fueron sometidos a una dieta de eliminación del colorante, posteriormente durante 3 semanas, el colorante rojo 40 se administró por vía oral en dosis de 1 o 10 mg y se registró una reacción de hipersensibilidad en el 15% de los pacientes, que se encontraban libres de síntomas en el momento de la provocación (Mikkelsen, Larson *et al.* 1978).

Por otra parte en la década de 1970, Laboratorios Hazleton realizó un estudio de toxicidad y carcinogenicidad crónica en ratas y ratones, ambos incluían una fase *in útero*. Usando ratas de Sprague Dawley, la generación (F₀) incluyó 30 ratas / sexo / grupo al que se administró 0, 0.37, 1.39, y 5.19% de rojo 40 en su comida una semana antes de apareamiento, durante el apareamiento, la gestación y la lactancia. La generación 2 (F₁) incluía 50 ratas / sexo / grupo creado al azar por la descendencia sobreviviente. Las generaciones de F₀ y F₁ fueron expuestas a la mismos niveles de dosificación. Machos y hembras fueron expuestos por 118 y 121 semanas, respectivamente. No se informaron efectos relacionados con el compuesto durante el periodo de gestación y lactancia. Con la excepción de una disminución estadísticamente significativa en el peso corporal en hembras con dosis altas, los investigadores informaron efectos adversos consistentes debido a rojo 40. Establecieron un NOAEL (Nivel sin efecto (adverso) observado) de 5.19% (2.829 mg / kg / día) para los machos y 1.39% (901 mg / kg / día) para las hembras (Borzelleca, Olson *et al.* 1989).

Capítulo II

METODOLOGÍA

2.1 Diagrama del trabajo



2.2 Colorante

El colorante azo rojo 40 es utilizado en la industria alimentaria, la dosis permitida y utilizada en la elaboración de alimentos es de 50 a 300 ppm.

Para éste estudio, dicho colorante se adquirió en tiendas proveedoras de aditivos en la ciudad de Puebla y se utilizó en concentraciones de 30 y 50 ppm.

2.3 Obtención de enterobacterias: *Enterobacter sp.* y *Escherichia coli* de la microbiota intestinal infantil

Se realizó la toma de muestra fecal de una infante de 2 años y medio de edad bajos las recomendaciones descritas por Prats (2005) esta muestra fue transportada en medio Stuart para mantenerla fresca y se trabajó en un tiempo menor de 24 horas (Fig. 4).



Fig. 4 Medio Stuart con la muestra fecal

Para el aislamiento de enterobacterias a partir de la muestra fecal se sembró por duplicado con el hisopo de la muestra, por estría cruzada en agar Mac Conkey, verde brillante, EMB (Eosina-Azul de Metileno) y Lb (Luria Bertani) dejándolas incubar a 37°C durante 24 horas.

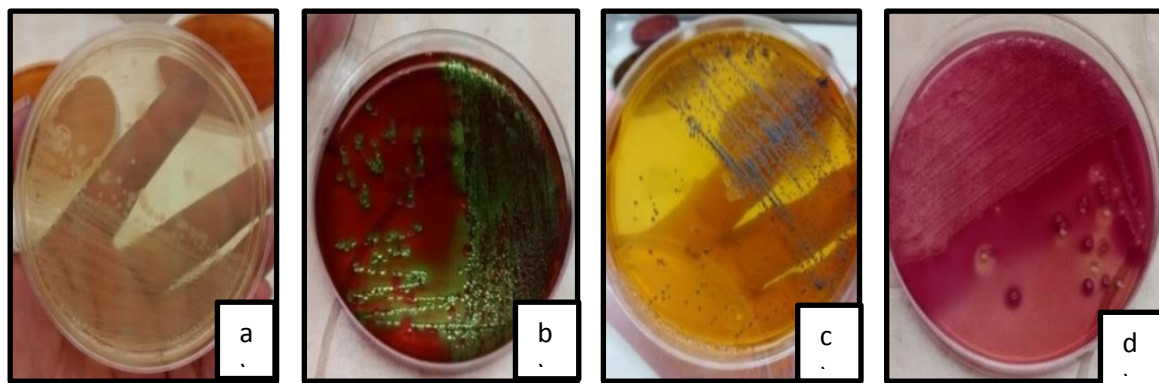


Fig. 5 Crecimiento de microorganismos en placas con agar a) Lb, b) EMB, c) verde brillante y d) Mac Conkey

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el aislamiento de colonias sospechosas y se identificaron mediante pruebas bioquímicas (Citrato, MIO, RM-VP, TSI, Lia) y tinción de Gram. Más tarde las cepas aisladas e identificadas se resguardaron mediante caldo Lb adicionado con glicerol a una temperatura de -70°C para su posterior uso. En la Fig. 5 se presenta el crecimiento de los microorganismos en los diferentes medios.

2.4 Cepas de laboratorio para comparar la interacción del colorante

Se activaron cepas del acervo bacteriano del laboratorio de Patogenicidad Microbiana del CICM-ICUAP (Tabla 1), bajo las siguientes condiciones, dichas cepas fueron sembradas mediante vertido directo en placas Petri con medio Lb y se incubaron para su crecimiento a 37°C por 24 h.

Tabla.1 Cepas que se emplearan durante la investigación

Cepas Tipo
<i>Escherichia coli</i> no patógena DH5-Alpha (DH5 α)
<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena (EPEC) E2348/69
<i>Citrobacter</i> sp
<i>Enterobacter</i> sp

En la fig. 6 se presentan las placas sembradas antes de ser incubadas.

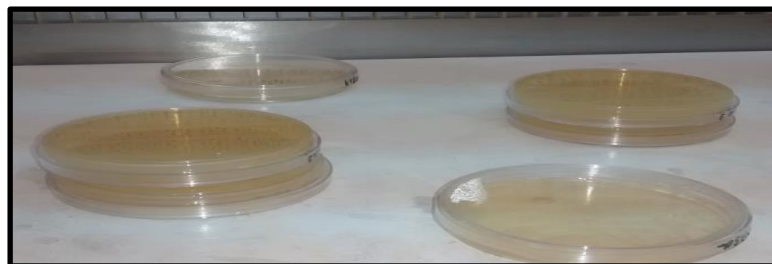


Fig. 6 Placas de agar Lb, sembradas con *E. coli* DH5 α , *E. coli* E2348/69, *Enterobacter* sp. y *Citrobacter* sp.

2.5 Interacción bacteriana con el colorante rojo 40

Cada una de las enterobacterias aisladas de la microflora intestinal y de las cepas pertenecientes al resguardo bacteriano se sometieron por triplicado a concentraciones de 30 y 50 ppm del colorante azo previamente esterilizado mediante filtración a 0.045 μ m Fig. 7, y se determinó por separado su porcentaje de degradación. Para ello se provocó un crecimiento microbiano en fase logarítmica, posteriormente se realizó una suspensión bacteriológica y se ajustó a una concentración de $1,5 \times 10^9$ UFC/ml en solución salina al 0.85%. Posteriormente se depositó un inóculo en un tubo con caldo nutritivo (1 g/l extracto de carne, 2 g/l extracto de levadura y 5 g/l NaCl) de (1:9) a un volumen final de 30 ml y con la preparación previa del colorante rojo 40 a concentraciones de 30 y 50 ppm, metodología descrita por Isik (2003), la interacción se realizó por triplicado y durante 10 días cada 24h se tomó lectura de la absorbancia del colorante Fig. 8.



Fig. 7 Esterilización del colorante rojo 40.



Fig. 8 a) Suspensión Bacteriológica, b) caldo nutritivo estéril, c) tubos inoculados con el colorante al inicio del estudio.

2.6 Determinación de la absorbancia máxima del colorante rojo 40

Para asegurar la calidad del colorante sintético rojo 40 se determinó la absorbancia máxima mediante espectroscopia UV/Vis realizando un barrido entre 400 y 800 nm de longitud de onda en una solución a 15 ppm del colorante.

2.7 Porcentaje de decoloración del colorante rojo 40

Conforme a lo descrito por Isik (2003) cada 24h en un tiempo de 10 días se tomó lectura espectrofotométrica de la absorbancia del colorante a la longitud de onda de máxima absorbancia del colorante rojo 40, para ello se tomó una alícuota del sobrenadante eliminando previamente el cultivo bacteriano centrifugando una muestra de 3ml del ensayo a 6000 rpm/10min, los resultados fueron ajustados de acuerdo al blanco que contenía el tinte sintético libre de microorganismos, adicionado con caldo nutritivo (Fig. 9).

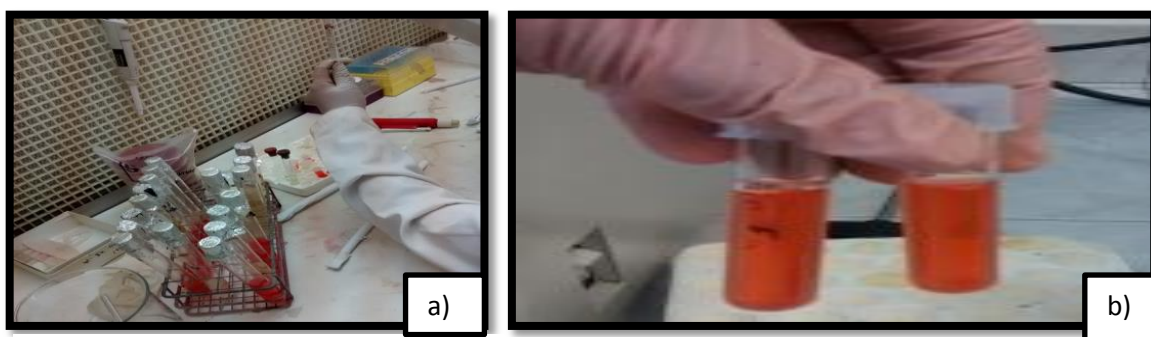


Fig. 9 a) Toma de muestra tras la interacción del colorante y la bacteria, b) tubos Eppendorff de 5ml con muestra de colorante y bacteria previamente centrifugada.

Para garantizar la presencia de la bacteria inoculada y evitar la contaminación cruzada, se tomó una asada de la muestra y se sembró en medio Mac Conkey, este procedimiento se repitió cada 24 horas. En caso de encontrar una contaminación doble el ensayo era repetido.

Con las lecturas de las absorbancias obtenidas durante los diez días de interacción de la bacteria con el colorante se calculó el porcentaje de degradación del colorante, a partir de las mediciones de absorbancias por la Ec. 1 Saratale et al (2011). Para ello se prepararon controles que tenían únicamente caldo nutrientes y colorante, el valor de su absorbancia fue considerada como la absorbancia inicial.

$$DC(\%) = \frac{D_i - D_f}{D_i} \times 100 \dots \text{Ec. 1}$$

Dónde: D_i es la absorbancia inicial y D_f la absorbancia final.

2.8 Caracterización parcial de los productos de degradación

2.8.1 Espectroscopia UV/Vis

Para la caracterización parcial de los productos de degradación entre el colorante rojo 40 y las cepas (*DH5a*, *Citrobacter sp*, *E.2348/69*, *Escherichia coli**, *Enterobacter**, *Enterobacter sp.*), se realizaron los espectros de absorción en la región UV/Vis para las concentraciones de 30 y 50 ppm, centrifugando previamente las muestras a 10 000 rpm durante 20 min, de la cual se tomó una alícuota de sobrenadante y se diluyó 1:20 con agua destilada, para el análisis de cada muestra se colocó en una celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz ajustando el equipo en un intervalo de longitud de onda de 190-400 nm, utilizando un espectrofotómetro de absorción Cary 50 Varian (Fig. 10). Para detectar cambios en las bandas de absorción se obtuvo en primer lugar el espectro del colorante mezclado con el caldo nutritivo al cual se le denominó control.

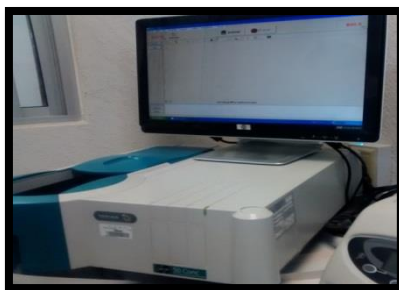


Fig. 10 Espectrofotómetro UV/Vis Cary 50 Varian

2.8.2 Cromatografía Liquida de alta eficiencia (HPLC)

Los productos de degradación del colorante rojo 40 a 30 ppm fueron caracterizados mediante un equipo HPLC marca Shimadzu Performance y utilizando una columna cromatográfica nucleogel® sugar 810H empleando como fase móvil una solución de ácido sulfúrico 5 mM /agua y un flujo de 0.65 ml/min (Fig. 11).

Se prepararon soluciones de 1-naftol a 0.051M, y se obtuvieron cromatogramas patrón con el tiempo de retención (T_R) significativo para el compuesto a los 285 y 315 nm de longitud de onda, de la misma manera una dilución de anilina y agua (1: 1000) a los 260 y 285 nm utilizando un tiempo de análisis de 20 minutos los cuales se utilizaron como referencia, a continuación se obtuvieron los cromatogramas del colorante más el medio de cultivo (control) y se procedió a trabajar las muestras a una dilución 1:10.



Fig.11 Equipo HPLC SHIMADZU PERFORMANCE

Capítulo III

RESULTADOS

3.1 Aislamiento e identificación de enterobacterias

En el aislamiento de microorganismos a partir de la muestra fecal del infante, en medios Mac Conkey, LB, Verde brillante y EMB se identificaron enterobacterias como: *Enterobacter sp.* y *Escherichia coli*. En la tabla 2 se encuentran los resultados de la identificación a partir de pruebas bioquímicas y la tinción de Gram. En la Fig. 12 se muestran las características coloniales de *Enterobacter sp.* aislada en placas de medio Mac Conkey. En la Fig. 13 se muestran las características coloniales de *Escherichia coli* aisladas en medio Mac Conkey y EMB.

Tabla 2. Resultado de las pruebas bioquímicas de las colonias aisladas en medio Mac Conkey y EMB

	Pruebas bioquímicas								Tinción de Gram	Género
	TSI	Mov	Indol	ORN	Cit	RM	VP	Lia		
Col 1	A/A	+	+	D	-	+	-	+	-	<i>Escherichia coli</i>
Col 2	A/A	+	-	+	-	+	-	+	-	<i>Enterobacter</i>



Fig. 12 Agar Mac Conkey donde se observa el crecimiento de *Enterobacter sp.*

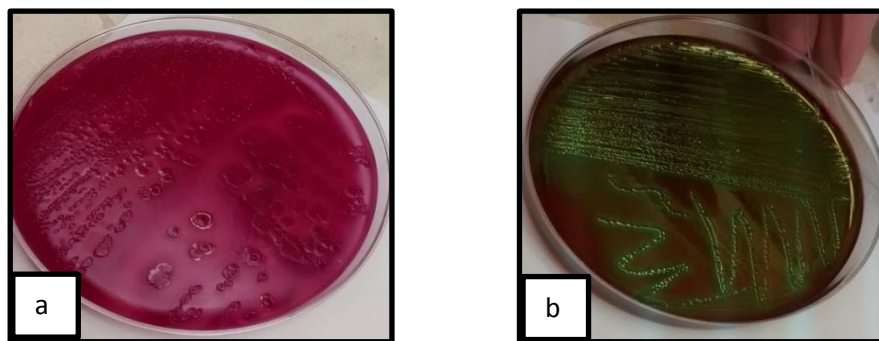


Fig. 13 a) Crecimiento de *E. coli* en agar Mac Conkey, las colonias son medianas, circulares y su coloración es rosa intenso, b) crecimiento de *E.coli* en medio EMB, coloración verde metálico.

