



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



"La tierra no es de nosotros, nosotros somos de la tierra"

**REMOCIÓN DE FENOL, 2-CLOROFENOL Y
COLORANTES TEXTILES UTILIZANDO UN
CONCENTRADO DE PEROXIDASAS DE
CHAYOTE (*Sechium edule SW*)**

TESIS

Que para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

ALEJANDRO ISAÍAS AUGUSTO ALONSO CALDERÓN

Asesora de tesis:
Dra. María Lioba Osnelda Villegas Rosas

Octubre 2014



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



"La tierra no es de nosotros, nosotros somos de la tierra"

**REMOCIÓN DE FENOL, 2-CLOROFENOL Y
COLORANTES TEXTILES UTILIZANDO UN
CONCENTRADO DE PEROXIDASAS DE
CHAYOTE (*Sechium edule SW*)**

TESIS

Que para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

ALEJANDRO ISAÍAS AUGUSTO ALONSO CALDERÓN

Comité tutorial:

Asesora y Tutora	Dra. María Lioba Osnelda Villegas Rosas
Integrante de Comité Tutorial	Dra. María Teresa Zayas Pérez
Integrante de Comité Tutorial	Dr. Gunther Geissler Dahlheim

Octubre 2014



BUAP

M.C. ALEJANDRO ISAÍAS AUGUSTO ALONSO CALDERÓN
Presente:

Por este conducto me permito comunicarle que los miembros del jurado integrado por:

<i>Dra. Amparo Otilia Sánchez Sandoval</i>	<i>Presidente</i>
<i>Dr. Eduardo Torres Ramírez</i>	<i>Secretario</i>
<i>Dr. Enrique González Vergara</i>	<i>1er. Vocal</i>
<i>Dra. Alia Méndez Albores</i>	<i>2do. Vocal</i>
<i>Dr. J Santos Hernández Zepeda</i>	<i>3er. Vocal</i>
<i>Dr. José Víctor Rosendo Tamariz Flores</i>	<i>1er. Suplente</i>
<i>Dra. Elsa Iracena Castañeda Roldán</i>	<i>2do. Suplente</i>

designado para la defensa de su tesis "Remoción de fenol, 2-clorofenol y colorantes textiles utilizando un concentrado de peroxidasa de chayote (*Sechium edule Sw*)", han manifestado mediante su voto que ésta cumple con los méritos suficientes para ser defendida como tesis de grado de Doctorado en Ciencias Ambientales, por lo que este Posgrado le autoriza la impresión de la misma.

Sin otro asunto en lo particular, quedo de usted.

ATENTAMENTE

"PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR"

H. PUEBLA DE Z., OCTUBRE 16 DE 2014

DR. RICARDO DARÍO PEÑA MORENO
SECRETARIO ACADÉMICO



RDPM/anma
c.c.p. Archivo
c.c.p. Minutario

Instituto
de Ciencias

Edif. 103 E, Ciudad Unversitaria,
Col. San Manuel, Puebla, Pue.
C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 7050 y 7051

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Lioba Osnelda Villegas Rosas, por disponer de su tiempo para asesorarme, así como por proporcionarme los medios necesarios para la realización de este trabajo.

Al Dr. Gunther Geissier Dalheim, Dra. María Teresa Zayas Pérez y Dra. María Lioba Osnelda Villegas Rosas por formar parte de mi Comité Tutoral y por sus sugerencias realizadas durante el desarrollo de mi trabajo de tesis.

A los integrantes del jurado: Dra. Amparo Otilia Sánchez Sandoval, Dr. Eduardo Torres Ramírez, Dr. Enrique González Vergara, Dra. Alia Méndez Albores, Dr. J Santos Hernández Zepeda, Dr. Victor Rosendo Tamariz Flores y Dra. Elsa Castañeda Roldán, por sus comentarios y sugerencias efectuados al presente trabajo de tesis.

Al posgrado en Ciencias Ambientales por formarme en esta área del conocimiento tan importante en estos tiempos.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Abreviaturas	I
Resumen	III
Abstract	IV
Capítulo I	
1.1 Introducción	1
1.2 Justificación	3
1.3 Objetivos	7
Capítulo II	
2.1 Antecedentes	8
2.1.1 Historia y generalidades	8
2.1.2 Peroxidasas	10
2.1.3 Oxidación de fenoles y derivados	12
2.1.4 Colorantes	16
2.1.5 Estudio cinético	23
2.1.5.1 Comportamiento de Michaelis y Menten	23
2.1.6 Modelo enzimático de peroxidasas	26
2.1.7. Chayote (<i>Sechium edule Sw</i>)	29
Capitulo III	
Desarrollo experimental	
3.1 Material y Reactivos	32
3.1.1 Equipo	32
3.1.2 Reactivos	32
3.2 Peroxidasa de chayote	33
3.2.1 Obtención de un concentrado de peroxidasa de chayote (CPOCh).	33
3.2.2 Determinación del perfil catalítico del CPOCh a diferentes valores de pH.	34
3.2.3 Determinación del perfil catalítico del CPOCh a diferentes valores de temperatura.	34
3.2.4 Determinación del tiempo de vida media.	34
3.2.5 Estudio cinético	35
3.3 Tratamiento del agua artificialmente contaminada con fenol y 2-clorofenol utilizando la CPOCh.	36
3.3.1 Preparación del agua artificialmente contaminada con	36

	fenol y 2-clorofenol.	
3.3.2	Determinación del porcentaje de transformación y remoción del fenol y 2-clorofenol.	37
3.4	Tratamiento de aguas artificialmente contaminadas con colorantes textiles utilizando el CPOCh.	37
3.4.1	Selección de colorantes	37
3.4.2	Tratamiento de agua artificialmente contaminada Con colorantes textiles.	37
3.5	Caracterización de los productos de reacción de fenoles y colorantes	38
3.5.1	Espectroscopia UV/vis	38
3.5.2	Espectroscopia FTIR	38
3.5.3	Espectroscopia RMN de ¹ H	39
3.5.4	Espectrometría de masas	39
3.6	Remoción de colorantes de muestras de aguas residuales textiles	39
3.6.1	Origen del agua residual textil a tratar	39
3.6.2	Parámetros determinados al agua residual textil a tratar	40
3.6.3	Tratamiento del agua residual textil	40

Capítulo IV

Resultados y discusión

4.1	Peroxidasas de chayote	41
4.1.1	Obtención de un concentrado de peroxidasa de chayote (CPOCh).	41
4.1.2	Determinación del perfil catalítico de la peroxidasa a diferentes valores de pH.	41
4.1.3	Determinación del perfil catalítico de la peroxidasa a diferentes valores de temperatura.	42
4.1.4	Determinación del tiempo de vida media	47
4.1.5	Estudio cinético	49
	4.1.5.1 Determinación de las constantes catalíticas del CPOCh.	51
4.2	Tratamiento de agua artificialmente contaminada con fenol y 2-clorofenol utilizando el CPOCh.	53
4.2.1	Agua artificialmente contaminada con fenol y 2-clorofenol	53
4.2.2	Determinación de porcentaje de transformación y remoción de fenol y 2-clorofenol.	54

4.3	Selección de los colorantes	60
4.3.1	Tratamiento de agua artificialmente contaminada con colorantes textiles.	61
4.4	Caracterización de los productos de reacción de fenoles y Colorantes	64
4.4.1	Espectroscopía UV/vis de los productos de oxidación del fenol y 2-clorofenol.	64
4.4.2	Espectroscopía de FTIR	66
4.4.3	RMN ¹ H y Espectrometría de masas	68
4.5	Caracterización espectroscópica UV/vis y FTIR de los productos de reacción de los colorantes.	70
4.5.1	Negro directo 22	70
4.5.2	Azul solofenil BF	74
4.5.3	Azul erionyl A-R	80
4.6	Remoción de colorantes de muestras de aguas residuales textiles	83
4.6.1	Origen del agua residual textil a tratar	83
4.6.2	Parámetros determinados al agua residual textil a tratar	83
4.6.3	Tratamiento del agua residual textil	84
 Capítulo V		
	Conclusiones	89
 Bibliografía		91
Anexo A	Gráficas primarias	104
Anexo B	Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con fenol a distintas concentraciones.	105
Anexo C	Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con los colorantes estudiados a las diferentes concentraciones.	109
Anexo D	Espectros de FTIR del fenol y 2-clorofenol	127
Anexo E	RMN ¹ H y espectrometría de masas de la caracterización de los productos de oxidación del fenol, 2-clorofenol y colorantes textiles.	128
Anexo F	Agua residual textil	137
Anexo G	Curva de calibración para el colorante negro directo 22	138

ABREVIATURAS

ATP	Adenosin trifosfato
ATR	Accesorio de reflectancia total atenuada por sus siglas en inglés
cm	Centímetros
CPOCh	Concentrado de peroxidasas de chayote
DBO₅	Demanda bioquímica de oxígeno
DQO	Demanda química de oxígeno
DyP	Peroxidasa decolorante del tinte por sus siglas en inglés
ESI-MS	Espectrometría de masas con ionización por electrospray por sus siglas en inglés
FAB-MS	Bombardeo rápido de átomos-espectrometría de masas por sus siglas en inglés
FDA	Agencia de alimentos y medicamentos por sus siglas en inglés
FTIR	Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
h	Hora
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución por sus siglas en inglés
HRP	Peroxidasa de rábano picante por sus siglas en inglés
I.P.	Intersección primaria
ICA	Índice de calidad del agua
kcat	Constante de velocidad máxima teórica
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramo
K_L	Fracción termolábil
K_R	Fracción termorresistente
K_M	Constante de Michaelis-Menten
L	Litro
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LD₅₀	Cantidad de un material determinado que provoca la muerte del 50% de un grupo de animales de prueba
LiP	Lignina peroxidasa
λ	Longitud de onda
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
mM	Milimolar
MnP	Manganeso peroxidasa
msnm	Metros sobre el nivel del mar
μL	Microlitros
nm	Nanometros
pH	Potencial de hidrógeno

ppm	Partes por millón
Rz	Número de pureza o Reinheitszahl
RMN ¹H	Resonancia magnética nuclear protónica
rpm	Revoluciones por minuto
UV/vis	Ultravioleta-visible
V_{max}	Velocidad máxima
V_o	Velocidad inicial

Resumen

En este trabajo de investigación se utilizó un concentrado de peroxidasas de chayote (CPOCh) para la remoción de los contaminantes fenol, 2-clorofenol y los colorantes negro directo 22, azul solofenil BF, azul erionyl A-R, azul cibacron FN-R y azul cibanon RS-JM en agua artificialmente contaminada, así como para el tratamiento de muestras de agua residual proveniente de una lavandería de mezclilla.

Los resultados mostraron que el fenol (de 500 hasta 1000 ppm) es rápidamente removido, lográndose valores hasta de 98.58% en un tiempo de 1 a 3 min; mientras que para el 2-clorofenol (1000 ppm) se obtuvo una remoción del 99.6% en un 1 min. La caracterización por espectroscopía de FTIR de los productos de oxidación mostró que se produjeron quinonas, mientras que la espectrometría de masas sugiere la formación de dímeros de los compuestos fenólicos estudiados. Para los colorantes textiles se alcanzaron altas remociones, de hasta 99.6%. La caracterización espectroscópica de los productos de reacción del colorante negro directo 22 y azul solofenil BF mostró que la reacción de oxidación conduce a la formación de quinonas.

Con respecto al tratamiento del agua residual de una lavandería de mezclilla, se removió en un 93.20% del colorante negro directo 22 en una muestra proveniente de la etapa de teñido y del 83.31% de una muestra obtenida del conjunto de las diferentes etapas del proceso.

Los resultados de la caracterización del CPOCh con la variación del pH y temperatura mostraron que la máxima actividad enzimática fue alcanzada a pH 6.0 y 80°C. La vida media para las fracciones termorresistente y termolábil fueron de 34.18 min y 18.50 s, respectivamente.