3.2 Colorante

Después de la adquisición del colorante se realizó un barrido de onda región visible, la absorbancia máxima del colorante rojo 40 obtenida en el espectrofotómetro UV- Visible resulto de 504.3 nm dato que coincide con la ficha técnica del rojo 40 de la FD&C (Food Drug and Cosmetic) y nos confirma la pureza del producto utilizado durante la investigación. En la Fig. 14 se presenta el espectro característico del colorante rojo 40 en la región visible, donde la absorbancia máxima es de 0.58 abs a 504.3 nm de longitud de onda.

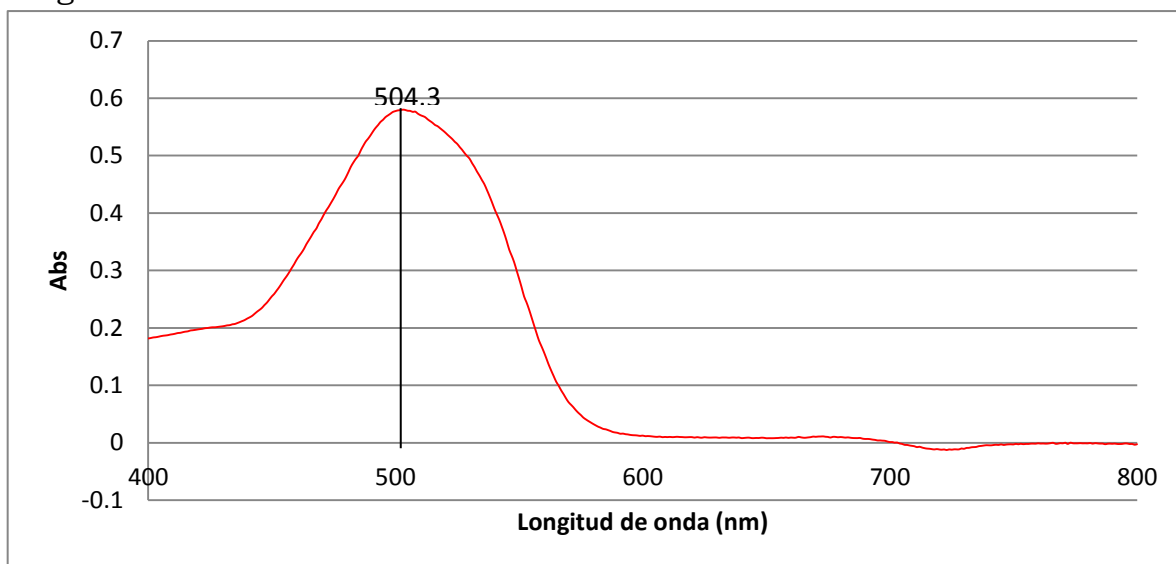


Fig. 14 Espectro de absorción del rojo 40 en la región visible, absorbancia máxima de 0.58 abs

3.3 Interacción del colorante Rojo 40 con las cepas de estudio

3.3.1 Determinación de absorbancias a 30 ppm del colorante rojo 40

Como se indicó en la metodología, se realizó la medición de las absorbancias de la interacción de las bacterias con el colorante a diferentes concentraciones 30 y 50 ppm, en la tabla 3 se muestran las absorbancias obtenidas de cada 24 horas en el ensayo de interacción con el colorante rojo 40 a 30 ppm con: *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia E2348/69*, *Escherichia DH5a*. Para *Enterobacter sp.*, aislada de la muestra fecal, la absorbancia inicial es de 1.3315 midiendo a 504.3 nm de longitud de onda, y presenta un decremento de 0.3015 al primer día de la interacción, 24 horas después de la medición solo presenta un ligero decremento de 0.018, para los posteriores días de la interacción la absorbancia va disminuyendo hasta el día cuatro obteniendo 0,6935 abs, sin embargo al día 5 presenta un ligero incremento en la absorbancia y vuelve a disminuir hasta alcanzar valores cercanos a 0.5 en los próximos tres días, el decremento continua hasta alcanzar un valor final de 0.461 al décimo día de la interacción.

Para *Escherichia coli** a 30 ppm, esta presenta una absorbancia inicial de 1.3315, esta última disminuye 0.2865 después de 24 horas de la interacción, los días posteriores hasta el tiempo cuatro la disminución del valor de la absorbancia se encuentra oscilando entre 0.1 y 0.1805, ya que se presenta un leve incremento en el día quinto, posteriormente vuelve a disminuir y en el penúltimo y ultimo día los valores ascienden con valores muy pequeños alcanzado una absorbancia final de 0.674.

En el caso de *Citrobacter sp.*, al igual que en las anteriores el blanco inicial fue de 1.3315, al primer día de la interacción la absorbancia decremento 0.4 abs, *Citrobacter sp.* posteriormente también presenta un decremento en sus absorbancias, ya que de 1.3315 desciende hasta llegar a 0.246 en su absorbancia final, sin embargo durante la interacción también se presentaron ligeros incrementos; en los días cinco y nueve ya que su absorbancia asciende aproximadamente 0.15 en sus días posteriores respectivamente.

En la Tabla 3 también se encuentran registrados los valores de las absorbancias de la interacción de las cepas provenientes del laboratorio; *Enterobacter sp.* inoculada a 30 ppm presento al primer tiempo de la interacción un decremento de 0.230 en la medición inicial, posteriormente

la absorbancia asciende y entre los días cuatro y cinco la absorbancia registrada se encontró oscilando en un rango de 0.655 y 0.686, 24 horas más tarde de la medición la absorbancia presentó un ligero incremento hasta alcanzar 0.70 y descendió a 0.5475 al concluir con el tiempo de interacción. Todas las bacterias obtuvieron una diferencia significativa en su absorbancia final comparada con la inicial.

Para la *Escherichia E2348/69* (EPEC), la absorbancia disminuía en valores más altos después de la inoculación, en el tiempo uno presento un decremento inicial de 0.2815, en los tres días posteriores la absorbancia medida descendió hasta 0.6335, pero para el día intermedio de la interacción se presentó un ligeros incremento de las absorbancias de 0.468 a 0.5685, posteriormente valores de las absorbancia disminuían oscilando en valores pequeños hasta llegar a 0.3235 en su absorbancia final.

El comportamiento de *Escherichia DH5a* según sus absorbancias a 30 ppm al primer día de interacción desciende de 1.3315 a 1.048 Abs, la media de la absorbancia decremento en un intervalo de 0.1 a 0.4 entre los tres días posteriores a la inoculación, ya que del tiempo cuatro para el cinco también se presenta un incremento ligero en su absorbancia de 0.373 a 0.4475, posteriormente los demás días la absorbancia se encontró entre un rango de 0.2, y se obtiene al finalizar el ensayo un valor de 0.221.

Tabla 3. Absorbancias registradas durante la interacción con el colorante a 30ppm

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Enterobacter*</i>	1.3315	1.03	1.012	0.7125	0.6935	0.72	0.5725	0.534	0.5305	0.461
<i>E.coli*</i>	1.3315	1.0455	0.9725	0.943	0.7625	0.8325	0.702	0.6135	0.672	0.674
<i>Citrobacter sp</i>	1.3315	0.9365	0.8495	0.5055	0.2175	0.3675	0.268	0.2205	0.17	0.246
<i>Enterobacter sp</i>	1.3315	1.105	0.9535	0.6555	0.697	0.686	0.7015	0.685	0.5915	0.5475
<i>E.234869 (EPEC)</i>	1.3315	1.05	0.906	0.6335	0.468	0.5685	0.3715	0.364	0.3085	0.3235
<i>DH5α</i>	1.3315	1.048	0.9645	0.5935	0.373	0.4475	0.2775	0.253	0.269	0.221

EPEC- Enteropatógena

*cepa aislada de la muestra fecal

3.3.2 Porcentaje de decoloración a 30 ppm del colorante rojo 40

Siguiendo la ec. 1 de Saratel (2001) se llevó a cabo el cálculo del porcentaje de decoloración por la enterobacterias empleadas en la investigación. En Fig. 15 se muestra la comparación de los porcentajes de decoloración por las diferentes bacterias a 30 ppm del colorante, como se puede observar *DH5α* presenta el mayor porcentaje de decoloración con un 83.2%, obteniendo una decoloración del 20 % al primer día de la interacción, el porcentaje de decoloración aumenta hasta alcanzar un 70 % al quinto día, sin embargo este porcentaje no se mantiene constante y durante el sexto día el porcentaje de decoloración es menor que el día anterior, posteriormente *DH5α* alcanza un 80 % y finaliza con un 83.2 %.

Para el caso de *Citrobacter sp.*, el porcentaje de decoloración es mayor en la primera fase de la incubación, al primer día este presenta una decoloración de 30 % posteriormente el porcentaje incrementa en valores de 7 % y en la fase intermedia del día cuatro a cinco el incremento es de un 20 %, *Citrobacter sp.* presenta un porcentaje menor de decoloración en el día 6 con un 10 % menos que el anterior, sin embargo en los tres posteriores días el decremento de la coloración continua y el porcentaje de decoloración aumenta, y oscila entre un 80 y 82%.

Enterobacter sp de las cepas tipo, al primer día de la inoculación presenta un porcentaje de decoloración mayor al 20 % y este se mantiene casi constante al tercer día, al cuarto día presenta un aumento en el porcentaje de decoloración con casi un 45 %, durante esta fase intermedia el porcentaje de decoloración oscila entre 40 y 50 %, obteniendo un ligero decremento en el día seis, posteriormente se suma un 10 % en la decoloración obtenido por *Enterobacter sp.* y también se mantiene casi constante, al finalizar el ensayo esta obtiene una degradación de un 65%.

Las colonias aisladas de la muestra fecal también se encuentran registradas en la misma gráfica, como se puede observar para *Enterobacter sp.** el porcentaje de coloración inicial es de menos de 20 %, y el incremento en la decoloración es un 14 % mayor que del día anterior en los tiempos posteriores. Al cuarto día la decoloración asciende hasta un 50% pero disminuye un 3 % y se mantiene casi constante hasta la fase final ya que la decoloración aumenta hasta alcanzar un 60%.

Para *Escherichia coli** al día uno el porcentaje de decoloración también corresponde a un 20 %, durante la primera fase el aumento del porcentaje es de 4 % por día, en la fase intermedia el incremento de decoloración es de 45 % pero desciende a un 40 % en el día seis después de la interacción, posteriormente vuelve a incrementar el porcentaje de degradación, pero solo logra finalizar con un 49 %, siendo esta la que menor degrada al colorante rojo 40.

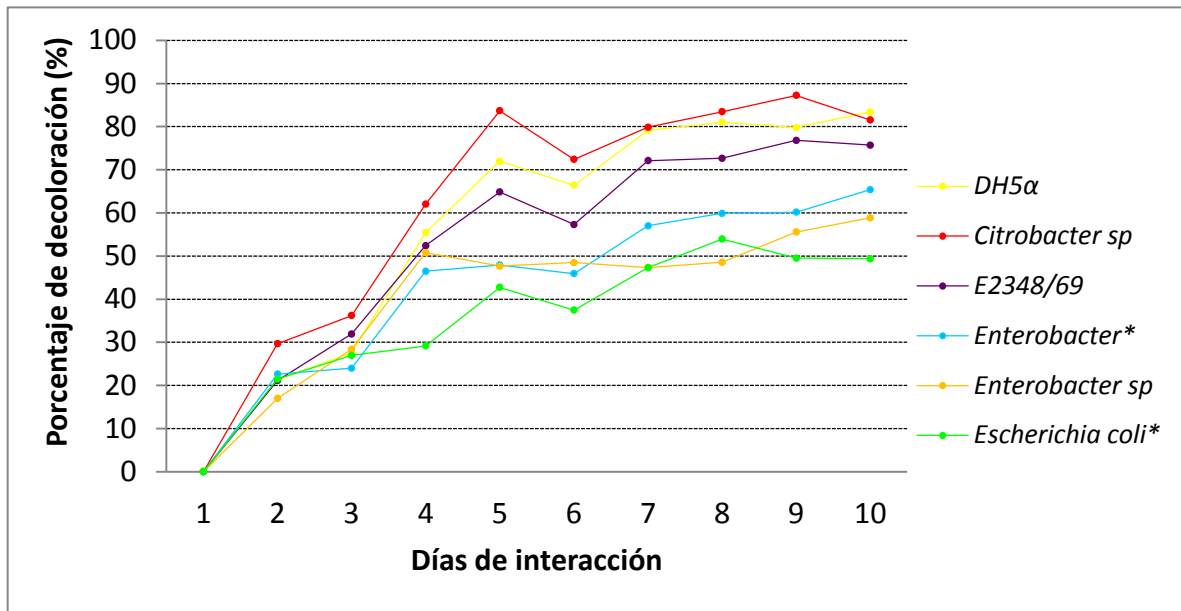


Fig. 15 Comparación del porcentaje de decoloración del rojo 40 a 30 ppm por las diferentes cepas de estudio.

Durante la interacción de las enterobacterias y el colorante a 30 ppm, estas fueron capaces de decolorar en porcentajes mayores al 40% sin embargo ninguna obtuvo una decoloración completa, ya que el valor máximo obtenido fue de 83.4 %. Durante la decoloración se encontraban ascensos y descensos de las absorbancias, estas fueron evidenciadas también en el cálculo del porcentaje de decoloración, en la Fig. 16 se muestran los tubos con colorante a 30 ppm inoculados con diferente bacteria después de la interacción de 10 días. Como se puede observar las bacterias que mejor decoloraron fueron *DH5α*, *Citrobacter sp* y *E.2348/69*, estas presentan la mayor disminución de color comparada con las demás, estas presentan ausencia de color rojo, la *Enterobacter sp.*, *Enterobacter** y

la *Escherichia coli* son las que presentan menor decoloración, por lo que en la imagen se puede ver la presencia del color en tonos más fuertes que el comparado con las bacterias de laboratorio.

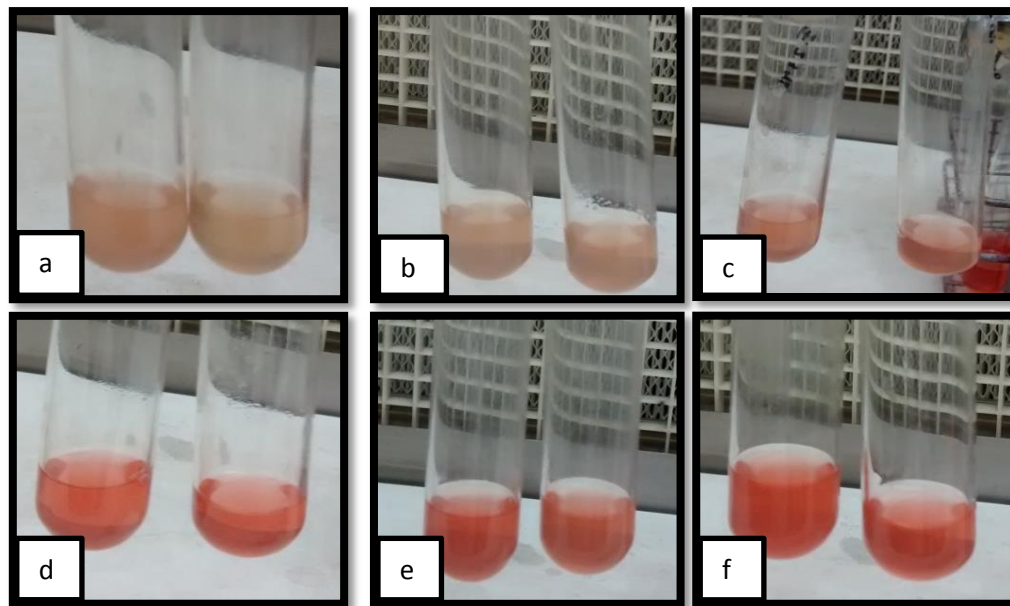


Fig. 16 Decoloración del rojo 40 con diferente bacteria; a) *DH5α*, b) *Citrobacter sp.*, c) *E2348/69*, d) *Enterobacter sp.*, e) *Enterobacter**, f) *Escherichia coli **

3.3.3 Determinación de absorbancias a 50 ppm del colorante rojo 40

En la tabla 4 se encuentran las medias de las absorbancias registradas en un periodo de 10 días de interacción, para las bacterias aisladas de la muestra fecal, *Enterobacter* y *Escherichia coli*, la absorbancia del control era de 1.6, en el caso de *Enterobacter sp.* esta decoloraba en proporciones menores, a los primeros dos días de interacción la absorbancia obtenida era de 0.02 menos que la inicial, posteriormente en la fase media entre los días cuatro y seis decremento de 1.293 a 1.086, pero en el día siete de la interacción presento un ligero incremento en la absorbancia, este no se mantuvo y durante la interacción la absorbancia decremento hasta alcanzar 1.039.

*Escherichia coli** presenta un decremento al primer día de inoculación de 0.002 en su absorbancia, en los días posteriores este sigue descendiendo, pero al cuarto día presenta un ligero incremento de 1.179 a 1.327, en los días siguientes de la interacción el decremento de la absorbancia es en menos proporciones, *Escherichia coli** decremento aproximadamente en

0.1 por día en sus absorbancias, así hasta el penúltimo día que ligeramente presenta una alza en la absorbancia y vuelve a descender hasta alcanzar 0.914. Durante la interacción también se llevó a cabo la medición de las cepas obtenidas del laboratorio.

Para *Citrobacter sp.* el valor de la absorbancia inicial del tubo sin suspensión bacteriana fue de 1.96, tras 24 horas de interacción la absorbancia registrada era de 1.7135, después del primer día de la interacción las absorbancias registradas presentaban alrededor de 0.2 décimas menos al valor del día anterior, esta misma diferencia se observaba hasta el cuarto día, ya que 24 horas después la disminución de la absorbancia por *Citrobacter sp.* es de 0.644 obteniendo aproximadamente una tercera parte de la absorbancia inicial, esta bacteria era capaz de disminuir en la absorbancia de manera muy significativa pues al día seis la absorbancia era de 0.1905, en la fase final de esta interacción la absorbancia se encontraba en un rango de 0.1105.

En el caso de *Enterobacter sp.* el decremento en la absorbancia al primer tiempo era de 0.2 menos que la inicial, 24 horas más tarde el valor registrado disminuyó y se obtuvo 1.6525, durante el monitoreo la absorbancia descendió de 1.2725 a 1.04145 en el cuarto día, ya que durante los dos días posteriores esta permanecía casi constante en un valor de 0.9, más adelante la absorbancia de la interacción con *Enterobacter sp.* a 50 ppm fue a la baja obteniendo en el penúltimo y ultimo día valores de 0.48.

En la tabla 4 la absorbancia inicial para las bacterias de laboratorio *EPEC* y *DH5a* fue de 1.961. E2348/69 obtuvo 1.836, y en los tres días siguientes de la interacción la absorbancia se encontraba casi constante con valores cercanos a 1.6, 24 horas después el valor descendió hasta 1.4245, sin embargo presento un incremento en su absorbancia en el día siete, finalmente la absorbancia descendió hasta obtener 0.308. Para el caso de *DH5a* durante el primer y segundo día de interacción el valor descendió y se mantenía casi constante en valores cercanos de 1.8, posteriormente descendió aproximadamente 0.3 por día hasta el día seis obteniendo 0.88, después de 24 horas el valor ascendió ligeramente hasta alcanzar 0.959, este valor no se mantuvo y en los siguientes dos días descendió a 0.6875 en su absorbancia final.

Tabla 4. Absorbancias registradas durante la interacción con el colorante a 50ppm

Tiempo	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Enterobacter</i> *	1.6	1.5745	1.587	1.259	1.293	1.169	1.086	1.1555	1.1395	1.039
<i>Escherichia coli</i> *	1.6	1.5835	1.441	1.179	1.327	1.2595	1.1215	1.0375	1.0775	0.914
<i>Citrobacter sp</i>	1.96	1.7135	1.547	1.4315	1.2455	0.644	0.1905	0.1565	0.119	0.1105
<i>Enterobacter sp</i>	1.96	1.779	1.6525	1.2725	1.0145	0.9925	0.9635	0.515	0.4845	0.486
<i>E.234869 (EPEC)</i>	1.961	1.836	1.6535	1.636	1.605	1.4245	1.5925	1.3525	0.8215	0.308
<i>DH5α</i>	1.961	1.869	1.851	1.7815	1.431	1.1315	0.88	0.959	0.8985	0.6875

EPEC- Enteropatógena

*cepa aislada de la muestra fecal

Durante el monitoreo de las absorbancias se tuvo absoluto cuidado en evitar la contaminación de las muestras inoculadas para obtener un resultado positivo, a 50 ppm del colorante rojo 40 las absorbancias disminuían en valores cortos, la bacteria que obtuvo la absorbancia más baja fue *Citrobacter sp.* con un 0.1105 seguida de la *EPEC* con un 0.308.

De la misma manera que en la concentración de 30 ppm, con las absorbancias obtenidas y la ec. de Saratel se obtuvieron los porcentajes de decoloración, estos fueron comparados con el control de 50 ppm que únicamente contenía el colorante en el medio de nutrientes utilizado para el ensayo. En la Fig. 17 se muestra la comparación de los porcentajes de decoloración por cada una de las cepas empleadas en este estudio. En el caso de las bacterias tipo, *Citrobacter sp.* obtiene un incremento en el porcentaje al decolorar con mayor capacidad el colorante rojo 40, durante los primeros cinco días de interacción *Citrobacter sp.* tiene un ascenso en la decoloración de 8-10 % por día hasta obtener 36.31 %, posteriormente presenta un incremento mayor de 40 % más que en el cuarto día, y al día sexto de la interacción *Citrobacter sp.* decoloró hasta un 90 % del colorante rojo 40, para los posteriores días hasta el final de la interacción el porcentaje de decoloración se mantiene oscilando entre valores de 90 y 95 %. Seguida de *Citrobacter sp.* está la *EPEC*, esta bacteria presenta un ascenso en la decoloración el colorante muy variante durante la interacción, en los primeros cinco días el valor de la degradación se encuentra en porcentajes menores a 30 % ascendiendo durante la interacción, sin embargo 24 horas más tarde la degradación se ve desfavorecida y se presenta un decremento de casi 10% , a partir de este

tiempo, la decoloración presenta valores más significativos ya que decolora en mayores porcentajes obteniendo por día aproximadamente 20 % más que en la anterior hasta obtener un porcentaje de 84.2 %.

En el caso de *Enterobacter sp.* durante la primera fase de la interacción presenta un incremento en la decoloración hasta un 35%, posteriormente durante los días cuatro, cinco y seis, el valor de decoloración se mantiene casi constante oscilando en un rango de 48 y 50%, incrementando en el porcentaje obteniendo en el día siete un 72%, durante la fase final, los valores del porcentaje se encuentran en un 75 %.

Todas las cepas presentan comportamientos diferentes y se evidencio que existía únicamente su presencia durante la interacción del colorante. *DH5a* también usada en la investigación presento una decoloración de 10 % durante los primeros tres días, dos días posteriores estos valores se mantenían casi constantes e incremento un 10 % al día seis, también presento un ligero ascenso con 4% menos, y al finalizar el ensayo obtuvo un 64.94%.

Para el caso de la muestra fecal, *Escherichia coli** incrementa la decoloración en la primera fase hasta un 28 %, pero 24 horas más tarde presenta un decremento obteniendo un porcentaje de decoloración de 19 % posteriormente del día cuatro al siete el porcentaje de decoloración asciende y obtiene un 35 %, antes de concluir con la interacción vuelve a presentar un ligero descenso en el porcentaje en el día ocho y obtiene al final un 42% en el porcentaje de decoloración.

Enterobacter sp aislada de la muestra fecal presento el menor porcentaje de decoloración con un valor de 35 %, durante los primeros días *Enterobacter** decoloró en valores menores al 2%, posteriormente incremento hasta un 20 % y durante la fase intermedia del ensayo los valores de decoloración se encontraban entre un 20 y un 30%, posteriormente en el día siete y ocho baja el porcentaje a 32 %, un 27 y 28% respectivamente.

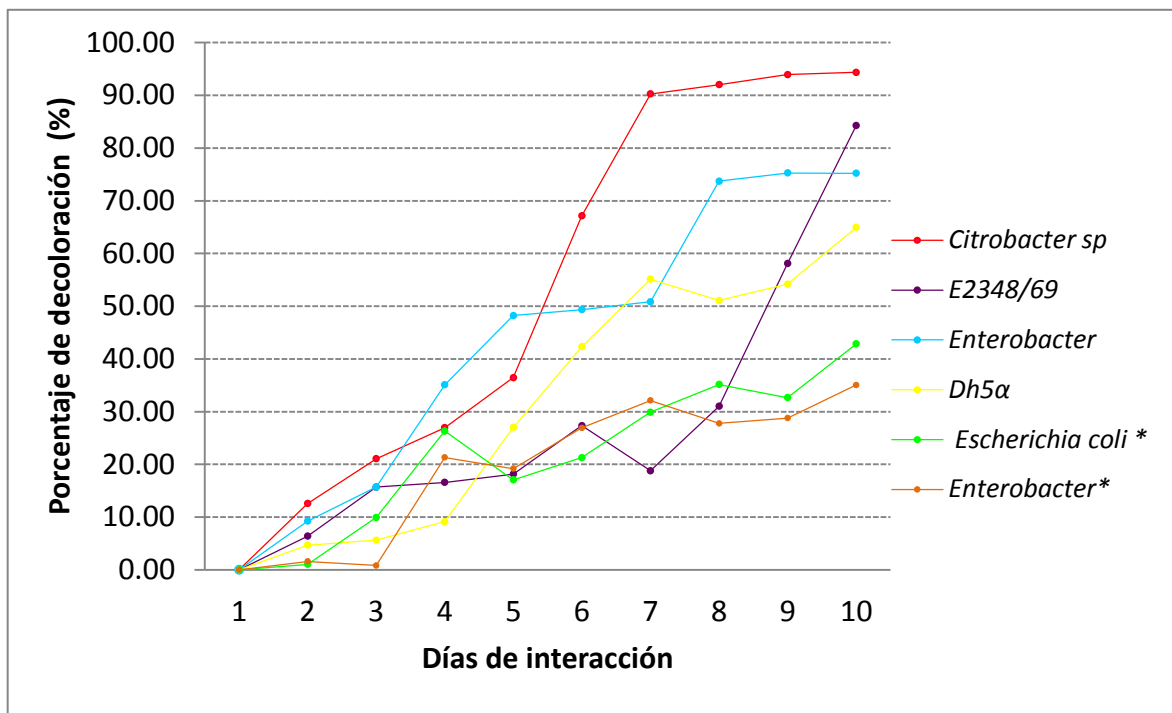


Fig. 17 Comparación del porcentaje de decoloración del rojo 40 a 50 ppm por las diferentes cepas de estudio.

A 50 ppm las bacterias decoloran el rojo 40 con menor facilidad a los primeros días de interacción, estas presentan diferentes porcentajes de decoloración ya que se comportan de manera distinta ante el colorante. En la Fig. 18, las bacterias del acervo bacteriano fueron capaces de decolorar en mayor porcentaje que las aisladas de la muestra fecal.

En la Fig. 18, se presenta el proceso de decoloración durante cuatro días registrados, en la Fig. 18a las muestras son del día que fue inoculada la bacteria y el colorante, la Fig. 18b presenta una decoloración registrada al tercer día de la interacción, en la Fig. 18c se muestran los tubos al sexto día de la interacción presentando una disminución en el color, en la Fig. 18d, las muestras presentan una decoloración mayor al décimo día de la interacción. Durante el monitoreo de las absorbancias se realizaron siembras de los tubos en agar Mac Conkey los cuales evidenciaban que no había contaminación durante el proceso de decoloración Fig. 19.

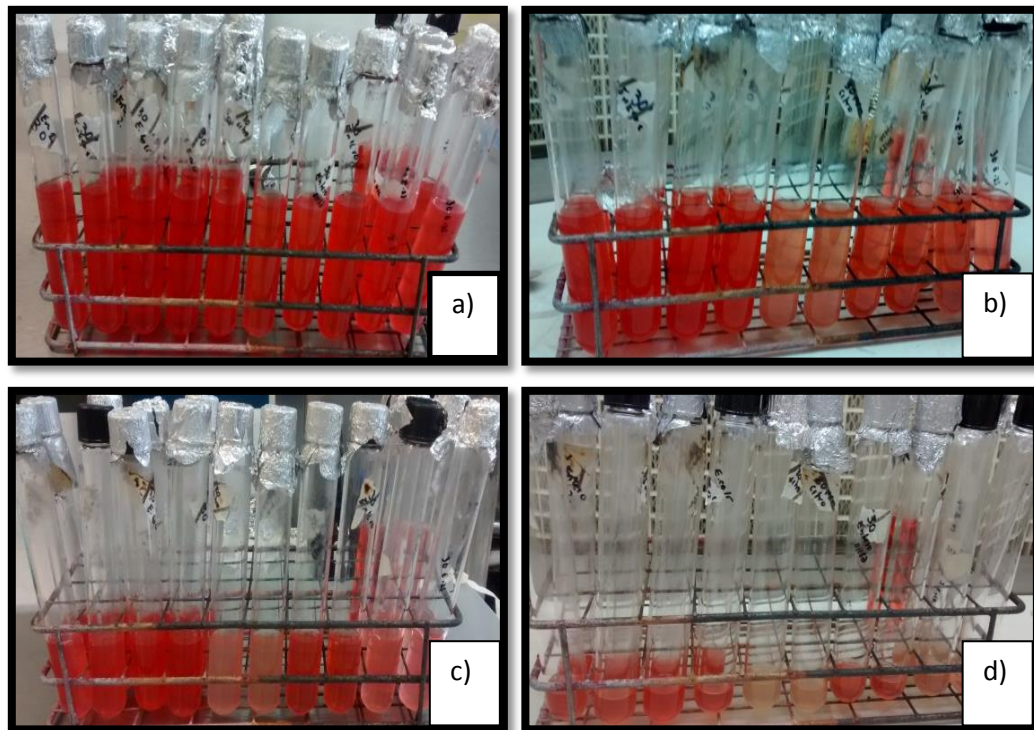


Fig. 18 Tubos inoculados con bacteria a 30 y 50 ppm a) día cero, b) día tres, c) día seis y d) día diez.