El estudio cinético del CPOCh mostró que presenta un comportamiento según Michaelis-Menten y las constantes aparentes determinadas para peróxido de hidrógeno (K_A) y guayacol (K_B) fueron de 1.5×10^{-3} y 5×10^{-3} M, respectivamente, y la velocidad teórica máxima (k_{cat}) fue de $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

ABSTRACT

In this research a peroxidase concentrate from Chayote (*Sechium edule*) (CPOCh) was used for removal of contaminants: phenol, 2-chlorophenol, 22 direct black dyes, solofenil Blue BF, AR erionyl blue, Cibacron Blue FN-R and blue applied cibanon RS-JM in artificially contaminated water and also to treat wastewater samples from a denim laundry.

The results showed that the phenol (500 to 1000 ppm) is rapidly removed, obtaining values of up to 98.58% over a period of 1 to 3 min; while for 2-chlorophenol (1000 ppm) a removal of 99.6% over a 1 min was obtained. Spectroscopic characterization FTIR of the oxidation products were quinones, whereas mass spectrometry suggests dimer formation of phenolic compounds. For textile dyes high removals of up to 99.6% were achieved. Spectroscopic characterization of the reaction products of the black direct dye and blue solofenil BF 22 showed that the oxidation reaction leads to the formation of quinones.

With respect to the treatment of wastewater from a laundry denim, 93.20% of direct black dye 22 was removed in a sample from the dyeing step and 83.31% of a sample obtained from all the different stages of the process.

The results of the characterization of Chayote peroxidase (CPOCh) with varying pH and temperature showed that the maximum enzyme activity was reached at pH 6.0 and 80°C. The half-life for the heat-resistant and heat-labile fraction was 34.18 min and 18.50 s, respectively.

A kinetic study of CPOCh showed a behavior according to Michaelis-Menten constants and apparent specific for hydrogen peroxide (K_A) and guaiacol (K_B) were 1.5×10^{-3} and $5 \times 10^{-3} \times 10^{-3}$ M, respectively, and the theoretical speed maximum (kcat) was $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

A peroxidase concentrate from chayote managed to remove the all the dyes studied, thus opening the possibility of applying it to other contaminating dyes

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

Las poblaciones humanas generan una gran cantidad de residuos sólidos, gaseosos y líquidos, los cuales impactan los diferentes compartimientos ambientales, principalmente el agua. Las aguas residuales son definidas como la combinación de residuos líquidos procedentes tanto de residencias como de instituciones públicas, establecimientos industriales y comerciales, a los que pueden agregarse, eventualmente, aguas subterráneas, superficiales y pluviales.

La compleja pregunta acerca de qué contaminantes contenidos en el agua residual y a qué nivel deberán ser eliminados para proteger al ambiente, no tiene una respuesta fácil y además requiere de una específica en cada caso. Para establecer ésta es preciso analizar las condiciones y necesidades locales, y aplicar los conocimientos científicos, sin dejar de considerar la normatividad correspondiente.

Sería de gran beneficio para la sociedad y sobre todo para la naturaleza, crear una conciencia de recuperación de aguas residuales que ha sido generada en algún proceso o actividad a través de un tratamiento adecuado, para hacerla reutilizable.

No es difícil deducir, que sí se logra recuperar toda el agua que se usa, sólo se necesitaría un mínimo de volumen de agua extraída de los mantos acuíferos, ríos, etc., para satisfacer nuestras necesidades. Esta situación parece una utopía, pero cualquier cantidad de agua que sea recuperada, redundará en la misma proporción del agua potable que se use y por lo tanto la cantidad que se extrae de la naturaleza. Para alcanzar lo anteriormente expuesto, es necesario aplicar y desarrollar tecnologías innovadoras para el tratamiento de aguas residuales, tanto municipales como industriales. Éstas deberán ser amigables con el medio ambiente.

Desde hace algunas décadas se han estado desarrollando métodos enzimáticos utilizando peroxidasas (Torres-Duarte y Vazquez-Duhalt, 2010; Torres et al., 2003).

La peroxidasa de origen vegetal más estudiada es la de rábano picante (HRP), esta enzima ha sido aplicada en el tratamiento de aguas residuales con distintos contaminantes como los fenoles de la industria del petróleo y de la fundición (Wagner y

Nicell, 2001; Cooper y Nicell, 1996; Uyama et al., 1994), anilinas (Van Deurzen et al., 1997), colorantes azo (Bhunja et al., 2001), entre otros.

Se sabe que alrededor del 90% de los colorantes textiles que entran a un proceso de tratamiento de aguas no son transformados por lo que son descargados como tales en los cuerpos de agua. Adicionalmente, es importante mencionar que en la actualidad no todos los colorantes pueden ser removidos por procesos químicos o físicos, además de que en ocasiones los productos de la degradación son aún más tóxicos.

En este trabajo de investigación se logró remover al fenol a diferentes concentraciones en agua artificialmente contaminada, obteniéndose porcentajes desde el 97.28 al 98.58% y de 99.60% para 2-clorofenol a 1000 ppm, utilizando un concentrado de peroxidasas de chayote (CPOCh). La caracterización espectroscópica de sus productos de oxidación mostró que se produjeron quinonas, así como sugiriendo la posible formación de dímeros tanto de fenol como de 2-clorofenol.

También se realizaron los estudios de remoción de colorantes ampliamente utilizados en la industria textil poblana como azul erionyl A-R, azul solofenil BF, azul cibacron FN-R, azul cibanón RS-JM y negro directo 22 en agua artificialmente contaminada a diferentes concentraciones, encontrándose valores del 95.9 al 99.6% para todos los colorantes. Además, la caracterización espectroscópica de los productos de oxidación de los colorantes negro directo 22 y azul solofenil BF, se identificaron principalmente como quinonas, con respecto al colorante azul erionyl A-R solo se logró demostrar que sufrió una reacción química.

Se obtuvo de una lavandería de mezclilla de Santa Ana Xalmimilulco, Puebla, dos muestras de agua residual con el colorante negro directo 22, después del tratamiento con el concentrado de peroxidasas de chayote se logró remover a éstas en un 83.31% para la obtenida al final del proceso (antes de ser descargada al ambiente) y de 93.20% a la muestra tomada directamente de una de las lavadoras de mezclilla.

1.2 JUSTIFICACIÓN

La calidad de vida en la Tierra está unida inexorablemente a la calidad global del ambiente. Actualmente, existen dos problemas fundamentales relacionados con la contaminación: la disposición de gran cantidad de desechos que están siendo producidos continuamente y la restauración de sitios que han sido contaminados con compuestos tóxicos. Dos familias de compuestos particularmente importantes por su impacto ambiental son los fenoles y los colorantes azo. Por un lado, los compuestos aromáticos como fenoles, polifenoles y aminas aromáticas se han detectado en aguas residuales industriales así como en rellenos sanitarios, esto se debe principalmente a la descarga directa de varias fuentes industriales emisoras, especialmente en las de manejo de la pulpa de madera, textil, química y de alimentos, además de otras fuentes de origen antropogénico (Michałowicz y Duda, 2007; Casella et al., 2010).

La toxicidad de los fenoles ha sido bien estudiada (Canadian Environmental Protection Act, 2010). Los vapores y líquidos del fenol son tóxicos y pueden ingresar fácilmente al cuerpo humano por vía cutánea y respiratoria lesionando a los pulmones. El contacto de la forma líquida con la piel y los ojos produce severas quemaduras, beber agua con niveles de fenol extremadamente altos ha producido temblores musculares, dificultad para caminar, daño intestinal grave y la muerte. La Administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos de Norteamérica (FDA, por sus siglas en inglés) ha determinado que la concentración de fenol en agua embotellada no debe exceder a 0.001 mg/L (Agency for toxic substances and disease registry, 1999). En cuanto a los derivados de fenol, el nonilfenol es un intermediario metabólico de la transformación microbiana de detergentes utilizados a nivel mundial, éste es capaz de causar alteraciones endocrinas en diversos organismos como peces ocasionándoles la feminización del fenotipo (Vazquez-Duhalt et al., 2005).

La industria textil es una de las principales fuentes de contaminación, descarga aguas que contienen una amplia variedad de colorantes tipo azo, dispersos, ácidos y básicos. Los colorantes azoicos son los tintes más comúnmente utilizados en la industria textil y por lo tanto constituyen el grupo más grande de todos los colorantes orgánicos en el mercado (Board, 2003; Gregory, 2000). Su toxicidad se debe a que producen aminas

aromáticas durante los procesos naturales de degradación (Weiburger, 2002; Sandhya, 2010; Golka et al., 2004; Gnanamani et al., 2004). Adicionalmente, los colorantes azo afectan la calidad del agua al evitar el paso de luz y por el aumento de la demanda química de oxígeno.

El Corredor Industrial Huejotzingo se encuentra ubicado al este de la comunidad de Santa Ana Xalmimilulco, en donde se encuentran industrias de diferentes giros, generando un polo de desarrollo importante. Entre las industrias relacionadas con este trabajo existen empresas medianas y pequeñas que maquilan a la industria textil de la mezclilla; desarrollando actividades que son desde el decolorado, deslavado o teñido, hasta la costura de prendas de mezclilla. Este tipo de maquila o lavanderías como se le denomina localmente, se ubica principalmente en las viviendas de comunidades como San Rafael Tenanyecac, Villa Alta, San Mateo Ayecac y Santa Ana Xalmimilulco (Juárez, 2004).

En la cuenca del río Atoyac, en la que se asientan las ciudades de Puebla y Tlaxcala, los principales giros industriales son: textil (24%), química y petroquímica (23%), bebidas (4%), metalmecánica (6%), papel (10%), alimenticio (8%), automotriz y autopartes (17%), otros (8%). De aquí se observa que el giro textil es el principal generador de aguas residuales y se tienen registradas 48 descargas de este tipo, cuyo volumen se estima en aproximadamente 6340 m³/d (Saldaña, 2006), estas actividades manufactureras textiles, además de crear prosperidad económica en municipios de Puebla y Tlaxcala han generado una contaminación importante del agua de ambos estados, afectándola, ya que en el proceso de lavado de la mezclilla que realizan las lavanderías se requiere de una gran cantidad de agua de primer uso, la cual al final del proceso contienen además de los colorantes, aditamentos químicos utilizados para tratar las prendas y darles diferentes acabados. Por lo tanto, las aguas residuales que producen contienen diversos contaminantes químicos que se descargan al drenaje municipal o canales de riego la mayoría de las veces, sin tratamiento o con tratamientos inadecuados, que finalmente desembocan en el río Atoyac.

En el municipio de Tepetitla, Tlaxcala, los talleres de lavado producen en conjunto 797600 prendas de mezclilla al año, y se estima que para realizarlo requieren un volumen de 7952 m³ de agua de primer uso, que es el insumo fundamental de su

proceso. La empresa textilera Tarrant-México descarga un volumen de 9460.8 m³ siendo superior a la de todas las lavanderías, lo que indica que esta empresa es la principal contribuyente a la contaminación del río Atoyac en esta zona (Rodríguez-Tapia y Morales, 2011).

En el año 2004 la Doctora Regina Montero Montoya, del Departamento de Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, realizó un estudio biológico en el que se observó que el 71% de los donadores de sangre de las comunidades de Villa Alta, San Mateo Ayecac, San Mateo Tepetitla, San Rafael Tenanyecac, Santa Justina Ecatepec del estado de Tlaxcala, Santa Ana Xalmimilulco y San Francisco Tepeyecac pertenecientes al Estado de Puebla, presentaron incrementos de neutrófilos en banda por arriba de los parámetros normales, sin que importara el género ni la actividad económica, lo que indica la existencia de un proceso inflamatorio como consecuencia a la exposición a sustancias químicas tóxicas (Palma y Morales, 2011).

Los pobladores están enfermando de anemia, púrpura trombocitopénica, leucemia, insuficiencia renal, leucopenia, malformaciones congénitas, entre otras, y no cuentan con atención médica especializada ni medicamentos gratuitos, lo cual conlleva a las familias a desprenderse de todo su patrimonio, sin que ésto garantice que su familiar enfermo sobreviva (González et al., 2013).