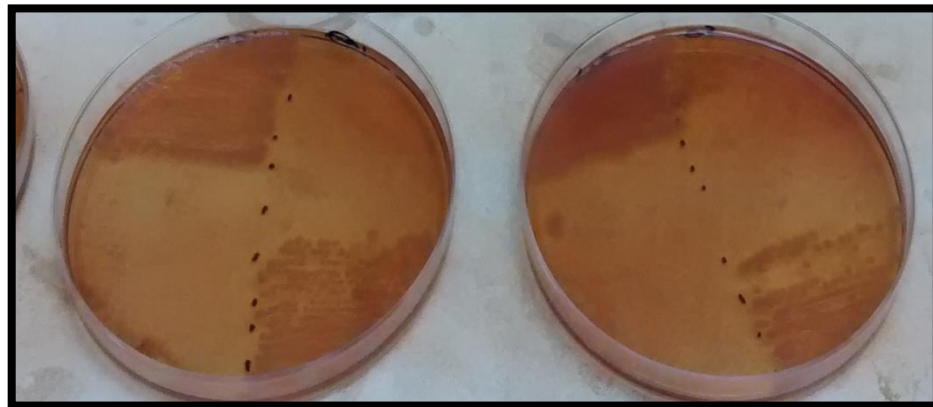


Fig. 19 Recuperación bacteriana en el momento de la interacción, donde se garantiza su permanencia y crecimiento con otros microorganismos.

3.4 Caracterización parcial de los productos de degradación

3.4.1 Espectroscopia UV/Vis

El colorante rojo 40 a 30 ppm después del proceso de fermentación con las diferentes bacterias se observó cambios en el espectro UV/Vis con respecto al espectro obtenido del colorante con el caldo nutritivo. Después del tratamiento el espectro en la región Ultravioleta va por arriba del espectro sin tratamiento y entre los 283 y 296.98 hay disminución en la absorbancia hacia niveles de mayor energía. (Tabla 5 y Fig 20 y 21)

Tabla 5. Longitudes de onda (nm) durante la intersección con el control rojo 40

	30 ppm	50 ppm		
	Intersección	Intersección		
<i>Cepa</i>	1era	1era	2da	3ra
<i>Escherichia coli DH5α</i>	283.94	280.97	241.99	
<i>Citrobacter sp</i>	291.01	275.008	247.01	230.08
<i>Escherichia coli E2348/69</i>	291.01	282.02	241.05	
<i>Enterobacter sp *</i>	293.04	293.07		
<i>Enterobacter sp</i>	291.95	280.03	246.06	233.05
<i>Escherichia coli</i>	293.044	294.006		

El comportamiento espectroscópico nos indica que hubo una transformación con la formación de productos de degradación en la región ultravioleta del espectro electromagnético.

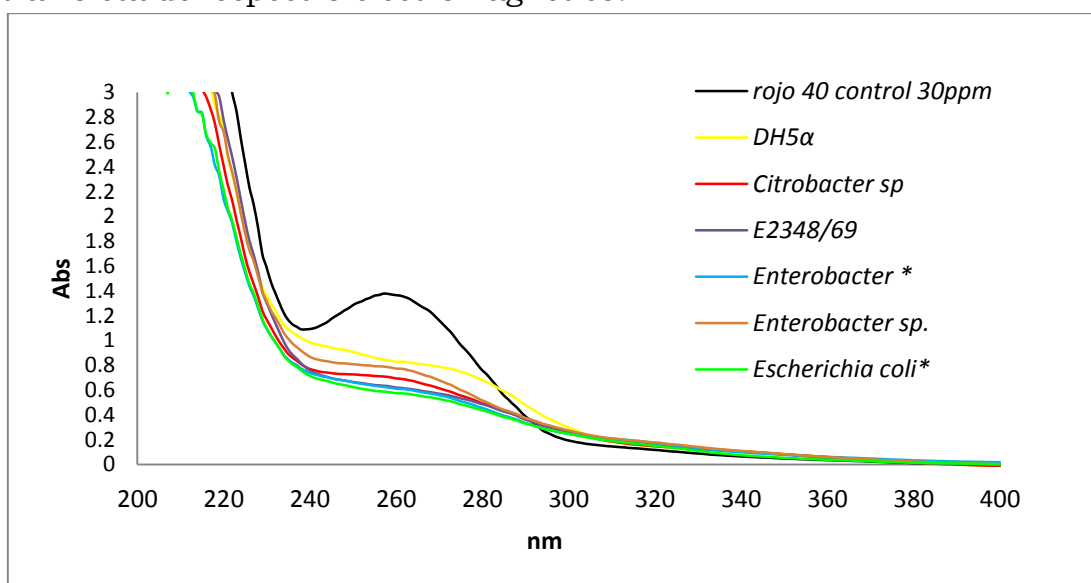


Fig. 20 Espectro de absorción UV/Vis del rojo 40 con la intersección de las muestras a 30 ppm.

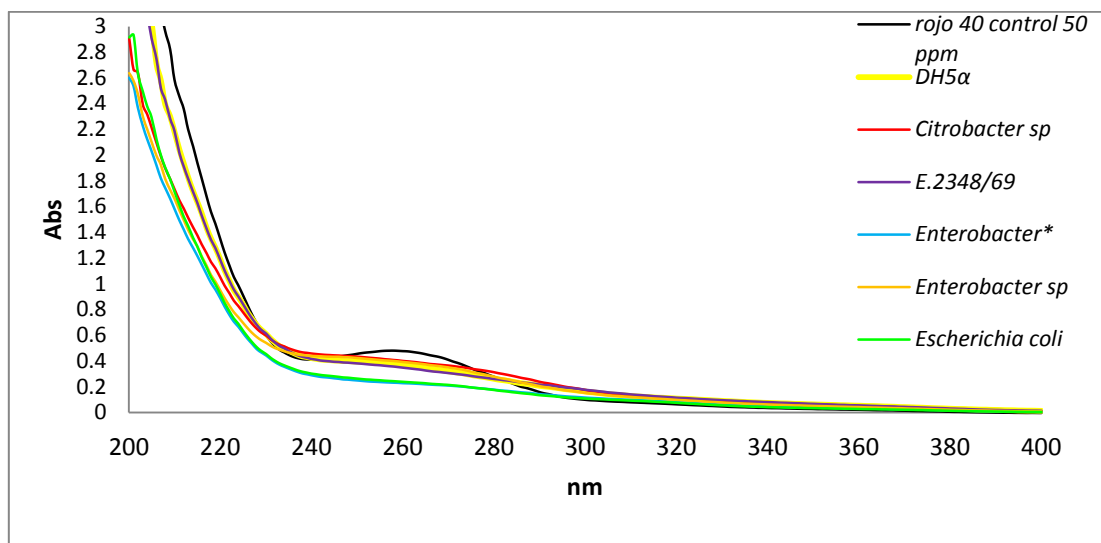


Fig.21 Espectro de Absorción UV/Vis del rojo 40 con la intersección de las muestras a 50 ppm.

3.4.2 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)

Los tiempos de retención obtenidos mediante HPLC para el control 1-Naftol fueron a los 5.585 y 5.816 minutos a una longitud de onda 285 nm y de 5.591 minutos a los 315 nm (Fig. 23 a 30, apéndice A)

Tabla 6. Tiempos de retención significativos para las muestras obtenidas por las bacterias y el estándar 1- naftol

Muestra	285 nm	315 nm
	T _R (min)	T _R (min)
rojo 40	2.643	2.704
	5.545	5.545
	5.667	5.676
	12.038	
Estándar (1-Naftol)	5.585	5.591
	5.816	
<i>Escherichia coli</i> DH5α	5.599	5.595
<i>Escherichia coli</i> E2348/69	5.573	5.551
<i>Citrobacter sp</i>	5.591	5.591
<i>Enterobacter sp</i> *	5.559	5.553
<i>Escherichia coli</i> *	5.553	5.548
<i>Enterobacter sp</i>	5.522	5.595
	12.28	

En la tabla 6 se presentan los tiempos de retención (T_R) significativos para cada muestra analizada tomando como referencia al 1- naftol. En los resultados para *Citrobacter sp.* se observó un desplazamiento de bandas con respecto al medio con colorante, acercándose al valor obtenido con el 1-Naftol a los 285 nm y coincidiendo con una de las bandas a los 315 nm (Fig. 31 y 32 apéndice A). En los cromatogramas del medio con colorante con respecto a *Escherichia coli DH5a* (Fig. 35 y 36 apéndice A), se aprecian algunas diferencias y existe similitud con respecto al cromatograma del 1-naftol a los 5.599 minutos a 285 nm y a los 5.595 minutos a los 315 nm. Para *Enterobacter sp* (Fig. 38 de apéndice A) aislada de la microbiota intestinal con respecto a los del medio con colorante son diferentes, acercándose a los valores obtenidos para el 1-naftol a los 5.559 minutos a los 285 nm y a los 5.553 a los 315 nm. Para la muestra de *Escherichia coli* de la microbiota intestinal (Fig.40 apéndice A) se identifican ligeros cambios siendo el más evidente la transformación de los productos de la banda a 2.704 del medio con colorante. El cromatograma del medio con colorante presento una banda a los 12.028 minutos, la cual ya no apareció en el de la muestra de *Enterobacter sp.* del acervo bacteriológico a los 285 nm. Con respecto a los 315 nm hay similitudes entre los cromatogramas de la muestra de *Enterobacter sp* y el 1-naftol a los 5.595 minutos y la banda de 2.704 del medio con colorante ya no aparecen. La muestra de *Escherichia E2348/69* (Fig. 42 apéndice A) tuvo un desplazamiento hacia los 5.573 acercándose al valor del 1-naftol determinados a 285 nm con respecto a los 315 nm se determinó que hay diferencias entre los cromatogramas del colorante con medio con respecto a la de la muestra.

En la Tabla 7 se encuentran los tiempos de retención (T_R) de las muestras comparándolas con los de la anilina. En los tiempos de retención para la anilina, con respecto a *Citrobacter sp* se encontró semejanza a los 5.554 minutos a los 260 nm y a los 5.578 a 285 nm además apareció una nueva banda a los 12.09 (Fig. 33 y 34 apéndice A.) Lo que es evidente, es que los cromatogramas del medio con colorante respecto a la muestra son diferentes. Los cromatogramas del medio con colorante y *Escherichia coli DH5a* son diferentes y se aprecia similitud con el de la anilina a los 5.573 minutos a los 260 nm (Fig. 37 del apéndice A). Se observa gran similitud entre los cromatogramas de *Enterobacter sp* de la microbiota y el de la anilina a los 260 nm, a los 285 nm hay similitud a los 4.134 minutos (Fig.39 apéndice A). El cromatograma del medio con colorante es

completamente diferente a la de *Escherichia coli* de la microbiota a los 260 nm y se encuentran similitudes importantes con la anilina (Fig. 41 apéndice A).

Tabla 7. Tiempos de retención significativos para las muestras obtenidas por las bacterias y el estándar anilina

Muestra	260 nm	285 nm
	T _R (min)	T _R (min)
rojo 40	2.411	2.413
	4.691	4.545
	8.251	8.226
	12.053	
Estándar Anilina	3.145	4.093
	4.089	5.586
	5.581	
<i>Escherichia coli</i> DH5α	3.425	5.586
	5.573	
<i>Escherichia coli</i> E2348/69	4.127	4.13
	5.564	5.591
<i>Citrobacter</i> sp	5.554	4.882
		5.578
<i>Enterobacter</i> sp*	4.132	4.134
	5.538	5.56
<i>Escherichia coli</i> *	3.306	5.591
	5.537	
<i>Enterobacter</i> sp	5.336	5.548

El cromatograma de *Enterobacter* sp. del acervo bacteriano presenta similitudes con el de la anilina a los 260 nm y es muy diferente al del medio con colorante y a los 285 nm la banda de 8.226 ya no aparece (Fig.42 del apéndice A). Los cromatogramas de *Escherichia coli* E2349/69 con respecto al medio con colorante son diferentes resaltando la aparición de una nueva banda a partir de los 14.98 min para los 260 nm.

Para todas las muestras, aparecen los valores de T_R entre los 5 y 6 min similares a los del estándar, lo que no ocurre para el control.

Capítulo IV

DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento e identificación de enterobacterias

La microbiota intestinal es un tema complejo, contribuye en los procesos de degradación y absorción de sustratos de la dieta, también cumple funciones inmunológicas y protectoras en cada organismo. Conocer su composición y las múltiples acciones que realiza para mantener el equilibrio en el ecosistema gastrointestinal, resulta esencial para comprender su participación en la prevención y tratamiento de trastornos inflamatorios (Gomez,2011). Luis Pasteur en 1885 en la Academia Francesa de la Ciencia sugirió por primera vez que la microbiota intestinal podía desempeñar un papel esencial en la digestión de los alimentos, creyendo que en su ausencia la digestión y metabolismo de éstos sería imposible (Zoetendal, 2004). O.Hara en 2006 señala que las bacterias predominantes en el ser humano son *Clostridium perfringens*, los *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Bifidobacterium Clostridium*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Streptococcus*, *Klebsiellas*. Sin embargo microorganismos patógenos y comensales requieren nichos ecológicos similares para la colonización y proliferación intestinal, de tal manera que la abundancia de nutrientes, es determinante en el establecimiento de la microbiota intestinal. Bajo condiciones de escasez sobrevive el más adaptado. Desafortunadamente los microorganismos patógenos cuentan con mecanismos adaptativos de probada eficiencia, que le permiten burlar las barreras naturales establecidas por la microbiota (Fukuda, et al., 2011).

Existe una amplia variedad de microorganismos que pueden degradar los colorantes azoicos, dentro de estos se encuentran hongos y bacterias capaces de romper los enlaces azo en condiciones aerobias o anaerobias (Manivannan, 2011). Para nuestro estudio se aislaron bacterias de la microbiota intestinal del género *Escherichia coli* y *Enterobacter*, Puerta (2010) señala que *Escherichia coli* y *Enterobacter* pertenecen a la familia Enterobacteriaceae y presentan un metabolismo facultativo por lo que favorecen la degradación anaeróbica azoica, estas son frecuentemente expulsadas en las heces fecales (2013). Además se hizo empleo bacterias procedentes de laboratorio; *Escherichia coli* no patógena y patógena,

Enterobacter y *Citrobacter*. Chung, et al., en 1992 reportaron la degradación de colorantes azoicos con géneros similares activados de acervos bacterianos.

4.2 Decoloración de colorantes tipo azo

Cuando ocurre una degradación biológica de los colorantes azo conlleva a la formación de productos secundarios, como las aminas aromáticas produciendo serios problemas al ambiente como lo señala Isik (2003) y en éste estudio, las bacterias de la microbiota intestinal no pueden estar descartadas en la formación de productos secundarios que puedan afectar a la salud.