Por otro lado en Tehuacán hay más de 25 lavanderías (unas doce legales y las demás clandestinas), la mayoría de las cuales no tiene plantas de tratamiento. Cada máquina de lavado usa más de un millón y medio de litros de agua por jornada. En una semana, una de éstas gasta más de 100 millones de litros, y sus aguas residuales contienen diversos compuestos químicos que se utilizan durante el proceso de lavado, envejecimiento y desgaste artificiales de la mezclilla (García y Fuentes, 2008).

Los procesos biotecnológicos, en particular los enzimáticos, para el tratamiento ambiental son considerados procesos sustentables debido a las condiciones de reacción empleadas, las cuales son amigables con el ambiente, además hay una menor o nula generación de lodos, no se usan reactivos químicos tóxicos y al ser catalizadores biológicos estos son fácilmente biodegradables.

Se están desarrollando métodos enzimáticos utilizando peroxidasas para la descontaminación de aguas residuales industriales que han demostrado ser prometedores para la eliminación de colorantes y compuestos fenólicos (Husain, 2010; Guerrero et al., 2013; Rodakiewicz-Nowak, 2000; Huang et al., 2002; Kennedy et al., 2002; Marilize et al., 2011).

Dado que México cuenta con una gran biodiversidad, sería de gran utilidad extraer peroxidasas de fuentes vegetales que puedan ser utilizadas en los procesos de remediación de aguas.

Una candidata a sustituir a la HRP es la peroxidasa de chayote (POCh) (Villegas et al., 2003). De esta enzima, se han identificado tres isoenzimas (F1P, F2P y F3P) y el estudio de espectroscopía electrónica de la F3P mostró que presenta gran similitud con la peroxidasa HRP.

Por lo anterior, en este trabajo de investigación se estudio el potencial de un concentrado de peroxidasas de chayote (*Sechium edule Sw*) para oxidar compuestos fenólicos y colorantes tipo azo, oxazina y antraquinona. El tratamiento se realizó en aguas artificialmente contaminadas así como en agua residual proveniente de una lavandería de mezclilla de la comunidad de Santa Ana Xalmimilulco, Puebla.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 General:

Determinar las condiciones para la remoción de los contaminantes fenol, 2-clorofenol y colorantes textiles comerciales en aguas artificialmente contaminadas y en aguas residuales de una lavandería de mezclilla utilizando un concentrado de peroxidasas de chayote (*Sechium edule Sw*).

1.3.2 Particulares:

1. Obtener un concentrado de peroxidasas de chayote (CPOCh)
2. Determinar el perfil catalítico del CPOCh a diferentes pH y temperatura
3. Determinación del tiempo de estabilidad del CPOCh en función de la temperatura
4. Realizar el estudio cinético del CPOCh
5. Determinar los porcentajes de transformación y remoción de los productos de reacción en agua artificialmente contaminada a diferentes concentraciones tratadas enzimáticamente
6. Determinar el porcentaje de remoción de los colorantes negro directo 22, azul solofenil BF, azul erionyl A-R, azul cibacron FN-R y azul cibanon RS-JM de aguas artificialmente contaminadas a diferentes concentraciones utilizando al CPOCh
7. Caracterizar mediante técnicas espectroscópicas a los productos de reacción tanto de fenoles como de los colorante negro directo 22 y azul solofenil BF
8. Determinar las condiciones de remoción del colorante negro directo 22 en un agua residual de una lavandería de mezclilla utilizando al CPOCh

CAPÍTULO II

2.1. Antecedentes

2.1.1. Historia y generalidades

Las enzimas son catalizadores biológicos que aceleran la velocidad de las reacciones miles o millones de veces en forma específica, selectiva y al igual que un catalizador químico sin presentar en su molécula cambios significativos al final de la reacción. Las enzimas poseen tres características inigualables (Rittmann y McCarty, 2001):

- a) Son los catalizadores más eficientes conocidos, ya que pueden acelerar una reacción a una velocidad extremadamente rápida con cantidades muy pequeñas, del orden de nano o micromolar.
- b) La mayoría de las enzimas se distinguen por una especificidad de acción, en que virtualmente cada conversión de un reaccionante (llamado sustrato) a un producto es catalizado por una clase de enzima.
- c) La acción de muchas enzimas está regulada, es decir, son capaces de cambiar de un estado de baja actividad a uno de alta actividad.

En general, las enzimas poseen algunas ventajas sobre los catalizadores químicos convencionales, como son: su alta especificidad, que elimina casi totalmente la presencia de productos no deseables y aumenta en consecuencia la eficiencia de cualquier transformación en que son utilizadas. Las condiciones ambientales en las que operan (bajas temperaturas y pH cercano a la neutralidad) lo que disminuye los gastos de energía y protegen el equipo de procesos contra la corrosión. Las altas velocidades de reacción reducen considerablemente los costos del proceso (López, 1986).

Las enzimas se clasifican en 6 clases diferentes, dependiendo del tipo de reacción que catalizan (Horton et al., 2008).

1. Óxido-reductasas: enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción
2. Transferasas: enzimas que catalizan la transferencia de grupos funcionales
3. Hidrolasas: enzimas involucradas en reacciones de hidrólisis
4. Liasas: enzimas que catalizan la liberación de grupos de los sustratos, por mecanismos distintos a la hidrólisis, facilitando la adición a dobles enlaces
5. Isomerasas: enzimas catalizadoras de reacciones de isomerización
6. Ligasas: enzimas involucradas en la unión de dos moléculas, acoplada con la hidrólisis de adenosintrifosfato (ATP) u otro compuesto con enlace de alta energía

Dentro de las óxido-reductasas se tienen a las peroxidasas (POD) que se encuentran distribuidas en todos los reinos: vegetal, animal y fungi (Keilin y Hartree, 1989). Sus funciones son variadas, por ejemplo peroxidasas importantes como lactoperoxidasa en la leche, saliva y lágrimas, cuya función es la protección en contra de microorganismos; la mieloperoxidasa de leucocitos involucrada en procesos fagocitarios y la peroxidasa de tiroides involucrada en la biosíntesis de la hormona tiroxina y triyodotironina (Dunford, 1999). Debido a la naturaleza oxidativa de las peroxidasas, hay varias áreas en donde podrían reemplazar rápidamente las técnicas oxidativas químicas actuales (Casella et al., 2000; Torres y Ayala, 2013). Varias clases de peroxidasas están siendo ampliamente estudiadas por su potencial aplicación en procesos industriales como el blanqueo del papel en el proceso Kraft, en donde estas enzimas podrían sustituir las grandes cantidades de cloro que se usan actualmente y prevenir la formación de compuestos tóxicos halogenados durante el proceso (Bansal et al., 2010; Torres-Duarte y Vazquez-Duhalt, 2010; Viikari, 2000).

Por otra parte, la implementación de regulaciones ambientales cada vez más estrictas para el desecho de residuos peligrosos, ha creado la necesidad de buscar nuevas tecnologías de tratamiento, amigables con el ambiente, para complementar o sustituir a las convencionales.

El empleo de enzimas para el tratamiento de problemas ambientales requiere que posean características funcionales diferentes a las utilizadas para la síntesis; es decir, se requiere de enzimas poco específicas y selectivas, de tal manera que puedan catalizar la transformación de una amplia variedad de compuestos contaminantes. Además, es deseable que sean robustas a las condiciones del proceso, dado que las aguas residuales tienen composición variable, en ocasiones con efluentes a temperatura alta, contenido elevado de sales y otros compuestos que pueden inhibir su actividad catalítica (Torres et al., 2003).

La peroxidasa más estudiada en el tratamiento ambiental es la HRP, la cual es estable a temperatura ambiente por largos periodos de tiempo en un intervalo amplio de pH de 5 a 11 (Haschke y Friedhoff, 1978), tiene una masa molecular de 40 kDa y un pH óptimo de 7.0 para su actividad enzimática. Preparaciones de HRP purificadas cromatográficamente presentan actividad hasta los 80°C durante 10 min (García et al., 2003). Además, está disponible comercialmente en grandes cantidades, sin embargo, su variabilidad de sustratos reconocidos no es muy amplia, por lo que se requiere de una búsqueda constante de enzimas con capacidad de oxidar contaminantes orgánicos (Regalado et al., 2004; Verstraete, 2002).

2.1.2 Peroxidasas

Las peroxidasas son una superfamilia de enzimas que utilizan peróxido de hidrógeno o peróxidos orgánicos para oxidar sustratos de estructura química variada (Zámocký y Obinger., 2010; Dunford, 1999). Sus funciones abarcan las defensivas, de protección, antioxidante, de síntesis y degradación.

Las peroxidasas contiene en su interior un grupo hemo (figura 1), el cual es el centro activo de la enzima, en donde los sustratos son oxidados mediante la remoción de dos electrones (Ortiz de Montellano, 2010).

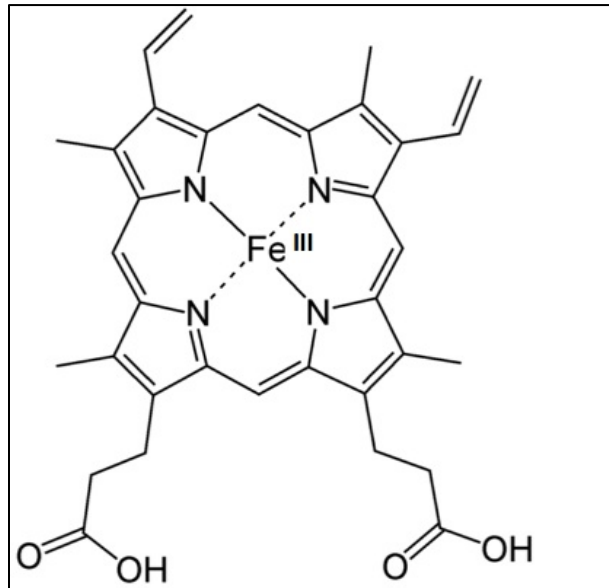
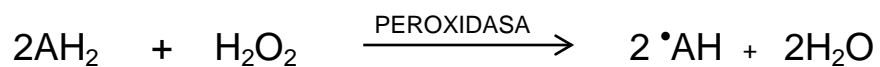


Figura 1. Estructura del grupo hemo.

El grupo hemo se encuentra unido no covalentemente a la proteína principalmente mediante puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. El hierro del grupo hemo se encuentra hexacoordinado, cuatro enlaces con los nitrógenos de los pirroles, y dos más con los pirroles de las histidinas de la proteína. La reacción general que catalizan las peroxidases [E.C.1.11.1.7] se muestra en la ecuación 1:



Ecuación 1. Reacción general de peroxidases

Como puede verse en la ecuación 1, un mol de peróxido de hidrógeno produce la oxidación de dos moles del sustrato reducido. El mecanismo de reacción de las peroxidases se observa en la figura 2.

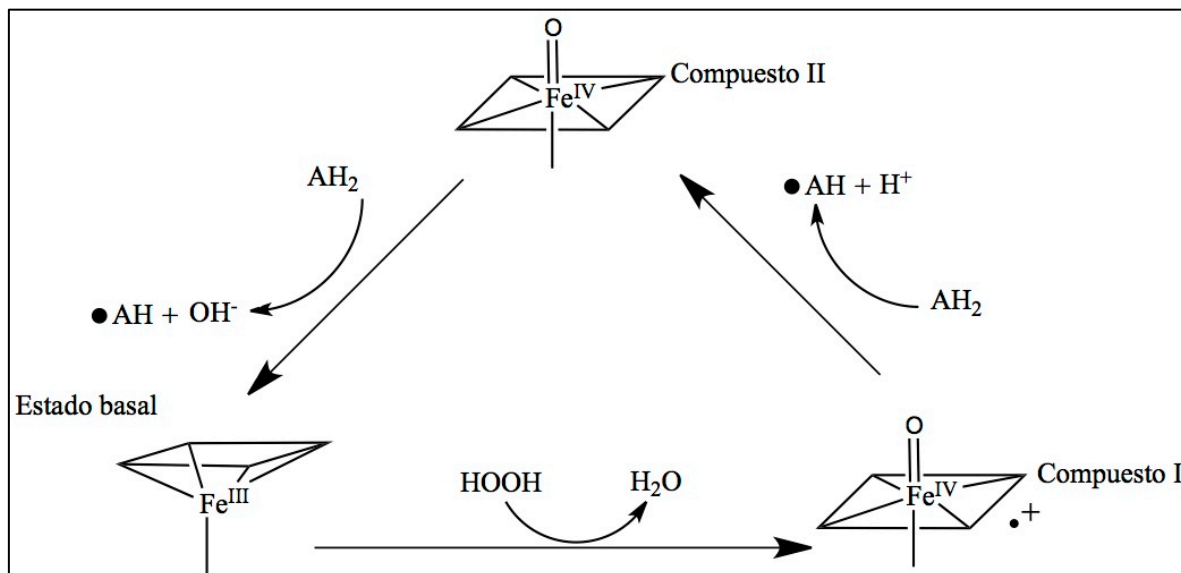


Figura 2. Mecanismo de reacción de las peroxidasas (Ortiz de Montellano, 2010).