El colorante rojo 40 es utilizado en la elaboración de diferentes productos de la industria alimentaria, su degradación ha sido estudiada mediante diversos métodos químicos y físicos, sin embargo el empleo de microorganismos para su degradación no ha sido de gran estudio. Kale et al., (2014) realizaron una biodegradación del colorante rojo 40 a 10 ppm bajo condiciones aeróbicas empleando la bacteria *Ochrobactrum anthropi*, esta fue capaz de degradar el colorante en un 95% en medio nutriente. Otro estudio empleando *Lactobacillus Paracasei* se llevó a cabo por Hassan et al, (2014) en la degradación de tartrazina, amaranto y allura red en condiciones anaeróbicas y aunque no se especifican los porcentajes de remoción, se observó una disminución en su densidad óptica mayor del 60 %. En nuestros ensayos de decoloración del rojo 40 pero a concentraciones de 30ppm y 50 ppm se reportaron porcentajes menores al 100%, a comparación de los anteriores autores hicimos uso de bacterias aisladas de la microbiota intestinal, y bacterias tipo. En estudios reportados por Wang (2009) y Kalyani (2008) se realizó la activación de cepas procedentes de laboratorio y fueron empleadas en la degradación de colorantes azoicos.

En nuestro estudio la cepa de *Citrobacter* del acervo bacteriano fue capaz de decolorar un 94.36% al colorante rojo 40 que se encontraban a 50 ppm al termino de 10 días, este dato coincide con un estudio realizado por Wang (2009), donde se reportó que *Citrobacter* sp. CK3 aislada de lodo activado recogido de una fábrica textil es capaz de decolorar un 96% al colorante textil rojo reactivo 180 en una concentración igual y en condiciones anaeróbicas. Aunque los porcentajes de decoloración eran similares la diferencia puede deberse a que ambas bacterias tienen un

origen distinto. El género *Citrobacter* ha sido involucrado en la degradación de diferentes colorantes azo An et al. (2002) observaron que esta bacteria aislada también de suelo en una planta de tratamiento de efluentes de la industria textil es capaz de remover varios colorantes azoicos que se encontraban a concentración de 20 ppm, un 90% de los colorantes cristal violeta y el rojo metilo fue removido, violeta genciana, verde malaquita y verde brillante perdieron entre un 80% de su color en estas condiciones pero el porcentaje de decoloración de fucsina básica y rojo congo era menos que los otros, un 66 y 26 % respectivamente. En nuestro estudio cuando la concentración del colorante era de 30 ppm un 81.52% de color se degradó, y aunque existe similitud en el porcentaje de degradación una de las posibles causas por la que estos porcentajes no son iguales en todos los colorantes se debe posiblemente al número de enlaces azoicos.

Además de *Citrobacter* especies del genero *Enterobacter* han sido empleado en la degradación de colorantes azoicos, Keharia *et.al.* (2003) reportó que *Enterobacter agglomerans* era capaz de degradar al rojo de metilo, Velázquez et al., (1990) y Williams y Wilkins, (1983) suponen que la especie capaz de degradar el colorante Naranja II es *Enterobacter aerogenes*. En nuestro estudio *Enterobacter sp.* del acervo bacteriano, degrado un 58.88% al colorante, mientras que *Enterobacter* de la microbiota intestinal es capaz de degradar tan solo 65.37 % del colorante cuando se encontraban a 30 ppm en condiciones anaeróbicas. Kalyanee *et al.* (2007) reportaron que *Enterobacter sp* era capaz de degradar al rojo reactivo CI 195 cuando se encontraba a 30 ppm en un 91% en condiciones anaerobias sin embargo a comparación con las nuestras, esta bacteria fue aislada de aguas residuales en contacto con contaminación de residuos textiles lo que podría provocar una mayor adaptación al sustrato obteniendo así un mayor porcentaje de degradación. La misma bacteria pero sometida a concentración de 50 ppm del rojo 40 obtuvo valores de 75.204 y 35.06% por la *Enterobacter* del acervo y la *Enterobacter sp* aislada de la microbiota, respectivamente. Ambos valores se encuentran por debajo del valor obtenido en un estudio reportado por Wang (2009) donde *Enterobacter sp.* EC3 fue capaz de decolorar un 92.6 % al reactivo negro 5, una de las posibles causas de la eficiente degradación reportada por Wang puede deberse a que *Enterobacter sp.* en condiciones óptimas tiene un mayor porcentaje de degradación. Haug et al. (1991) afirman que algunos estudios sugieren que las bacterias que decoloran los colorantes

azo requieren de la presencia de enzimas degradantes y sistemas de transporte que permiten la absorción de los colorantes azoicos en las células bacterianas, por lo que en este estudio no se descarta la presencia de enzimas que puedan intervenir en la degradación azo.

En la degradación de colorantes no solo géneros de *Citrobacter* y *Enterobacter* han sido empleados, Isik (2003) trabajó sobre la degradación del rojo congo y negro directo 38 a 30 ppm por *Escherichia coli* en condiciones anaeróbicas, obteniendo una degradación del 98% y 72% respectivamente. En nuestro estudio la bacteria *DH5a* cuando fue sometida a una concentración de 30 ppm de rojo 40 decoloró un 83.40% de color y a 50 ppm un 64.94 %. Vimala et.al en 2015 reportaron un estudio de degradación de tintes directos a partir de una muestra de un efluente textil por *Escherichia coli DH5a* transformada con tres plásmidos de bacterias aislada de efluentes contaminados; a, b y c, mostrando una degradación de a y b de 72% y c de 68% de degradación en 24 hrs, estos valores se encuentran relativamente cercanos a los nuestros, cuya respuesta puede deberse a que el tiempo de exposición en nuestro estudio es mayor y se encontraba la bacteria únicamente expuesta al colorante y el caldo nutrientes. Al igual que Vimala et.al (2015) coincidimos en que después de cierto tiempo de exposición de la bacteria ante el colorante, la tasa de degradación disminuye. Esto puede deberse a la disponibilidad de nutrientes (especialmente fuente de carbono) necesaria para la degradación de enlaces azo. El alto porcentaje de degradación también puede atribuirse a la presencia de enzimas capaces de romper los enlaces azo, Nakanishi (2011) afirma que *Escherichia coli* tiene FMN-dependiente y NADH-azoreductasas, capaces de lograr una eficiencia en la degradación de colorantes azo. Además de emplear una *Escherichia coli* no patógena (*DH5a*) se realizó la interacción del rojo 40 con *E234859* enteropatógena, esta decoloró a 75.70 % y 84.29 % a concentración de 30 y 50 ppm respectivamente, los altos porcentajes de degradación podrían indicar la presencia de enzimas azoreductasas capaces de degradar el colorante azo, además de que al ser una enteropatógena tiene la capacidad de adaptarse a gran cantidad de medios. En estudios de decoloración se han identificado un gran número de genes que confieren la habilidad de degradar colorantes azoicos. Chang en 2001 reportó la decoloración de un colorante azo usando los genes de azoreductasa de una cepa silvestre de *Pseudomonas luteola*. Chang & Lin (2001) clonaron y expresaron un

fragmento de ADN genómico de *Rhodococcus* sp. en *Escherichia coli*, obteniendo una cepa recombinante capaz de decolorar tintes azo.

Para nuestro estudio también se llevó a cabo la decoloración por *Escherichia coli* aislada de la muestra fecal infantil a 30 y 50 ppm del colorante rojo 40, y se obtuvo una decoloración de 49.38% y 42.875%, respectivamente. Oforka y Oranusi en 2004 reportaron la degradación del colorante Ponceau 4R y Carmoisine por *Escherichia coli* aislada originalmente de la flora intestinal humana que se encontraba coleccionada en el acervo bacteriano perteneciente al departamento de microbiología de la Universidad de Port Harcourt en Nigeria. En otro estudio reportado por Oranusi y Njoku (2006) *Escherichia coli* aislada de la microbiota intestinal es capaz de degradar el colorante azoico Tartrazina cuando se encontraba a 20 ppm en un 60.38% en un tiempo de 5 días. Al comparar nuestros resultados encontramos valores de porcentaje de decoloración menores al 50 %, cuya explicación podría encontrarse en la concentración del colorante ya que en nuestro estudio las concentraciones eran superiores, además tomamos en cuenta que aunque se trata del mismo género, no se puede asegurar la misma especie de esta manera no se logra la misma eficiencia de degradación.

4.3 Caracterización Parcial de los productos de degradación

4.3.1 Espectroscopia UV/Vis

La decoloración por bacterias puede llevarse a cabo por absorción (Aravindhan et al., 2007) o degradación (Kumar, et al., 2007). En una absorción, los espectros decrecen en proporción a las originales. Si la remoción de colorantes es atribuida a la biodegradación hay cambios hacia regiones de mayor energía (UV) por la formación de compuestos aromáticos de menor peso molecular (Yu and Wen, 2005). Con base a lo anterior en este estudio los espectros de absorción en la región ultravioleta indican cambios químicos.

4.3.2 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)

Se ha reportado que la degradación de colorantes azo por reducción produce aminas aromáticas que son tóxicas y cancerígenas. Por lo tanto la reducción de colorantes azo no es recomendable a pesar de que se lleva a cabo la decoloración. La vía de decoloración involucra azo-reductasas en condiciones anaeróbicas (Delee et al., 1998; Stolz, 2001).

La degradación del colorante rojo 40 a 30 ppm por los diferentes tipos de bacterias utilizadas en este trabajo de investigación evidencia la formación de un compuesto análogo al 1-naftol y a una amina aromática.

Mohana et al. (2008) reporta que utilizando un consorcio microbiano aplicado en el tratamiento de un agua contaminada con negro directo 22 (colorante de naturaleza poliazos) obtienen como productos de degradación al 1-naftol y difenilamina por vía reductiva.

Por otro lado Van der Zee, et al (2000) reportaron que el colorante azo acid orange 7 en condiciones anaerobias se degrada biológicamente en compuestos ácido sulfanílico y 1-amino-2-naftol (Fig. 22). El colorante rojo 40 (Fig.1) es similar al azo acid orange por lo que los productos de degradación podrían ser semejantes.

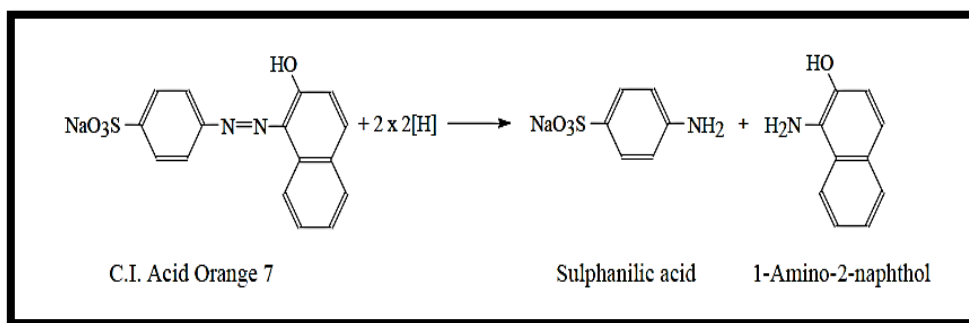


Fig. 22 Reducción del monoazo colorante Acid Orange 7

Las aminas sufren un proceso de metabolización en el organismo y los verdaderos agentes activos, son sus metabolitos, algunos de los cuales producen metahemoglobina, mientras que otros son cancerígenos (INSHT, 2004). Sin embargo las aminas aromáticas tienen efectos patológicos diversos y diferentes para cada una de ellas, por lo que deben considerarse de forma individualizada. No obstante, muchas de ellas comparten algunos efectos importante, que pueden resumirse en: cáncer de las vías urinarias,

especialmente de la vejiga, riesgo de intoxicación aguda, en especial de metahemoglobinemia, que puede afectar a los hematíes. Sensibilización de la piel y en ocasiones de las vías respiratorias. Takahashi y Hashimoto en 2001 señalan que cuando las aminas aromáticas entran al cuerpo humano mediante las cadenas tróficas son transformadas en aciloxiaminas las cuales desnaturalizan al DNA.

En cuanto al 1-naftol Jonardhan et al en 2008 reportan que 1-naftol afecta el crecimiento de *Escherichia coli*, además puede presentar efectos genotóxicos. Estudios sobre animales (ratas) prueban que la ingesta del compuesto provoca una reducción en las actividades, respiración agitada, entre cerramiento de párpados, secreción nasal, y diarrea (Sreekanth, 2013). Por otra parte Carrasco et al 2000 señalan que el Naftaleno aromático puede presentar una elevada toxicidad, afectando fundamentalmente a los neonatos (por vía cutánea) y debido a que la absorción puede ser vía oral, cutánea o respiratoria, esta se metaboliza hacia productos tóxicos como alfa-naftol, causando una depleción de glutatión.

VII. Conclusiones

- Las enterobacterias *Escherichia coli* y *Enterobacter sp.* aisladas de la muestra fecal infantil fueron capaces de interaccionar con el colorante alimenticio rojo 40, decolorándolo a 49.38% y a 58.8 % respectivamente.
- Al comparar los porcentajes de decoloración del colorante a 30 y 50 ppm, se encontró que las enterobacterias de acervos bacterianos tienen los más altos porcentajes de decoloración con más del 50%, en comparación con las cepas aisladas de la microbiota intestinal que decoloraron menos del 50 %.
- *Citrobacter sp.* presentó los mejores porcentajes de decoloración por encima del 80 % por lo que sugieren mayor capacidad de degradación en comparación de las cepas *Escherichia coli* y *Enterobacter sp* aisladas de la microbiota intestinal y las cepas de acervo.
- Los estudios de caracterización por espectroscopia de UV/Vis y HPLC mostraron que se llevó a cabo una reacción enzimática por azoreductasas del colorante rojo 40, sugiriendo que se formaron productos de degradación análogos al 1-naftol y a una amina aromática.
- Finalmente los resultados de este trabajo de investigación evidenciaron que las enterobacterias del acervo bacteriano y las aisladas de la microbiota intestinal de un menor originario del Estado de Puebla son capaces de degradar al colorante rojo 40 produciendo sustancias potencialmente dañinas para la salud.

VIII. Perspectivas.

Los resultados de este estudio proponen la continuidad y aplicación de acciones:

- a) Estas bacterias pueden ser utilizadas para el tratamiento de aguas residuales con colorantes azo provenientes de las industrias de alimentos y textiles, mediante un sistema integral anaerobio-aerobio.
- b) Mediante fermentación líquida utilizando estas bacterias es posible producir enzimas azo-reductasas y purificarlas mediante técnicas bioquímicas como diálisis, cromatografía de intercambio iónico y de exclusión molecular, siguiendo el proceso de purificación mediante ensayos de actividad enzimática.

IX. Apéndice A

Cromatogramas obtenidos durante la identificación de productos de reacción mediante HPLC

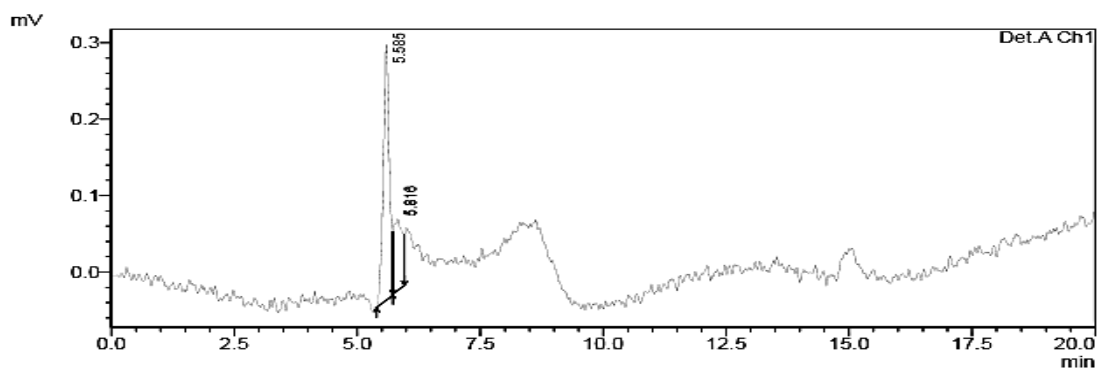


Fig.23 Cromatograma de 1-naftol a 285 nm de longitud de onda con T_R en 5.585 y 5.818 min.