2.1.3. Oxidación de fenoles y derivados

Los fenoles son alcoholes aromáticos compuestos de moléculas que tienen un grupo -OH unido a un átomo de carbono de un anillo bencénico. El fenol, C₆H₅-OH, es el nombre dado al alcohol aromático más sencillo. La mayoría de los demás fenoles se nombran como derivados del mismo. Son ampliamente utilizados en la industria, por ejemplo en (Atanor, 2010):

- Fabricación de resinas fenólicas en la industria plástica
- Fabricación de desinfectantes (derivados clorados del fenol)
- Fabricación de herbicidas, insecticidas y fungicidas (cresoles)
- Constituyentes de pinturas germicidas y agentes de impregnación de maderas (pentaclorofenol)
- Antioxidantes en las industrias del caucho (metilfenoles)
- Reactivo de síntesis orgánicas: ácido salicílico, fenolftaleína, ácido pícrico, benceno, clorofenoles, ciclohexanol y diversas drogas farmacológicas

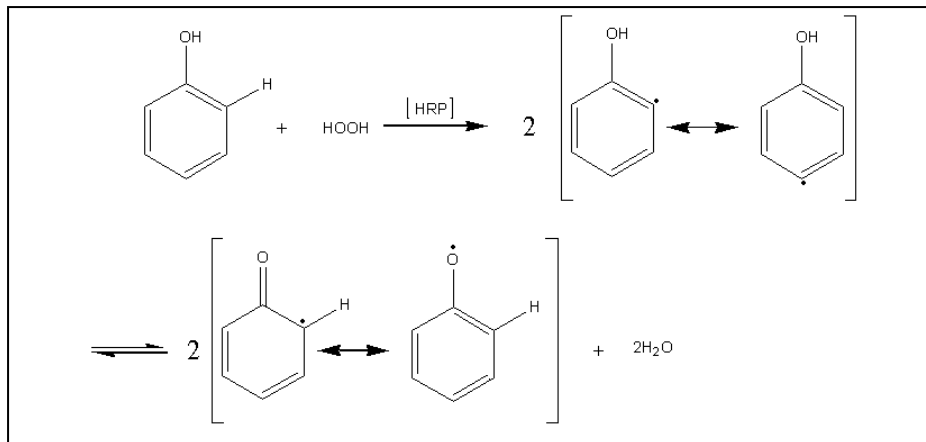
- En la industria textil, para los procesos de tintura, desgomado e impermeabilización de seda, mercerizado e impresión de telas.

Su amplio e intenso uso lo hace también ser un compuesto altamente contaminante debido a ineficiencias de procesos, mala disposición de productos, accidentes y falta de tratamiento en las aguas de proceso.

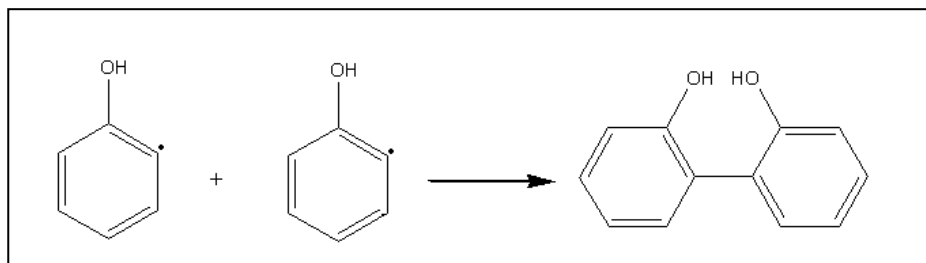
En años recientes se ha propuesto el uso de peroxidasas para el tratamiento de diversos efluentes como el de la industria de refinación del petróleo y la fundición. En la tabla 1 se observa el efecto del tratamiento enzimático sobre un efluente de aguas fenólicas proveniente de la industria de refinación del petróleo. Los parámetros determinados son la demanda química de oxígeno, la demanda bioquímica de oxígeno y la toxicidad. Como se observa, el tratamiento tanto con la HRP como con la peroxidasa de *Arthromyces ramosus* disminuye el contenido de fenoles hasta un 96% en el efluente complejo, además, la DQO y la DBO₅ disminuyeron a niveles aceptados por la norma americana. Finalmente la toxicidad disminuyó 27 veces (Vazquez-Duhalt et al., 2002).

Tabla 1.		Tratamiento enzimático de agua residual de la refinaria del petróleo.		
Parámetro	No tratada	Tratada con peroxidasa de <i>Horseradish</i>	No tratada	Tratada con peroxidasa de <i>Arthromyces ramosus</i>
Fenoles totales (mM)	0.353	0.013	2.02	0.606
Demanda química de oxígeno (mg/L)	306	128	482	180
Demanda bioquímica de oxígeno ₅ (mg/L)	93.7	20	NR	NR
Toxicidad (Microtox TU ₅₀)	57	2.1	NR	NR
NR: no reportado				

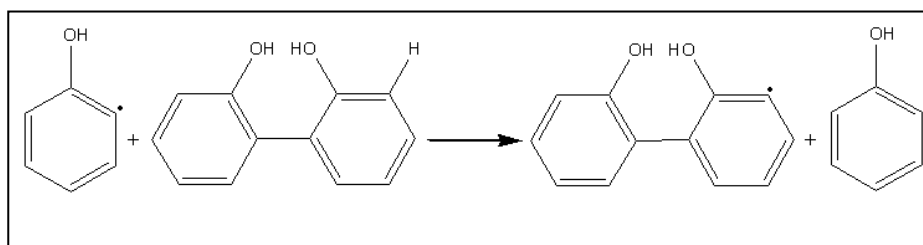
La oxidación de fenoles por peroxidases produce radicales libres que generalmente se acoplan en el medio de reacción para producir dímeros, trímeros y polímeros de más de 4 moléculas de fenol, las cuales pueden ser eliminados del agua fácilmente por filtración. Respecto a la toxicidad se ha reportado que la toxicidad de los productos de polimerización catalizada por peroxidasas de soya y HRP de fenoles sustituidos, en la mayoría de los casos es significativamente menor que la toxicidad inicial de la solución, el descenso de ésta se debe a que los productos formados mediante la enzima son matrices poliméricas de fenol (Ghiourelotis y Nicell, 2000). La polimerización se realiza a través de radicales fenoxi mediante una reacción de policondensación (ecuaciones de la 2 a la 5) (Dunford, 1982; Dec y Bollag, 1994; Nayak, 1998; Reihmann y Ritter, 2001, 2005).



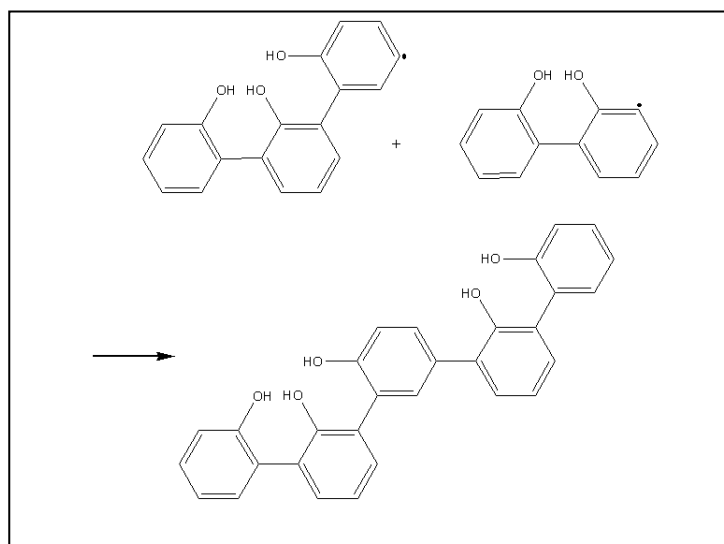
Ecuación 2. Formación de radicales libres fenoxi.



Ecuación 3. Recombinación de radicales fenoxi.



Ecuación 4. Transferencia de radicales.



Ecuación 5. La cadena crece alternando la transferencia de electrones y recombinación.

Los productos generados durante la oxidación enzimática catalizada por peroxidasas de fenoles podrían tener aplicaciones en la industria de detergentes, fotolitografía, baterías ligeras recargables, recubrimientos electromagnéticos y como conductores con aplicaciones electrónicas y electroópticas (Akkara et al., 2002),

Entre otras aplicaciones importantes de las peroxidasas tenemos la oxidación enantioselectiva de sulfuros, la epoxidación de alquenos, la nitración selectiva de fenoles, oxidación de epoxialcoholes racémicos (Casella et al., 2010), oxidación de una amplia variedad de contaminantes orgánicos aromáticos como plaguicidas organoclorados y organofosforados, hidrocarburos policíclicos aromáticos, colorantes, y fenoles, entre otros; cuyos productos oxidados presentan una toxicidad considerablemente menor, en ocasiones nula, y una mayor biodegradabilidad (Qayyum, 2009).

2.1.4. Colorantes

Los colorantes son compuestos químicos orgánicos muy estables que poseen una afinidad química o física hacia las fibras, tienden a mantener su color a pesar del desgaste y de la exposición a la luz solar, agua o los detergentes. A través de los años, la magnitud de su producción y su naturaleza química ha cambiado drásticamente y como consecuencia, su impacto negativo en el ambiente se ha incrementado (Morais et al., 1999). Cada año nuevos colorantes se han desarrollado, los cuales, por la naturaleza de su función son más resistentes a la luz, a la acción biológica, a los agentes oxidantes y a detergentes (Gregory, 2000) Se producen grandes cantidades de colorantes y se usan en diversos procesos incluyendo los textiles, industria de pulpa y papel (Venkata y Sastry, 1987), pigmentos para pinturas, tintas de impresión, colorantes de alimentos y cosméticos, entre otros. Existen más de 10000 colorantes cuya producción es de más de 7×10^5 toneladas por año (Fu y Viraraghavan, 2001).

Estimaciones recientes indican que entre 12 y 50% de los colorantes sintéticos textiles usados cada año se pierden durante la manufactura y operaciones de procesamiento y el 20% de éstos entran al ambiente a través de los efluentes resultantes del tratamiento de las aguas residuales industriales (Riu et al., 1997; Hansa et al., 1999; Morais et al., 1999). La eliminación de los colorantes del agua residual es un problema serio debido a que estos productos no pertenecen a un

solo grupo de compuestos químicos por lo que presentan diferencias en solubilidad, volatilidad, ionización, etc.

Más del 90% de los colorantes registrados en la *Association of Dyestuffs Manufacturing Industry* presentan valores de $LD_{50} 2 \times 10^3$ mg/kg (Robinson et al., 2001). Muchos de estos colorantes sintéticos no son degradados en plantas biológicas. De acuerdo a información reciente, la industria textil es la consumidora más grande de estos productos, abarcando dos terceras partes de los colorantes producidos.

Entre los grupos más importantes de colorantes están los del tipo azo, los difenil y triarilmetanos, las ftaleínas, las azinas, las cumarinas, los índigos y las antraquinonas, siendo los colorantes azo sulfonados los más usados en la industria textil, utilizados para dar color a fibras naturales, principalmente.

La clasificación de los colorantes en función de su aplicación, es amplia y entre ellas se encuentran (Hansa et al., 1999; Wittcoff y Reuben, 1985):

Directos. Producen colores firmes en fibras colocadas directamente en una solución de colorante. Se aplican en el teñido de fibras de celulosa como algodón, rayón y lino

Indirectos. Solo producen colores firmes en fibras tratadas antes o después del teñido, el teñido indirecto consiste en un tratamiento previo del tejido con una solución fijadora denominada mordiente, seguido de su inmersión en un baño del colorante

Reactivos. Reaccionan con la fibra textil en el proceso de teñido, creando un enlace covalente. Son típicamente bases azo cromóforas combinadas con diferentes tipos de grupos reactivos

Ácidos (aniónicos). Contienen grupos ácidos (sulfónico, carboxilo), forman sales en combinación con bases, no forman soluciones ácidas, poseen una naturaleza

aniónica debido a la carga negativa de los grupos sulfonados, se utilizan en fibras proteicas como lana y seda

Básicos (catiónicos). Forman sales en combinación con ácidos, poseen propiedades catiónicas originadas por átomos de nitrógeno o azufre cargados positivamente. Se utilizan en el teñido de fibras acrílicas

Dispersos. Se emplean como dispersiones acuosas de colorantes finamente divididos o suspensiones coloidales que forman soluciones firmes del colorante dentro de la fibra. Se aplican en el teñido de poliéster, algodón/poliéster, nylon y acetato.

Por otra parte, la degradación de colorantes azo por reducción producen varias aminas aromáticas que son más tóxicas y cancerígenas que ellos mismos. Cuando las aminas aromáticas entran al cuerpo humano mediante las cadenas tróficas son transformadas en aciloxiaminas las cuales desnaturalizan al DNA (Takahashi y Hashimoto, 2001).

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), por lo se ha propuesto la degradación aeróbica de varios colorantes azo (Goszczyński et al., 1994; Chivukula et al., 1995).

Extractos de cultivos de sistemas lignolíticos de hongos se han probado en la degradación de colorantes, Shin et al. (1997) mostraron que el hongo comestible *Pleurotus ostreatus* produce peroxidasa extracelular que puede decolorar al azul brillante remazol y posteriormente Shin y Kim (1998), probaron su eficacia en la decoloración de 4 estructuras químicas diferentes pertenecientes a colorantes del tipo triacilmetano, heterocíclicos, azo y poliméricos.

Algunos autores han demostrado que la degradación oxidativa de compuestos coloreados es posible mediante enzimas oxidativas (Husain, 2010; Graça et al. 2006).

Varios autores realizaron estudios para intentar elucidar el mecanismo de la degradación de colorantes azo mediante reacciones catalizadas por peroxidasas. Se proponen principalmente dos tipos de ruptura: una asimétrica, de manera que el enlace azo permanece intacto formando parte de uno de los productos resultantes y una ruptura simétrica, en que se rompe el doble enlace -N=N-. Los principales trabajos acerca del mecanismo son:

- Spadaro y Renganathan (1994) estudiaron el mecanismo de degradación del colorante azo Disperse Yellow 3 naftol por la lignino peroxidasa (LiP) y la HRP, el análisis se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Se encontró la liberación de nitrógeno molecular y la formación de dos productos finales principales: 1,2-naftoquinona y acetanilida (figura 3).

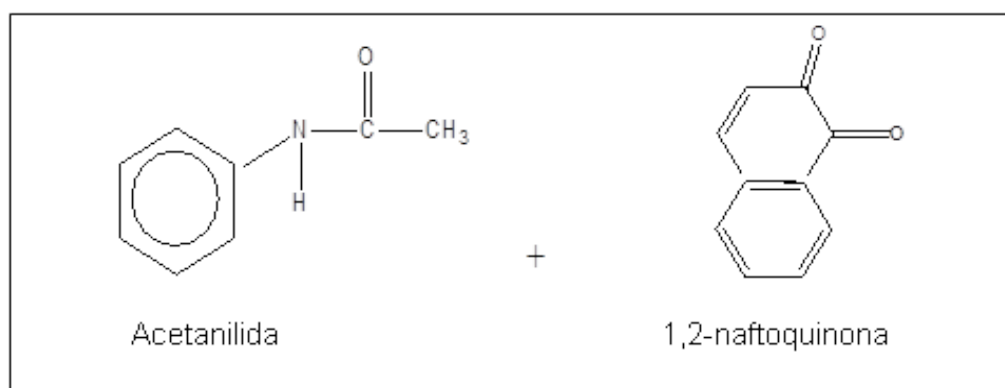


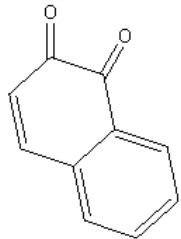
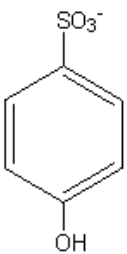
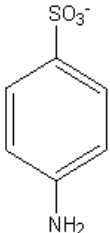
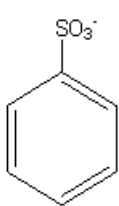
Figura 3. Productos finales de la degradación del colorante azo Disperse Yellow 3 naftol producidos por peroxidasas.

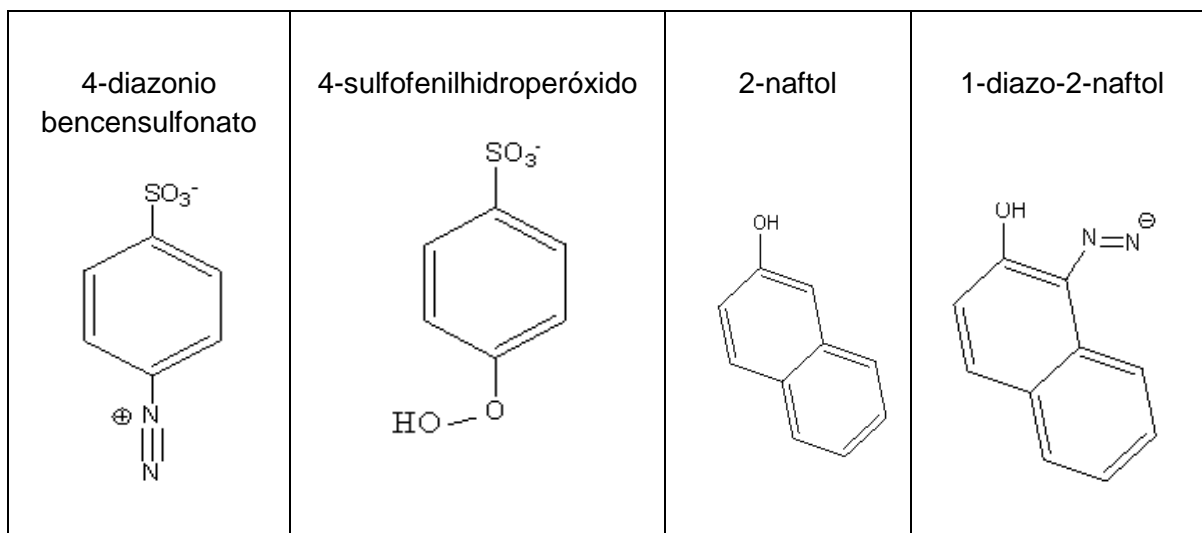
- Goszczynski et al. (1994) sugirieron dos mecanismos diferentes para la degradación de colorantes azo sulfonados por la manganeso peroxidase (MnP) y LiP. El primero se basa en la ruptura simétrica del grupo azo que daría lugar a la formación de quinona monoamina y derivados nitrosos como productos de oxidación directos; el segundo es una ruptura asimétrica que conduce a la formación de quinona y derivados fenildiaceño. Estos compuestos pueden seguir

reaccionando mediante reacciones espontáneas y dar lugar a la formación de productos secundarios. Estos autores emplearon como técnicas analíticas cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) y GC-MS tras la extracción y derivatización de las muestras.

- Chivukula et. al. (1995) caracterizaron 1,2-naftoquinona y 4-sulfonfenilhidroperóxido como productos finales, mediante HPLC, GC-MS, bombardeo rápido de átomos-espectrometría de masas (FAB-MS) y espectrometría de masas con ionización por electroespray (ESI-MS), de la degradación de Orange II por la LiP.

- López-Díaz (2005) propone que la degradación del Orange II con MnP conduce a la formación de hasta 8 subproductos que se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Subproductos de la degradación del Orange II mediante manganeso peroxidasa.			
1,2 naftoquinona	4-hidroxibencensulfonato	Sulfanilato	Bencensulfonato
			



Por otro lado, se analizaron varios productos de degradación presentes en el medio de reacción y se observó que al menos dos de ellos presentaron toxicidad (de acuerdo con la test Microtox), sin embargo, dichos compuestos se generaron en pequeñas concentraciones y durante el proceso de degradación enzimática la toxicidad de la muestra disminuye considerablemente del orden de 8 veces, por lo que el proceso no contribuye al aumento de la toxicidad del efluente (López-Díaz, 2005).

La enzima peroxidasa DyP es producida por el basidiomiceto *Thamatephorus cucumeris* Dec I y es una nueva familia de peroxidasas distinta a las clasificadas hasta este momento (Sugano, 2009). Existen muchos estudios de la degradación de colorantes azo por peroxidasas fúngicas y pocos para la degradación de antraquinonas por peroxidasas, por otra parte varios colorantes de antraquinona son degradados por DyP incluyendo el azul 5 reactivo (Sugano, 2009). Los productos de reacción han sido analizados por electroespray-cromatografía de gases y resonancia magnética nuclear, detectando cuatro de ellos: ácido ftáico, producto 2 desconocido (masa molecular 472.5), producto 3 desconocido (masa molecular 301.5). Los productos 2 y 3 son generados por la reacción de peroxidasas, mientras que el ácido ftáico fue producido por reacción de hidrolasas u oxigenasas. Un producto asociado el *o*-aminobencensulfónico ácido

se encontró que se convierte a 2,2-disulfonilazobenceno por análisis de ESI-MS y NMR (figura 4) (Sugano et al., 2009).