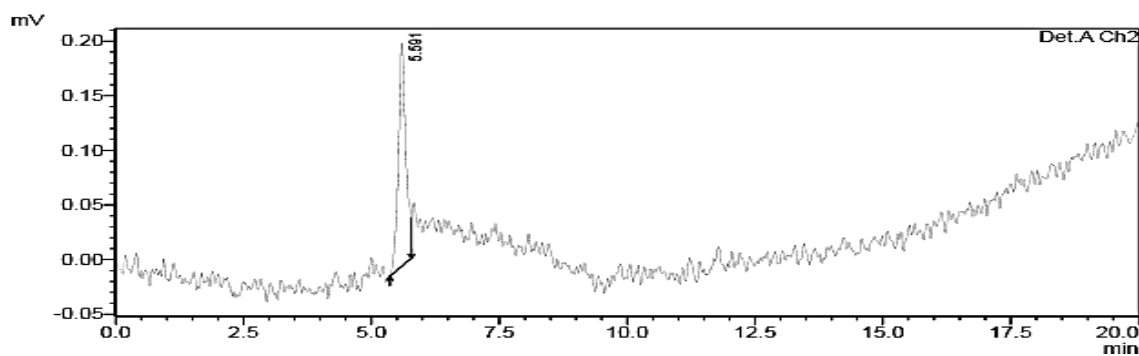


Fig.24 Cromatograma de 1-naftol a 315 nm de longitud de onda con T_R en 5.591 min.

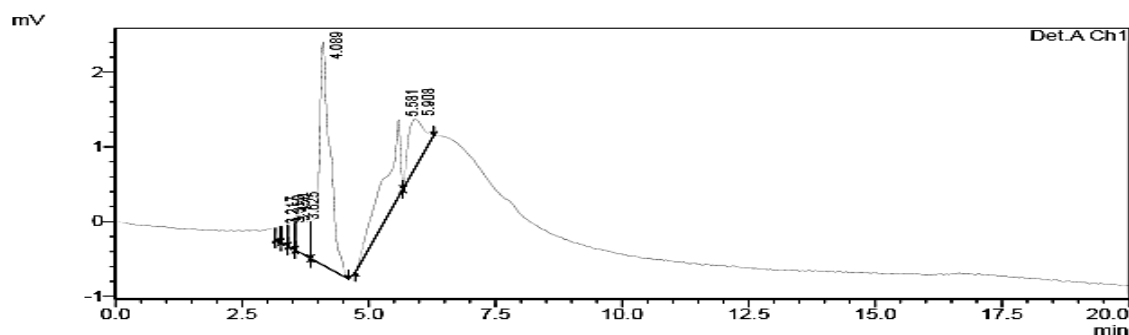


Fig. 25. Cromatograma de anilina a 260 nm de longitud de onda con T_R más evidentes en 4.089 min, 5.591 min y 5.908.

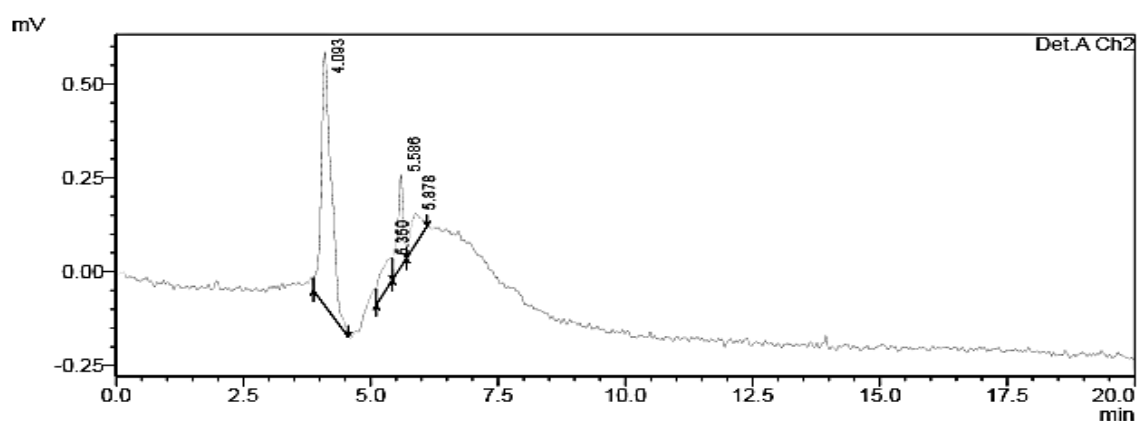


Fig. 26 Cromatograma de anilina a 285 nm de longitud de onda con T_R más evidentes en 4.093 min, 5.588min y 5.878 min.

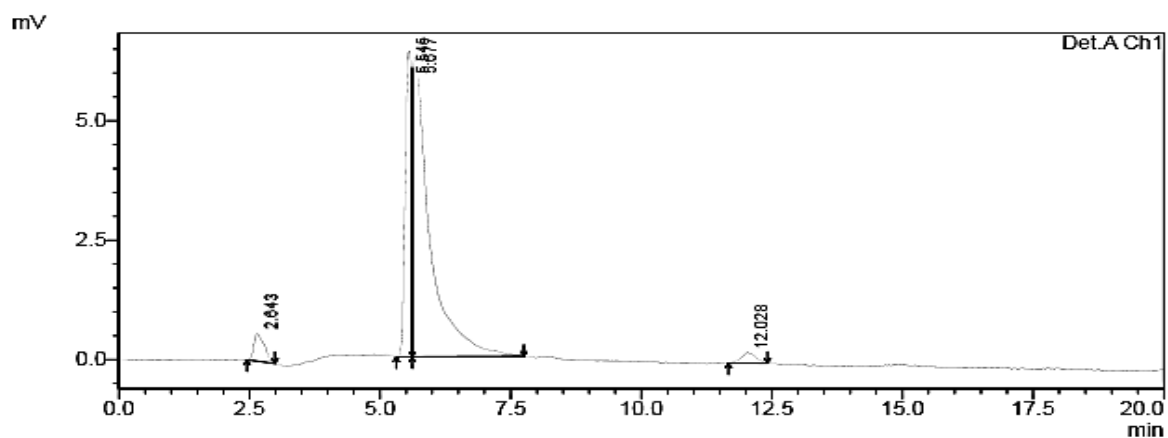


Fig. 27 Cromatograma del medio con rojo 40 a 285nm de longitud de onda para comparación del 1- naftol con T_R en 2.624 min, 5.545min y 5.677min.

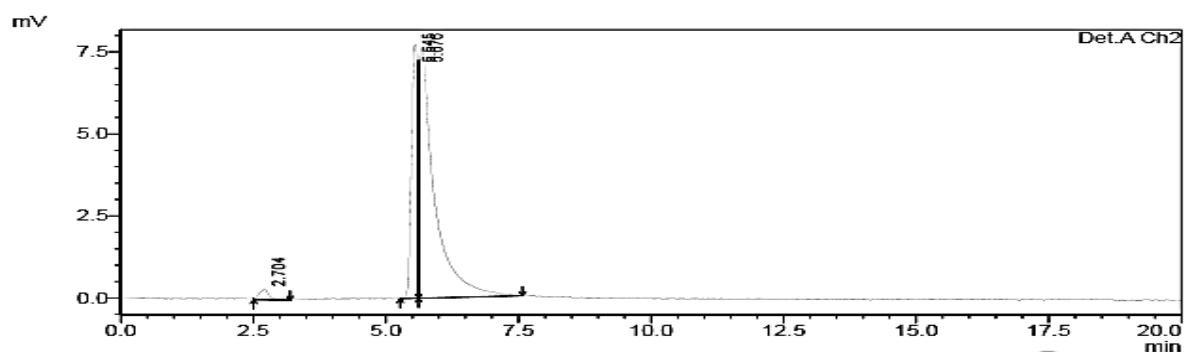


Fig. 28 Cromatograma del medio con colorante rojo 40 a 315 nm de longitud de onda con T_R en 2.704 5min ,545min y 5.676 min.

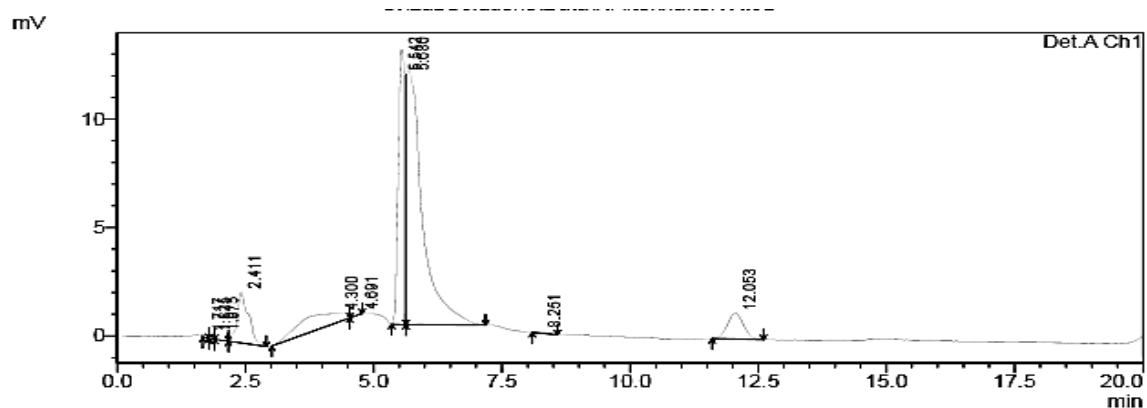


Fig. 29 Cromatograma del medio con colorante rojo 40 a 260 nm de longitud de onda con T_R sobresalientes a los 4.300 min, 41 min, 8.251 min y 12.053 min.

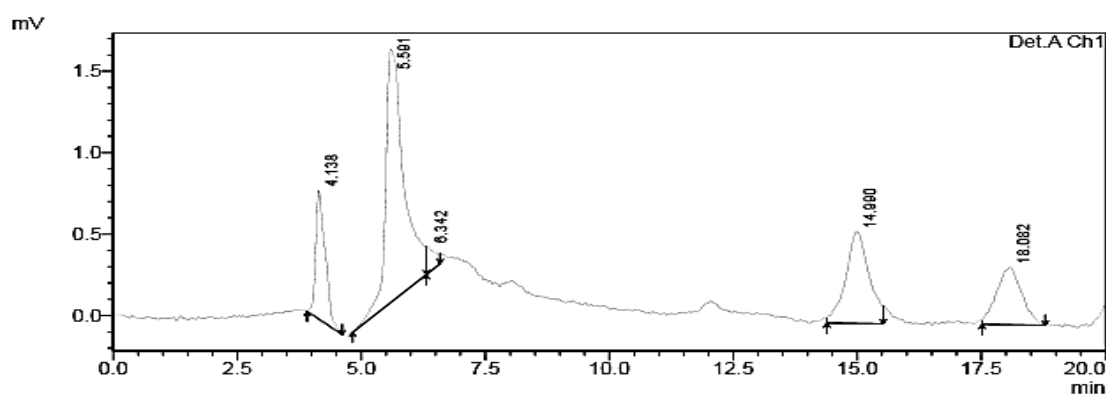
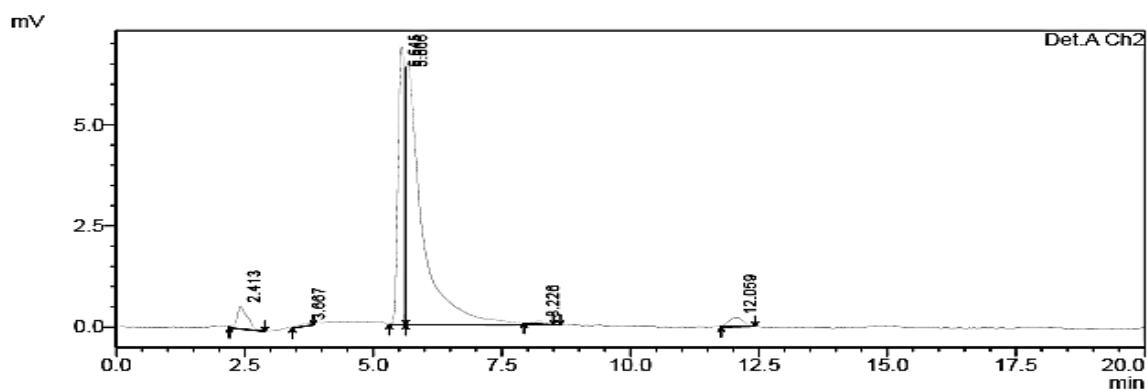


Fig. 31 Cromatograma de rojo 40 degradado por *Citrobacter sp.* a 285 nm de longitud de onda con T_R en 4.138, 5.591 y 6.342 min.

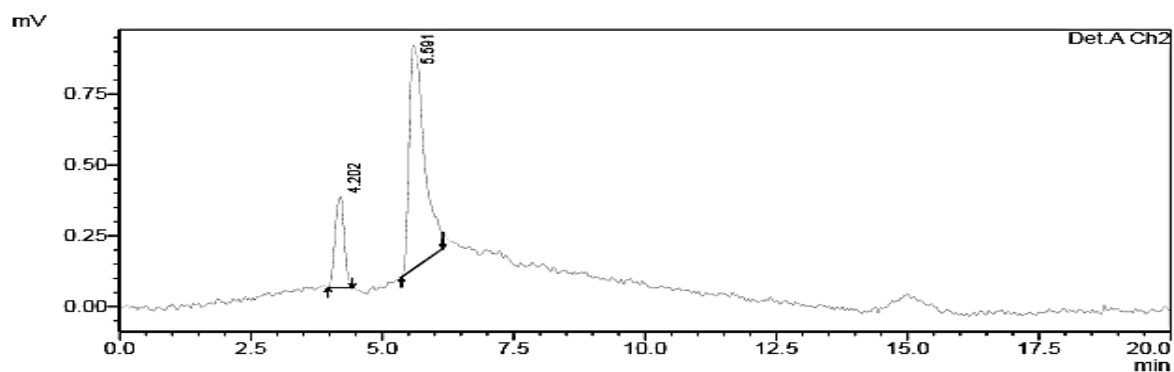


Fig. 32 Cromatograma de rojo 40 degradado por *Citrobacter sp.* a 315 nm de longitud de onda con T_R en 5.591min.