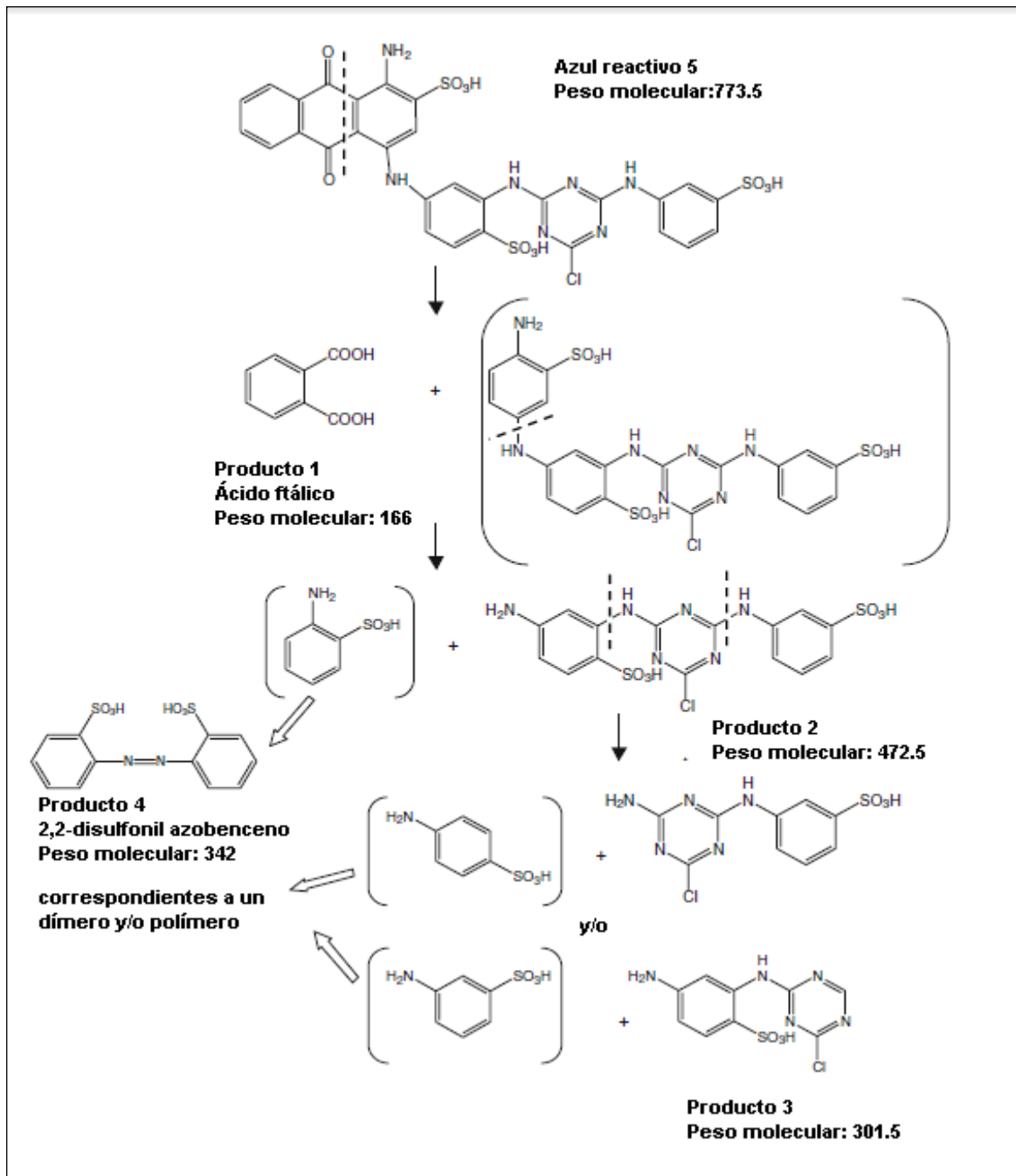


Figura 4. Producto de degradación del colorante de antraquinona azul reactivo 5 por acción de la peroxidasa DyP de *Thamatephorus cucumeris* Dec I (Sugano et al., 2009).

2.1.5. Estudio cinético

2.1.5.1 Comportamiento de Michaelis-Menten

Los primeros conocimientos sobre el comportamiento enzimático se deben a V. Henri (1903) y más tarde a Leonor Michaelis y Maud Menten (1913). El trabajo experimental de Michaelis y Menten demostró que cuando la concentración de sustrato [S], se mantiene constante y se varía la concentración de la enzima [E] se observa un incremento lineal en la velocidad al aumentar la concentración de la enzima (figura 5a) mientras que, cuando se mantiene constante la concentración de la enzima y se varía la concentración de sustrato, se observa una relación hiperbólica entre la velocidad y la concentración del sustrato (figura 5b). Se observa en la gráfica hiperbólica la transición de una cinética de primer orden ($v_o \propto [S]^1$) a una de orden cero ($v_o \propto [S]^0$).

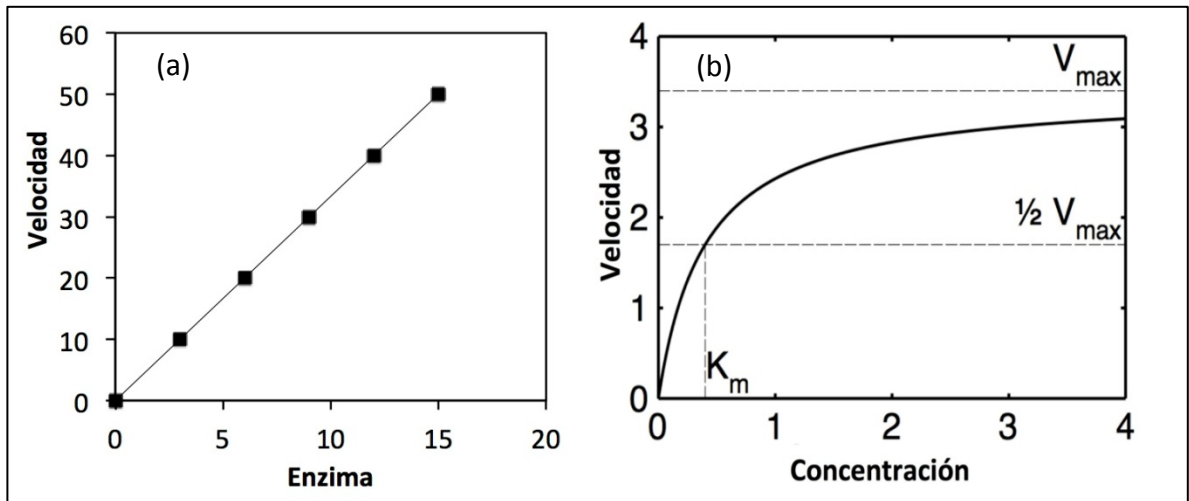
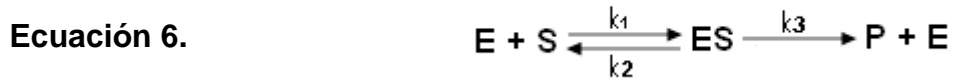


Figura 5. Características cinéticas de una reacción catalizada por enzimas, relación lineal entre la V_0 y la [E] y relación hiperbólica de la V_0 y la [S].

A partir de esto, ellos postulan un modelo sencillo para explicar ese comportamiento. Proponen que la enzima E, puede combinarse de forma

reversible con el sustrato S, para formar un complejo intermediario compuesto por la enzima y el sustrato "ES", el cual posteriormente se descompone para formar los productos P y la enzima libre en su forma original (ecuación 6).



La etapa determinante es la ruptura de ES para formar P + E; por lo tanto, limita la velocidad de reacción global y la velocidad total debe ser proporcional a la concentración del complejo enzima-sustrato "[ES]. En consecuencia se puede decir que la velocidad de la reacción es la velocidad de formación de los productos (ecuación 7).

Ecuación 7.

$$V_o = k_3 [ES]$$

Puesto que la [ES] no es fácilmente medible experimentalmente se debe de encontrar una expresión alternativa para su determinación.

Finalmente, la forma de la ecuación cinética clásica de Michaelis–Menten, que corresponde a la de una hipérbola regular con V_o y [S] como coordenadas y con la constante de velocidad máxima (V_{max}) como asíntota de la gráfica (figura 6, ecuación 8)

Ecuación 8.

$$V_o = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

La V_{max} de la reacción catalizada es observada cuando casi toda la enzima está presente como el complejo enzima-sustrato "[ES] y la enzima libre [E], es muy pequeña. Bajo estas condiciones, la enzima está saturada con su sustrato, así

que, el incremento de la concentración de sustrato [S], no tiene efecto sobre la velocidad. Cuando $V_o = V_{max}$ todos los sitios activos están ocupados y no hay moléculas de enzima libres, esta condición se llama saturación al 100%. La ecuación 9 representa cuando la saturación es del 50%, y por lo tanto $V_o = 1/2 V_{max}$.

Ecuación 9.
$$V_o = \frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

que se reduce a la ecuación 10.

Ecuación 10.
$$K_m + [S] = 2 [S] \text{ o } K_m = [S]$$

Así, la K_m tiene unidades de concentración y representa la cantidad de sustrato necesaria para unirse a la mitad de la enzima disponible y producir la mitad de la máxima velocidad (figura 6). Una enzima con un valor de K_m alta requiere una concentración de sustrato mayor para alcanzar una velocidad de reacción que una enzima con K_m baja. La K_m es específica de cada reacción; para una determinada enzima que actúe sobre un sustrato dado (Bohinski et al., 1998; Mathews et al., 2000).

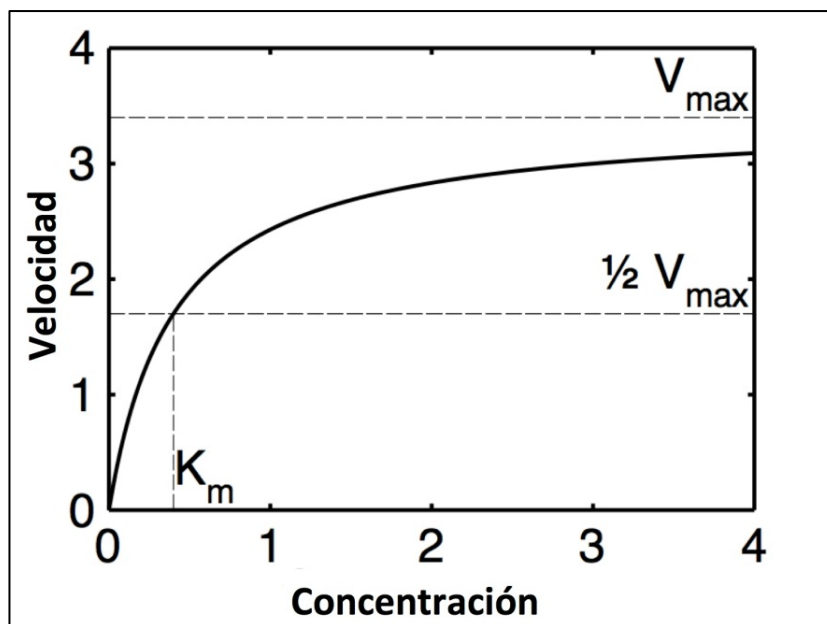
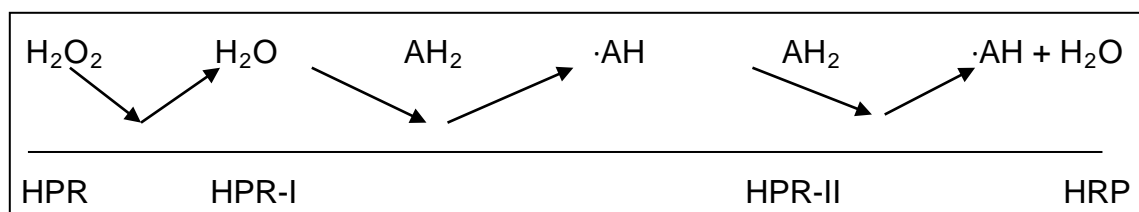


Figura 6. La mitad de la velocidad máxima se alcanza cuando la concentración de sustrato es igual a la constante de Michaelis-Menten (K_m).

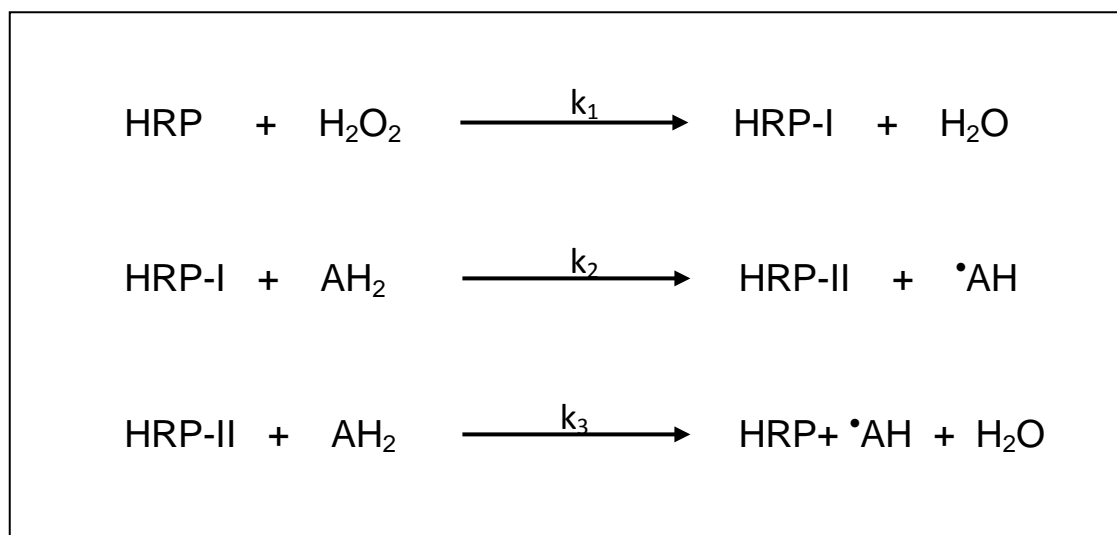
2.1.6. Modelo enzimático de peroxidasas

Las peroxidasas catalizan la oxidación de una gran variedad de moléculas orgánicas e inorgánicas a expensas del peróxido de hidrógeno que es el aceptor final de electrones.