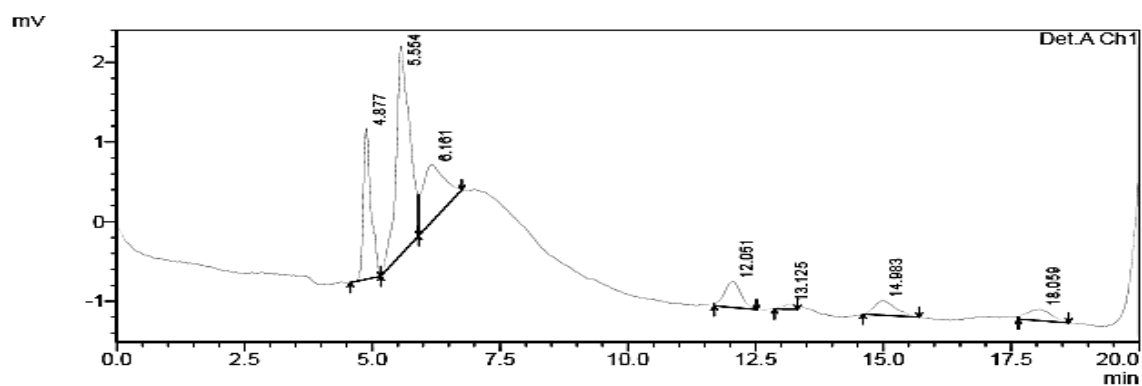


Fig. 33 Cromatograma de rojo 40 degradado por *Citrobacter sp.* a 260 nm de longitud de onda con T_R en 5.554 min.

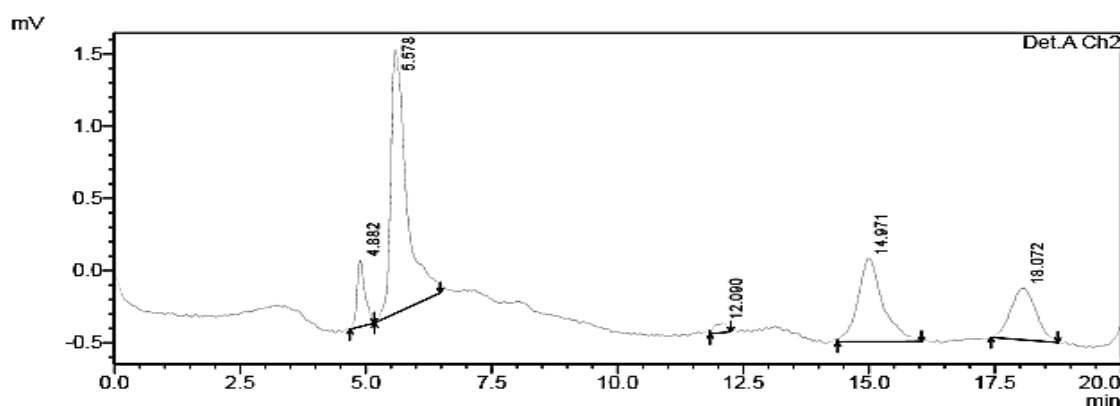


Fig. 34 Cromatograma de rojo 40 degradado por *Citrobacter sp.* a 285 nm de longitud de onda con T_R en 5.578min.

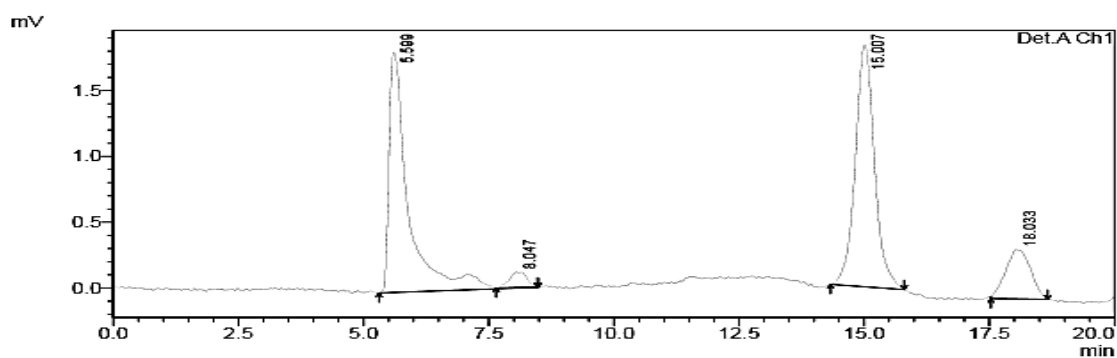


Fig. 35 Cromatograma de rojo 40 degradado por *DH5α* a 285 nm de longitud de onda con T_R en 5.599 min.

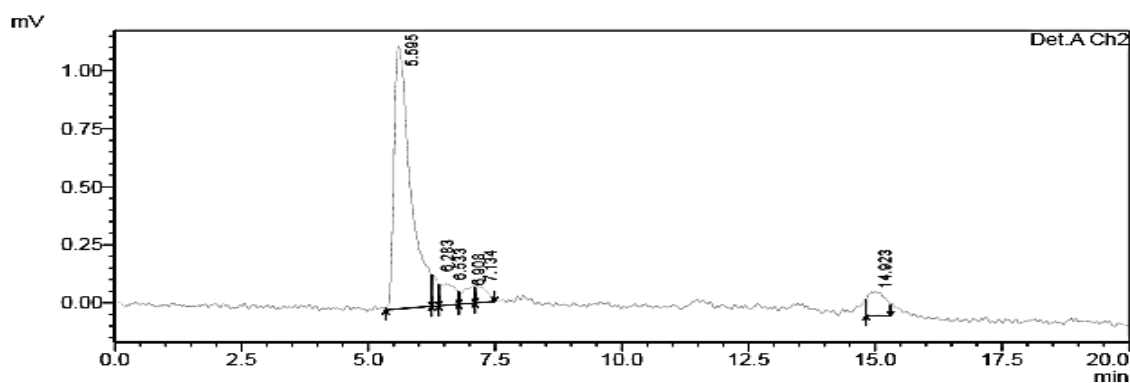


Fig. 36 Cromatograma de rojo 40 degradado por *DH5α* a 315 nm de longitud de onda con T_R en 5.595 min.

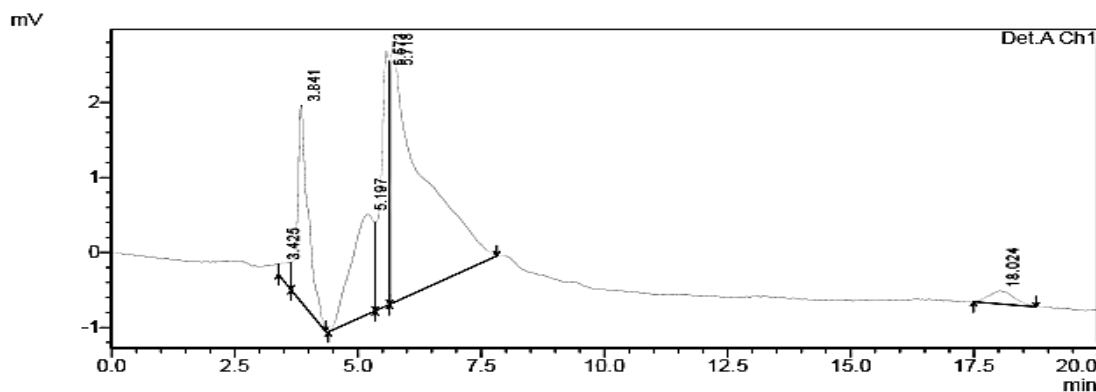


Fig. 37 Cromatograma de rojo 40 degradado por *DH5α* a 260 nm de longitud de onda con T_R en 5.573min.

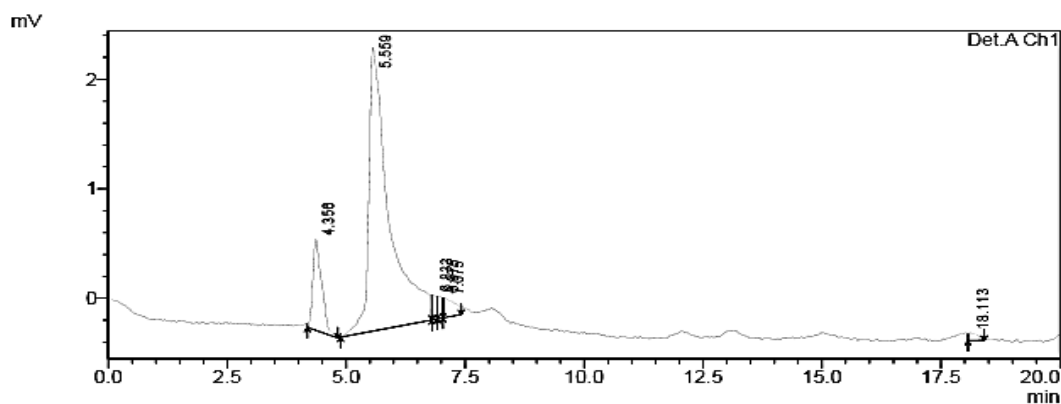


Fig. 38 Cromatograma de rojo 40 degradado por *Enterobacter* de la microbiota intestinal a 285 nm de longitud de onda con T_R en 5.559.

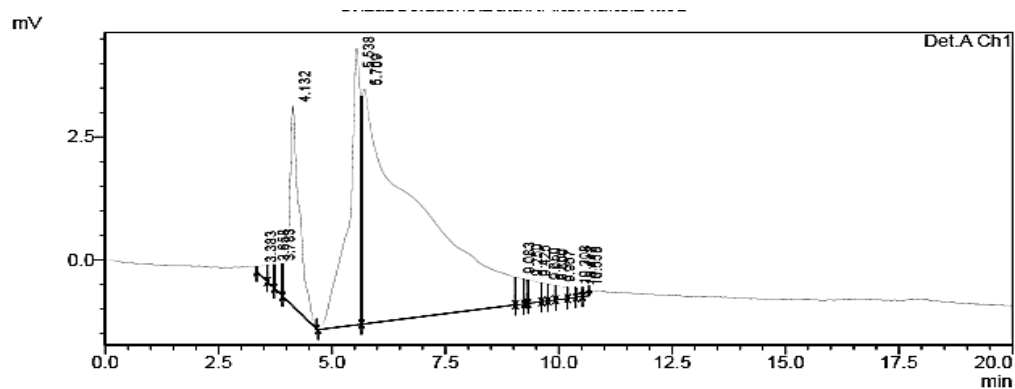


Fig. 39 Cromatograma de rojo 40 degradado por *Enterobacter* de la microbiota intestinal a 260 nm de longitud de onda con T_R en 3.383 min, 4.132 min, 5.553.

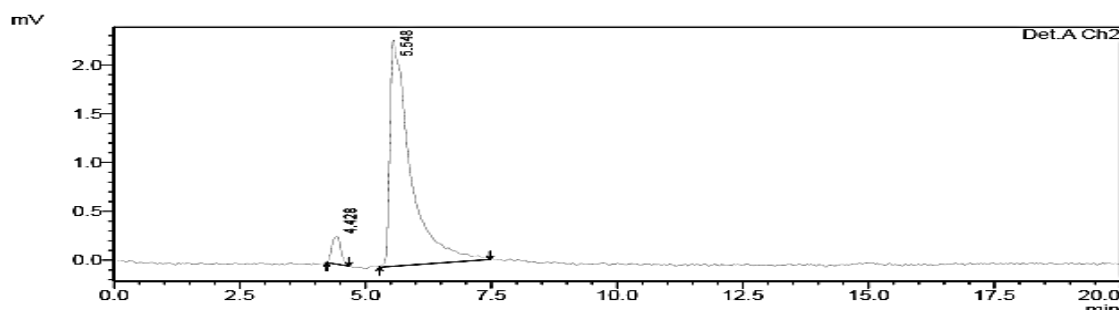


Fig. 40 Cromatograma de rojo 40 degradada por *E. coli* de la microbiota intestinal a 315 nm de longitud de onda con T_R en 4.28 y 5.548.

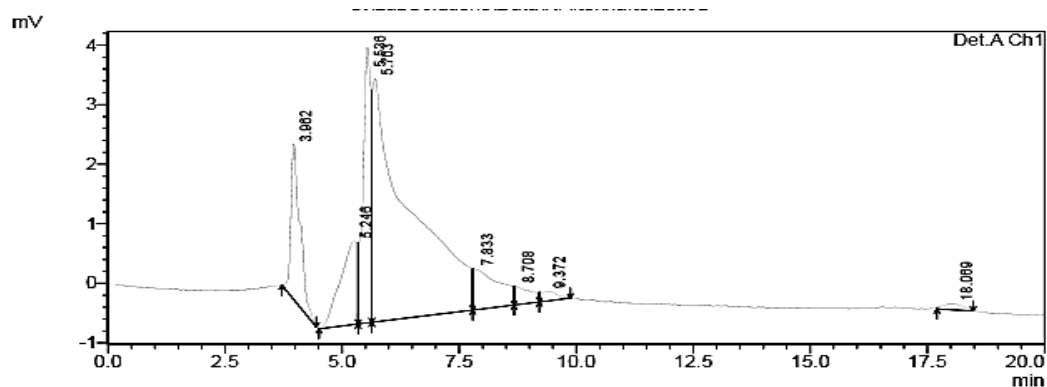


Fig. 41 Cromatograma de rojo 40 degradado por Enterobacter del acervo bacteriano a 260 nm de longitud de onda con T_R en 3.962min, 5.246 min y 5.703 min

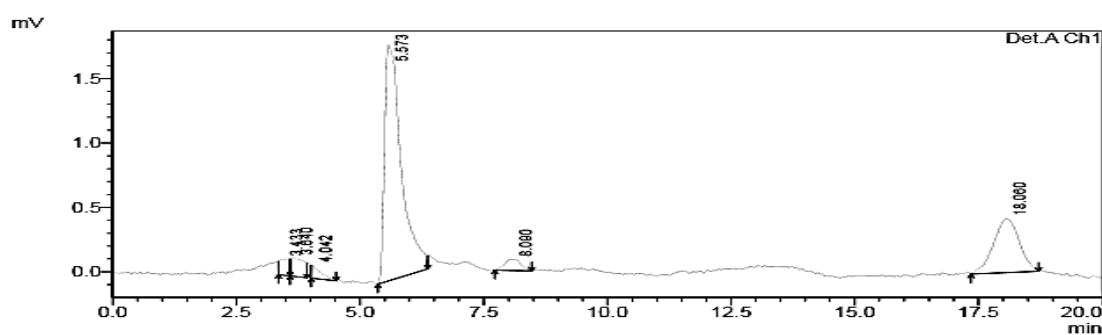


Fig. 42 Cromatograma de rojo 40 degradado por E2348/69 a 285 nm de longitud de onda con T_R en 5.573

X. Bibliografía

- An SY, Min SK, Cha IH, Choi YK, Cho YS, Kim CH, Lee YC (2002). Decolorization of triphenylamine and azo dyes by *Citrobacter* sp. *Biotechnol.* 24: 1037-1040.
- Aravindhana, R., J. R. Rao and Nair, B. U. (2007). Removal of basic yellow dye from aqueous solution by adsorption on green algae *Caulerpa pectiniformis*. *Journal of Hazardous Materials.* 142: 68-76.
- Asiastarán, Iciar, Lasheras Berta, Hariño Arturo (2003). Alimentos y nutrición en la práctica sanitaria. Madrid, Díaz de Santos. 121-128
- Baughman, G. L. & Weber, E. J. (1994) Transformation of dyes and related compounds in anoxic sediment: kinetics and products. *Environmental Science and Technology.* 267-276.
- Berzas, Juan (2005). ¿Conocemos los aditivos alimentarios que ingieren los niños en la calle?, Universidad de Castilla-La Mancha.
- Borzelleca, J. F., J. Olson (1989). Lifetime toxicity/carcinogenicity study of FD&C Red No. 40 (allura red) in Sprague Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology* 27: 11.
- Brohm, K. & Frohwein, E. (1937). Nachweis von durch Säuerungsfarbstoffen künstlichen Eigelbfarbstoffen in Milchspeiseeis. *Zbl. Lebensmitt. Forsch.* 73: 30.
- Brown MA, DeVito SC (1992). Predicting azo dye toxicity. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology.* 23: 249-324.
- Calvillo, Alejandro (2012) El ambiente obesigénico escolar, El poder del consumidor. IFAI. Mexico.
- Calvo, L.F., Rozada, F., Garcia, A.I., Martín-Villacorta, J., Otero, M. (2015). Dye adsorption by sewage sludge-based activated carbons in batch and fixed-bed systems. *Bioresour. Technol.* 87: 221-230.
- Carrasco, María y Paz, Antonio (2000). Tratados de emergencias médicas, Ediciones Aran, Madrid. 1516-1518.
- Cerniglia, C.E; Zhuo, Z.; Manning, B.W.; Federle, T.W.; Heflich, R.H. (1986). Mutagenic activation of the benzidine-based dye Direct Black 38 by human intestinal microflora. *Mutation Research.* 175: 11-16.
- Chang, Jo-Shu and Chou, Chien. (2001). Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. Elsevier Science Ltd. All rights reserved Printed in Great Britain. 35: 2841-2850.