El ciclo normal por el que la HPR cataliza una reacción de oxidación es conocido como mecanismo de ping-pong peroxidasa (George, 1953; Dunford, 1991). Éste involucra a la enzima con dos sustratos y se propone que en cada etapa de la reacción entra un sustrato y sale un producto. En las ecuaciones 11 y 12 se representa esquemáticamente dicho mecanismo.



Ecuación 11. Mecanismo de ping-pong peroxidasa.

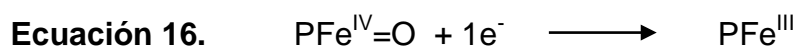
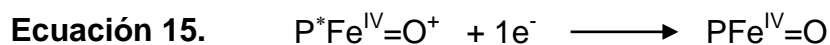
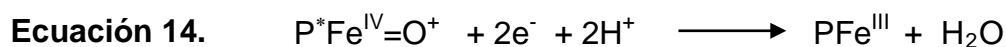
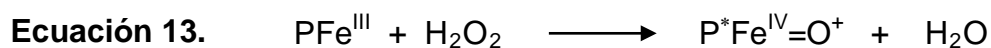


Ecuación 12. Etapas del mecanismo pin pong de la reacción de HRP.

En la ecuación 12, HRP representa a la enzima nativa, HRP-I y HRP-II son formas oxidadas de la enzima con dos y un equivalentes de oxidante, respectivamente, y son denominados compuesto I y compuesto II, AH_2 es un sustrato oxidable y $\cdot AH$ es un radical libre (Dunford, 1991).

Dos equivalentes de oxidante del H_2O_2 son transferidos a la proteína resultando el intermediario llamado compuesto I (English, 1994) que puede representarse como $P^*Fe^{IV}=O^+$ de acuerdo con la ecuación química 13. La enzima en reposo está representada por PFe^{III} . El compuesto I indica que la fuente de un electrón es el ion Fe^{III} , el cual es oxidado a una especie Fe^{IV} denominado oxoferrilo ($P^*Fe^{IV}=O^+$), y P^* es el radical π -porfirínico que es la fuente del segundo electrón. El

compuesto I puede presentar una reducción simple de dos electrones como en la ecuación 14, o bien dos reducciones sucesivas de un electrón como en las ecuaciones 15 y 16. En el último caso se forma un segundo intermediario llamado compuesto II ($P^*Fe^{IV}=O$) al transferirse un electrón al compuesto I (Dunford, 1991; English, 1994).



El compuesto II se representa como $P^*Fe^{IV}=O$ ya que normalmente la especie radical se reduce primero. El que el compuesto I sea reducido a la forma en reposo en uno o dos pasos generalmente depende de la naturaleza del sustrato donador de electrones que se utilice. La naturaleza y estabilidad de los compuestos I y II varía considerablemente de una peroxidasa a otra. Una gran variedad de fenoles y aminas aromáticas pueden actuar como donadores de un electrón para reducir al compuesto I al II y luego a la forma en reposo de la enzima. De las peroxidosas la de *Horseradish* ha sido de las más estudiada y se tiene como patrón de comparación. Los estudios han demostrado que tiene una constante de velocidad de $1.15 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Baek y Wart, 1989). Entre otras peroxidosas tenemos a la de *Coprinus cinereus* con una constante de velocidad de $1.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Liers et al., 2012), la Ns-Hb-1 con un valor de $1.58 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Violante-Mota et al., 2010), la de soya con un valor de 6.4×10^7 (Sakharov et al., 2002).

2.1.7 Chayote (*Sechium edule* Sw)

El Centro de Diversidad Genética sugiere que el chayote *Sechium edule* (*Cucurbitaceae*) fue originalmente domesticado en México y Centroamérica, (Newstrom, 1991). Se considera que el término moderno chayote es una modificación de los vocablos náhuatl “huizt ayotl” que significa calabazas con espinas que pudo derivar en chayotl y en la actualidad a chayote.

Actualmente, la distribución de chayote alcanza prácticamente los cinco continentes, en México, los estados que manifiestan una producción importante son Veracruz, Jalisco, Michoacán, Nayarit y San Luis Potosí, siendo el Estado de Veracruz el principal productor, con una superficie cosechada de 2500 ha y con un rendimiento promedio de 246000 ton/año y con empleos equivalentes a 51512 (Cadena, 2010), México es el segundo país exportador después de Costa Rica, enfocando su mercado principalmente a Estados Unidos y Canadá (unas 5000 ton aproximadamente) quedando el resto para consumo interno, lo cual ocasiona que el mercado nacional se sature, provocando precios muy bajos (de 5 a 10 pesos) y por lo tanto que en ocasiones se tenga que abandonar la cosecha en los últimos meses (Xiloteo, 2011).

El uso principal del chayote es el alimentario, donde el fruto, en madurez hortícola o fisiológicamente maduro es el órgano principal de consumo. Puede decirse que este producto ha cumplido los objetivos de satisfacer las necesidades de alimentación de una determinada población y cultura lo que ha propiciado la conservación de la amplia variabilidad genética de esta especie.

El chayote ha evolucionado comercialmente de hortaliza de traspatio a producto no tradicional de exportación. Su demanda de consumo por los llamados mercados étnicos ha facilitado su exportación hacia otros países. Esto ayuda a mantener la rentabilidad en áreas agrícolas ocupadas por cultivos que son económicamente poco atractivos

Sechium edule crece como una hierba perenne, ascendente, leñosa, provista de zarcillo y raíces tuberculosas. Presenta tallos de varios metros de longitud, ligeramente comprimidos y longitudinalmente surcados, verdes cuando jóvenes y pardo después de cierto tiempo (foto 1) (Cruz y Querol, 1985).

Como se mencionó, el uso más común del chayote es en la alimentación, aunque recientemente se viene ampliando su uso medicinal en infusiones para contrarrestar cálculos renales, gastritis, úlceras y problemas cardiovasculares (Flores, 1989; Vozari-Hampe et al., 1992). En la tabla 3 se presenta la composición química del chayote.



Foto 1. Planta de chayote

Tabla 3. Composición química del chayote <i>Sechium edule</i> . Los valores se reportan para cada 100 g de materia seca.				
Composición	Fruto maduro	Semilla	Hojas	Raíz
pH	6.5 – 6.7	-	-	-
Energía (cal)	26 – 31	-	60.0	79.0
Humedad (%)	90 – 94.5	-	89.7	79.7
Proteína (g)	0.9 – 1.1	5.5	4.0	2.0
Lípidos (g)	0.1 – 0.3	-	0.4	0.2
Carbohidratos	3.5 – 8.4	60.0	4.7	17.8
Fibra (g)	0.4 – 1.0	-	1.2	0.4
Ca ⁺⁺ (µg)	12 – 19	-	58.0	7.0
Fe ⁺⁺ (µg)	0.4 – 0.8	-	2.5	0.8

Ni (μg)	4.85	-	-	-
Cu ⁺⁺ (μg)	8.82	-	-	-
Zn ⁺ (μg)	8.4	-	-	-
Mn ⁺⁺ (μg)	0.47	-	-	-
K ⁺ (μg)	38	-	-	-
Vitamina A (μg)	5.0	-	615.00	-
Tiamina (mg)	0.03	-	0.08	0.05
Riboflavina (mg)	0.04	-	0.18	0.03
Niacina (mg)	0.4 – 0.5	-	1.1	0.9
Ácido ascórbico (mg)	11 – 20	-	16.0	19.0

El cultivo del chayote aporta una valiosa alternativa para el manejo ecológico de laderas, en sustitución de áreas cafetaleras bajo depresión económica, ya que no se usa el azadón ni herbicidas, de tal manera que disminuye el riesgo erosivo por lluvia, y al aporte continuo de materia seca por la poda e intercalado de cultivos como frijol ejotero, que se hace en los primeros tres meses de establecido.

Respecto a las peroxidasas de chayote se tiene el reporte de Villegas (2003). En donde se inmovilizó a la peroxidasa de chayote en el soporte de poliestireno-divinilbenceno derivatizado con triglicina y activado con 1,1'-carbonildiimidazol. La enzima inmovilizada retuvo el 100 %, de su actividad catalítica. Con este biocatalizador se llevó a cabo la oxidación de fenol, 2- metoxifenol y 3-clorofenol, lo que produjo la formación de sus polímeros en presencia de H₂O₂. Los porcentajes de remoción de estos contaminantes estuvieron en el intervalo del 75 y 100%, mientras que la eliminación de los polímeros mediante filtración se encontró entre el 65 y el 80%

CAPÍTULO III DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 Material y Reactivos

3.1.1 Equipo

Material de vidrio convencional.

Extractor de jugos Turmix, modelo universal.

Ultracentrífuga RC5C, Sorvall.

Agitadores magnéticos, Corning PC-353.

Columnas de vidrio de 22 x 2.5cm, Kontes.

Membranas de celofán para diálisis, Sigma Chemical Company.

Intercambiador carboximetilcelulosa CM-52, Whatman.

Espectrofotómetro UV-3100S, UV-VIS-NIR, Shimadzu.

Espectrofotómetro Shimadzu UV/vis NIR 3100

Espectrofotómetro Perkin Elmer FT-IR Spectrum One Spectrometer

Espectrómetro de RMN-Varian a 400 mhz

Espectrómetro de masas marca JEOL, modelo MStation JMS-700

pH-metro

Refrigerador, Nieto.

Pipetas automáticas de varios rangos, Eppendorf.

Papel filtro No. 1, Whatman

3.1.2 Reactivos.

Los reactivos empleados se obtuvieron de las siguientes compañías:

Merck: ácido acético glacial, acetato de sodio trihidratado, peróxido de hidrógeno al 30%.

J.T. Baker, S.A. de C.V.: fosfato monobásico de sodio, fosfato dibásico de sodio, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio.

Sigma Chemical Company: fenol, 2-clorofenol, guayacol

Dismont: azul cibacron FN-R, azul cibanon RS-JM, azul solofenil BF, azul erionyl (A-R)

Rubitex: negro directo 22

3.2 Peroxidasa de chayote

3.2.1 Obtención de un concentrado de peroxidasas de chayote (CPOCh)

Se procesó 1 kg de chayote de la variedad no espinosa mediante un extractor de jugos para obtener el zumo, el cual fue centrifugado a 10000 rpm durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante fue separado del sólido obtenido mediante decantación y sometido a un proceso de diálisis en amortiguador de acetatos 10 mM pH 4.5, a 4°C durante 15 h, en una relación de volumen 1:10 (muestra-amortiguador) y con agitación constante. Una vez concluido el tiempo, el dializado fue centrifugado a 10000 rpm durante 20 min a 4°C. Se utilizaron membranas de diálisis de tamaño de corte de 12 kDa.

La obtención de las proteínas de chayote se realizó mediante cromatografía de intercambio catiónico con un régimen de elución isocrático a una temperatura de 4°C. Para ello se preparó una columna cromatográfica (2.5x20cm) con el intercambiador carboximetilcelulosa 52 (CM-52, Whatman), el cual fue previamente equilibrado con el amortiguador de acetato de sodio-ácido acético 10mM a pH 4.5 y un volumen de cama de 90 mL. A través de éste se hizo pasar el extracto de chayote centrifugado y dializado. Las proteínas retenidas fueron posteriormente eluidas con una solución amortiguadora de acetatos 1M al mismo pH. El producto eluido fue denominado concentrado de peroxidasas de chayote (CPOCh). Se le realizó su espectro de absorción UV/vis en un intervalo de longitudes de onda de 250-700 nm y a partir de éste se determinó su Rz (número de pureza o Reinheitszahl).