- Chang, Jo-shu and Lin, Chia Yu.(2001). Decolorization kinetics of a recombinant *Escherichia coli* strain harboring azo dye decolorizing determinants from *Rhodococcus* sp. *Biotechnology Letters*. 23(8): 631-636.
- Chen Huizhong (2006) Recent Advances in Azo Dye Degrading Enzyme Research. Current Protein and Peptide Science, Division of Microbiology, National Center for Toxicological Research, U.S. 7(2):101-111.
- ChertoviskI, Salomon.(2012).Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios,. México: Diario Oficial.
- Chung KT, Stevens SE Jr, Cerniglia CE. (1992).The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Critical Reviews of Microbiology*. 18(3).175-190.
- Chung K. T. & Stevens, S. E. (1983). Degradation of azo dyes by environmental microorganisms and helminths. *Environmental Toxicology and Chemistry*.12(11) 2121–2132.
- Delee W, O'Neill C, Hawkes FR, Pinheiro HM.(1998). Anaerobic treatment of textile effluents: a review. *J Chem Technol Biotechnol* 73:323–335
- Dos Santos AB & Traverse J. (2005) Enhancing the electron transfer capacity and subsequent colour removal in bioreactors by applying thermophilic anaerobic.artículos treatment and redox mediators. *Biotechnol*. 42-52.
- Dos Santos, A. B., F. J. Cervantes, and J. B. Van Lier. (2007). Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Biores. Technol*, 2369–2385.
- Ershoff BH. (1977) Effects of diet on growth and survival of rats fed toxic levels of tartrazine (FD & C Yellow No. 5) and sunset yellow FCF (FD & C Yellow No. 6). *Journal of Nutrition*. 107: 822–828.
- Franciscon, Elisangela (2012). Decolorization and biodegradation of reactive sulfonated azo dyes by a newly isolated *Brevibacterium* sp. Strain. 15, SpringerPlus.
- Field, F.E.; Roberts, G.; Hallowes, R.C.; Palmer, A.K.; Kenneth E. Williams, K.E.; Lloyd, J.B. (1977). Trypan blue: identification and teratogenic and oncogenic activities of its coloured constituents. *Chemico-Biological Interactions*. 16(1): 69-88.

- Forgacs, E., Cserhádi, T. and Oros, G.(2004). Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environmental International*. 953-971.
- Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K.(2011) Bifidobacteria can project from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, 469(7331), 543-7.
- García, Carola.(2011). Los alimentos chatarra en México, regulación publicitaria y autorregulación. *Revista Científica de la Asociación Mexicana de Derecho a la Información* , 172-174.
- Giglio Norberto D., Burgosb Fernando y Cavagnari Brian (2013). Microbiota intestinal: sus repercusiones clínicas en el cuerpo humano. *Arch Argent Pediatr*;111(6):523-527.
- Golka, K.; Kopps, S.; Myslak, Z.W. (2004). Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability – a Review. *Toxicology Letters*.151 (1): 203- 210.
- Gómez Mario y Acero Fanny. (2011). Composición y funciones de la flora bacteriana intestinal *Repertorio de Medicina y Cirugía*. 20(2).
- Gupta, V.K. & Suhas. (2009). Application of low-cost adsorbents for dye removal a review. *En: Journal of environmental management*. 90(8):2313-2342.
- Hanai Toshihiko (1999), *HPLC: A practical Guide*. The royal society of chemistry. Cambridge
- Hassan Manal et al (2014) biodegradation of food dyes by *Lactobacillus paracasei*, *Indian Journal of applied research*.4(7).
- Haug, W., Schmidt, A., Nortemann, B., Hempel, D.C., Stolz, A. and Kanckmuss, H.-J. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 3144- 3149
- Hu TL. Kinetics of azo reductase and assessment of toxicity of metabolic products from azo dyes by *Pseudomonas luteola*. (2001) *WaterSci. Technol.* 43: 261-269.
- Holmberg D. (1978) Effect of amaranth, Ponceau 4R and/or vitamin A on enzyme activities of the rat liver, *Food. Cosmet. Toxicol*: 16(1):1-5.
- Horitsu, & et al. (1977). Degradation of p-aminoazobenzene by *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol*, 217-224.
- Hu, T.L. (1994). Decolourization of reactive azo dyes by transformation with *Pseudomonas Luteola*. *Bioresource Technology*, 49 (1): 47-51.

- Ibáñez Francisco, Torre Paloa y Irigoyen Aurora (2003). Aditivos alimentarios, Universidad Pública de Navarra.
- INSHT (2004). Aminas aromáticas, Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo, Vol 4. España.
- Isik Mufasa., & Sponza Delia.(2003).Effect oxygen on decolorization of azo dye by *Escherichia coli* and *Pseudomonas sp.* And fate of aromatic amines. *Process Biochemistry*.
- Kale, R.V. and P.R. Thorat (2014) Biodegradation of Allura Red AC (ARAC) by *Ochrobactrum anthropi* HAR08, isolated from textile dye contaminated soil. *International Journal of Advanced Research*. 2(9): 432-441.
- Kalyanee Jirasripomgpun et al,(2007) Decolorization and degradation of C.I reactive red 195 by *Enterobacter sp.*. *Thammasat.J.Sc.Tch*.12(4).
- Kalyani DC, Patil PS, Jadhav JP, Govindwar SP. (2008) Biodegradation of reactive textile dye Red BLI by an isolated bacterium *Pseudomonas sp.* *Bioresour Technol*.
- Kandelbaur A, Guebitz GM. (2005). Bioremediation for the decolorization of textile dyes - a review. En: *Environmental Chemistry Springer Berlin Heidelberg*, 269- 288.
- Kataoka, N.,Miya, A. Y Kiriyaama,k. “studies on Hydrogen Production System Using Microorganisms. *Ebara, Engineering Review* N°183 ,1999
- Keharia H & Madamwar D. (2003), Bioremediation concepts for treatment of dye containing water: A review, *Indian Journal of Experimental Biology*, 41: 1068.
- Kobylewski, Sarah (2010).Food Dyes A Rainbow of risks. *Center For Science in the Public Interest*.
- Kobylewski, Sara., & Jacobson, Michael(2010).Food dyes a rainbow of risks. *Center for Science in the Public Interest, USA*.
- Kumar, K., S. S. Devi, K. Krishnamurthi, D. Dutta and Chakrabarti, T. (2007). Decolorization and detoxification of Direct Blue-15 by a bacterial consortium. *Bioresour. Technol*. 98: 3168-3171.
- Lin, S.H., and Peng, F.C. (1994) Treatment of textile wastewater by electrochemical method. *Water Res.*, 28: 277-282.
- Lin, S.H., and Peng, F.C. (1996) Continuous treatment of textile wastewater by combined coagulation, electrochemical oxidation and activated sludge. *Water Res.*, 30: 587- 592.

- Madigan, Michael T., Martinko, John M.(2009).Biología de los microorganismos. Addison-Wesley, 12ª edición.
- Manivannan M., Reetha D. and Ganesh P. (2011). Decolourization of textile azo dyes by using bacteria isolated from textile dye effluent. JEBT- Microbial Biotechnology 3(8) 29-32.
- Martinez, Irma., & Villezca, Pedro. (2003) La alimentación en México: un estudio a partir de la Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares. Revista de información y análisis.
- McCann Donna et al (2007) Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. 307 (9598).
- McMullan, G., et al (2001). Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81-87.
- Mikkelsen, H., J. Larsen, et al. (1978). "Hypersensitivity reactions to food colors with special reference to the natural color annatto extract (butter colour)." Archives of Toxicology: Supplement 1: 141-143.
- Mohana S., Shrivastava S., Divecha J., Madamwar D. (2008). Response surface methodology for optimization of medium for decolorization of textile dye Direct Black 22 by a novel bacterial consortium. *Bioresource Technology* 99: 562-569
- Nakanishi, Masayuki. (2001). Putative ACP Phosphodiesterase Gene (*acpD*) Encodes an Azoreductase. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.The Journal of Biological Chemistry. 276: 49.
- O'Neill, C. Delée, W., Hawkes, F. R. and Pinheiro, H. M.(1998) Anaerobic treatment of textile effluents: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 323.
- Oforka, N. C., Oranusi, N. A. (2004). Decolourisation of Azo based food colorants (carmoisine and Ponceau 4R by *Escherichia coli*. *Biology*. 6: 45 -51.
- O'Hara AM, Shanahan F.(2006) .The gut flora as a forgotten organ. *EMBO, Rep*. 688-93.
- Oranusi, N A and Njoku,H O.(2006). Biotransformation of Food Dyes by Human Intestinal Bacteria (*Streptococcus faecalis*, *Eschericia coli*) .All rights reserved J. Appl. Sci. Environ,10.

- Orn A, Bruce P, Lauren S, Ingar O Floyd , E. (2005). Dewhirst Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity Journal of clinical microbiology , 5721–5732.
- Platzek, T., Lang, C., Grohmann, G., Gi, U. S., Baltes, W. (1999) Formation of a carcinogenic aromatic amine from an azo dye by human skin bacteria *in vitro*. *Hum. Exp. toxicol*, 18: 552-559.
- Prats, G.(2005). *Microbiología Clínica*. Buenos aires : Panamericana.
- Puerta, A., & Mateos.(2010).F. Enterobacterias. *Medicine*. 3426-3427.
- Raffi, and C. E. Cerniglia. (1997). Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by *Clostridium* species from the human intestinal tract. *Food Chem. Toxicol*. 35:897–901.
- Rau J, Knackmuss HJ, Stolz A. (2002). Effects of different quinoid redox mediators on the anaerobic reduction of azo dyes by bacteria. *Environ Sci Technol*, 36:1497–1504.
- Rimblas (2004). Los compuestos químicos en los alimentos desde la perspectiva de la seguridad alimentaria. Consejería de Sanidad. Murcia.
- Russ, R et al.(2000). The function of cytoplasmic flavin reductases in the reduction of azo dyes by bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*,1429-1434.
- Saratale, R B., Saratale G.D., CHang J.S., Govindwar S. P.(2011). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 42,138-157.
- Serra Majem, Lluís (2006). *Nutrición y salud pública: métodos, bases científicas y aplicaciones*. 2da edición, Editorial ELSEVIER, 826.
- Schmidt, Hermann.(1990). *Aditivos alimentarios y los reglamentos de los alimentos* . Santiago de Chile: fundación chile.
- Sreekanth, R; Prasanthkumar,KP; Sunil Paul, MM; Aravind, UK; Aravindakumar. (2013). Oxidation reactions of 1- and 2-naphthols: an experimental and theoretical study. *The journal of physical chemistry*. 11261–70.
- Skoog D.A, Holler and Nieman.(1998), “ *Principles of Instrumental Analysis*, . Ed 5 th.

- Soylak, M., UnsaL, Y.E. & TUzen, M. (2009). Spectrophotometric determination of trace levels of allura red in water samples after separation and preconcentration. En: Food and chemical toxicology. 49(5): 1183-11877.
- Srinivasan, A. & Viraraghavan, T.(2010) Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: a review. En: Journal of environmental management.. 91 (10): 1915-1929.
- Stolz, A. (2001) Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56:69-80.
- Takahashi H, Hashimoto Y. (2001). Formaldehyde-mediated modification of deoxyguanosine with amines: one pot cyclization as a molecular model for genotoxicity. Bioorg Med Chem Lett 11:729-731
- Tanaka, Y. and Ohmiya, A. (2008) Seeing is believing: Engineering anrhocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. *Curr. Opin Biotechnol.*, in press.
- *The EFSA Journal* (2008) Assessment of the results of the study by McCann *et al.* (2007) on the effect of some colours and sodium benzoate on children's behavior, Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing.
- Umer, S., M. Badaruddin, S. Sayeed, R. Ali y M.N. Riaz.(2008). Binding ability of Allura Red with food proteins and its impact on protein digestibility, Food. Chem: 110(3), 605-610.
- Van der Zee, F.P., Lettinga, G. & Field, J.A. (2000) The role of (auto)catalysis in the mechanism of anaerobic azo dye reduction. Water Sci. Technol. 42: 301-308.
- Van der Zee, F.P., Bisschops, I.A.E., Blanchard, V.G., Bouwman, R.H.M., Lettinga, G. and Field, J.A. (2002) Biotic and abiotic processes of azo dye reduction in anaerobic sludge. *submitted*.
- Velázquez, E.; Mateos, P.; Monte, E.; Tejedor, C.(1990) Tablas de identificación de microorganismo Ed. Universidad de Salamanca, I.U.C.E., Salamanca, 33-49.
- Vimala, Gounder., Jayakumar, preethi., Devi.C, Anchana. (2015) Azo Dye degrading bacteria from textile effluent. International Journal of current microbiology and applied sciences, volume 4. No 7.
- Wang Hui, Su Jian Qiang, Zheng Xiao Wei. (2009). Bacterial decolorization and degradation of the reactive dye Reactive Red 180 by *Citrobacter* sp. CK3. International Biodeterioration & Biodegradation, 395-399.

- Wang Hui, Su Jian Qiang, Zheng Xiao Wei. (2003). Bacterial decolorization and degradation of the reactive dye Reactive Red 180 by *Enterobacter* sp. CK3. International Biodeterioration & Biodegradation.
- Weisburger JH.(2002). Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. American Health Foundation, USA.
- White, R. G. (1970). "Metabolic fate of orally ingested non-toxic Red-Z4576." Unpublished report number 21855 by Buffalo Research Laboratory, submitted to WHO by Allied Chemical Corporation.
- Weisburger, S. H., 2002, Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health, Mutation Research 506-507, 9-20.
- Williams & Wilkins. (1983) .Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, U.S.A, 163-199.
- Wilson, B.G. y S.L. Bahna (2005). Adverse reactions to food additives, Ann. Allergy Asthma Immunol: 95: 499-507.
- Yu, Z. S., and Wen, X. H. (2005). Screening and identification of yeasts for decolorizing synthetic dyes in industrial wastewater. International Biodeterioration and Biodegradation. 56: 109 114.
- Zoetendal EG, Cheng B, Koike S, Mackie RI. (2004) Molecular microbial ecology of the gastrointestinal tract: from phylogeny to function. *Curr Issues Intest Microbiol*, 5(2): 31-47.