3.2.2. Determinación del perfil catalítico de la peroxidasa a diferentes valores de pH

En una celda de cuarzo de 3.5 mL, se colocaron 3 mL de amortiguador adecuado para el pH en estudio de concentración 100 mM; 50 μ L de guayacol 24.1 mM, 20 μ L del CPOCh y como iniciador de la reacción 30 μ L de H₂O₂ (12.3 mM). Se agitó durante 3 s y se registraron los cambios de absorbancia continuamente durante 1 min, a una longitud de onda de 436 nm. Se usó un espectrofotómetro Shimadzu UV/vis NIR 3100, con controlador de temperatura. La temperatura de trabajo fue de 25°C.

Los valores de pH estudiados fueron: 2.43 (citrato-fosfato), 3.33 (citrato-fosfato), 4.10 (citrato-fosfato), 5.10 (citrato-fosfato), 6.0, 7.0 y 8.0 (fosfatos), 9.10 (tris), 10.37 (carbonato-bicarbonato) y 11.2 (carbonato-bicarbonato).

3.2.3. Determinación del perfil catalítico de la peroxidasa a diferentes valores de temperatura

La determinación de la actividad peroxidasa en función de la temperatura se realizó de manera similar a lo indicado en el apartado 3.2.2, variando la temperatura en el intervalo de 40 a 90°C. La reacción fue llevada a cabo con amortiguador de fosfatos 100 mM a pH 7.0.

3.2.4. Determinación del tiempo de vida media

Para la determinación del tiempo de vida media se incubó al CPOCh a 80°C y se tomaron alícuotas cada minuto, y se ensayó la oxidación del guayacol como se describió en el apartado 3.2.2.

Las constantes para las fracciones termolabiles y termorresistente (k_L y k_R , respectivamente) fueron determinadas a través de una regresión lineal de las porciones rectas de la curva resultante al graficar el logaritmo natural de las

actividades enzimáticas en función del tiempo de tratamiento térmico y tomando como base al modelo bifásico propuesto por Ling y Lund en 1978 (Morales-Blancas et al., 2002).

Una vez determinadas las constantes se procedió a calcular el tiempo de vida media a través de la ecuación 17.

Ecuación 17.
$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

3.2.5 Estudio cinético

Para la determinación de las constantes cinéticas se calcularon las velocidades iniciales de reacción procediendo de la siguiente manera:

- a) Se varió la concentración del CPOCh (tabla 4) y se mantuvo constante la concentración de guayacol (0.410×10^{-3} M) y la de H_2O_2 (0.123×10^{-3} M).

Tabla 4. Variación de la concentración de la CPOCh, manteniendo constantes las concentraciones de guayacol y H_2O_2 .	
Concentración Enzimática	
($\times 10^{-8}$ M)	
2.638	
2.127	
1.7	
1.37	
1.11	

- b) Para una concentración del CPOCh (3×10^{-8} M) se fijó la concentración de guayacol y se varió la de H_2O_2 ; y viceversa, es decir, se fijó la concentración del peróxido y se varió la de guayacol (tabla 5).

Tabla 5. Concentraciones de guayacol y H ₂ O ₂ utilizadas					
Guayacol (x10 ⁻³ M)	0.4	0.5	0.58	0.67	1.3
H₂O₂ (x10 ⁻³ M)	0.25	0.3	0.35	0.40	---

3.3 Tratamiento del agua artificialmente contaminada con fenol y 2-clorofenol utilizando el CPOCh

3.3.1 Preparación del agua artificialmente contaminada con fenol y 2-clorofenol

A partir de una solución madre de 1000 ppm de fenol se prepararon 25 mL de agua artificialmente contaminada a las concentraciones de 500, 600, 700, 800 y 900 ppm. Para el 2-clorofenol sólo se preparó a 1000 ppm. Para el seguimiento de la reacción de transformación del fenol en sus productos de reacción se fue adicionando paulativamente la enzima (4.46×10^{-6} M) y el H₂O₂ (0.0123 M) y se obtuvo cada minuto su espectro de absorción UV/vis en el intervalo de 190-800 nm, hasta que ya no se observó cambio en la absorción, forma o posición de las bandas espectroscópicas. A continuación se dejó en reposo durante 24 h y posteriormente, la mezcla de reacción fue centrifugada a 8500 rpm durante 10 min, separando el sólido obtenido del sobrenadante y a éste se le realizó su espectro de absorción UV/vis en el mismo intervalo de longitud de onda. El sólido fue secado a 50°C y almacenado en viales de color ámbar para su posterior caracterización espectroscópica.

3.3.2 Determinación del porcentaje de transformación y remoción del fenol y 2-clorofenol

Para la determinación del porcentaje de transformación del fenol del agua artificialmente contaminada, se midió la absorbancia a 270 nm antes (100%) y después del tratamiento enzimático de la misma. Para el porcentaje de remoción

del sobrenadante del agua con fenol, la absorbancia fue medida a los 400 nm y a 420 para el 2-clorofenol, después de haber permanecido 24 h de reposo y centrifugada, respecto a la absorbancia a 270 nm antes de ser oxidada.

3.4 Tratamiento de aguas artificialmente contaminadas con colorantes textiles utilizando el CPOCh

3.4.1 Selección de los colorantes

Los colorantes estudiados fueron negro directo 22 (Caprapol), azul erionyl A-R, azul solofenil BF, azul cibanon RS-JM y azul cibacron FN-R de la marca Ciba-Geigy, los cuales son ampliamente utilizados por la industria textil poblana. A las muestras de agua artificialmente contaminadas se les determinó el pH.

3.4.2 Tratamiento del agua artificialmente contaminada con los colorantes textiles

Se preparó una solución madre de 1000 ppm de cada colorante a estudiar y a partir de ella, muestras de agua artificialmente contaminada a las concentraciones de 50, 100, 150 y 200 ppm de cada uno de los colorantes azul erionyl A-R, solofenil BF, cibacron FN-R y cibanon RS-JM, mientras que para el colorante negro directo 22 se prepararon a 100, 200, 300, 400 y 500 ppm.

A un volumen de 25 mL de agua artificialmente contaminada del colorante a estudiar se le añadió paulativamente el CPOCh 4.46×10^{-6} M y el H_2O_2 (0.0123 M).

Una vez iniciada la reacción se dejó transcurrir durante 45 min con agitación constante. Se tomaron alícuotas de 3 mL a los 15, 30 y 45 min y se obtuvieron los

espectros de absorción UV/vis en el intervalo de 350 a 800 nm, mediante un espectrofotómetro de absorción Agilent 8453 UV/visible, hasta que ya no se observó cambio en la absorción, forma o posición de las bandas espectroscópicas. Se dejó continuar la reacción y después de 24 h se volvió a obtener su espectro. Y a partir de éstos se determinó el porcentaje de remoción. Cada experimento fue realizado por triplicado. La separación de los precipitados se realizó como se describió para los fenoles.

3.5 Caracterización de los productos de reacción de fenoles y colorantes

3.5.1 Espectroscopía UV/vis

Se obtuvieron los espectros de absorción UV/vis al concluir la reacción de oxidación en fase acuosa, la cual se realizó en una celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz a una velocidad rápida con un slit de 2.0 en el intervalo de longitud de onda de 190-800 nm, utilizando un espectrofotómetro de absorción Agilent 8453 UV-visible.

3.5.2 Espectroscopía FTIR

La espectroscopía de FTIR se realizó en la región de 4000 a 400 cm^{-1} utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer FT-IR Spectrum One Spectrometer. Después de realizada la línea base, se colocó el plato y la punta correspondiente en el sistema de ATR y fueron analizadas las muestras producto de la reacción de oxidación en estado sólido.

3.5.3 Espectroscopia de RMN de ^1H

Los espectros de RMN ^1H se obtuvieron en un espectrómetro NEOL modelo Oxford de 400 MHz utilizando como solventes metanol deuterado (CD_3OD) para

los productos de oxidación de los compuestos fenólicos y el colorante azul solofenil y acetona deuterada ($\text{CD}_3\text{CO CD}_3$) para los del colorante negro directo 22.

3.5.4 Espectrometría de masas

Los análisis de espectrometría de masas fueron realizados para los productos de oxidación de los compuestos fenólicos mediante un espectrómetro de masas marca JEOL, modelo MStation JMS-700. La muestra fue ionizada mediante el modo de ionización de impacto electrónico (IE) con inserción directa a una temperatura de 250°C. En la fuente de ionización se colocó 1 μL de muestra (disuelto en acetona) en un capilar, el cual fue soportado en un dispositivo del equipo denominado “*probe*” y se introdujo a la cámara de ionización y, procesado mediante instrucciones realizadas a través de una estación de trabajo.

3.6 Remoción de colorantes de muestras de agua residual textil

3.6.1 Origen del agua residual textil a tratar

De una empresa de las denominadas lavanderías de mezclilla en la junta auxiliar de Santa Ana Chamimilulco perteneciente al municipio de Huejotzingo, Puebla, las cuales hacen uso de colorantes textiles y el agua del proceso es descargada al ambiente, sin tratamiento. Se obtuvieron dos muestras de agua: una de ellas a partir de una lavadora industrial una vez realizado el teñido con el colorante negro directo 22, denominándose muestra teñido y la segunda del canal de descarga del conjunto de etapas del procesamiento de la mezclilla (desengomado, descrude y mercerizado, blanqueo, teñido y lavado), designada como muestra total. El volumen de cada una fue de 1L y se utilizaron botellas de plástico para su transporte y almacenamiento.

3.6.2 Parámetros determinados al agua residual textil a tratar

Al agua residual se le determinó su pH, temperatura y presencia de sedimentos. Posteriormente fue filtrada (papel Whatman No. 1) y se obtuvo su espectro de absorción UV/vis en el intervalo de 350 a 800 nm utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz. La muestra denominada “teñido” fue diluida 1:6

3.6.3 Tratamiento del agua residual textil

Para el tratamiento de las muestras de agua residual textil se utilizó una alícuota de 25 mL y se le adicionó el CPOCh (4.46×10^{-6} M) y H_2O_2 (12.3 mM). Una vez iniciada la reacción se dejó transcurrir durante 60 min con agitación constante. Posteriormente, se dejó en reposo durante 24 h y fue centrifugada a 4500 rpm durante 10 min.

El porcentaje de remoción del colorante se realizó a partir de sus espectros de absorción UV/vis en el intervalo de longitudes de onda de 350 a 800 nm antes (100%) y después del tratamiento enzimático.

Para la determinación de la cantidad del colorante removido se construyó una curva de calibración graficando la concentración del colorante negro directo 22 en el intervalo de 100 a 500 ppm contra la absorbancia a la longitud de onda de 480 nm. Cada experimento fue realizado por triplicado.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Peroxidasas de chayote

4.1.1 Obtención de un concentrado de peroxidasa de chayote (CPOCh)

A partir de 1 kg de chayote se obtuvieron 670 mL de zumo centrifugado y dializado, después de pasar a través del intercambiador y posterior elución con el amortiguador de acetatos 1M, se obtuvieron 40 mL del CPOCh.

En la purificación de peroxidasa de chayote Villegas (2003) ha reportado valores de Rz de hasta 1.33 y Méndez (2000) de hasta 2.0. Sin embargo, con la finalidad de disminuir costos en el tratamiento de aguas contaminadas se utilizó una peroxidasa con un índice de pureza pequeño que permitiera obtener buenos resultados para la polimerización de los compuestos fenólicos y remoción de los colorantes estudiados. Por tal motivo se utilizó un CPOCh con un valor de Rz de 0.12 (tabla 6), con un pH de 5.5 y una actividad total de 6306.72 U/L.

Tabla 6. Valor de Rz para el CPOCh obtenido.			
CPOCh	A₂₈₀	A₄₀₃	RZ
	3.99	0.499	0.12

4.1.2. Determinación del perfil catalítico de la peroxidasa a diferentes valores de pH

Los valores obtenidos de la actividad total del CPOCh con el cambio de pH a la temperatura de 25°C se presentan en la figura 7, donde se observa que los

mayores valores de actividad se encuentran en el intervalo de pH de 5 a 7 y el máximo valor fue de 10721.43 U/L al de pH: 6.0.

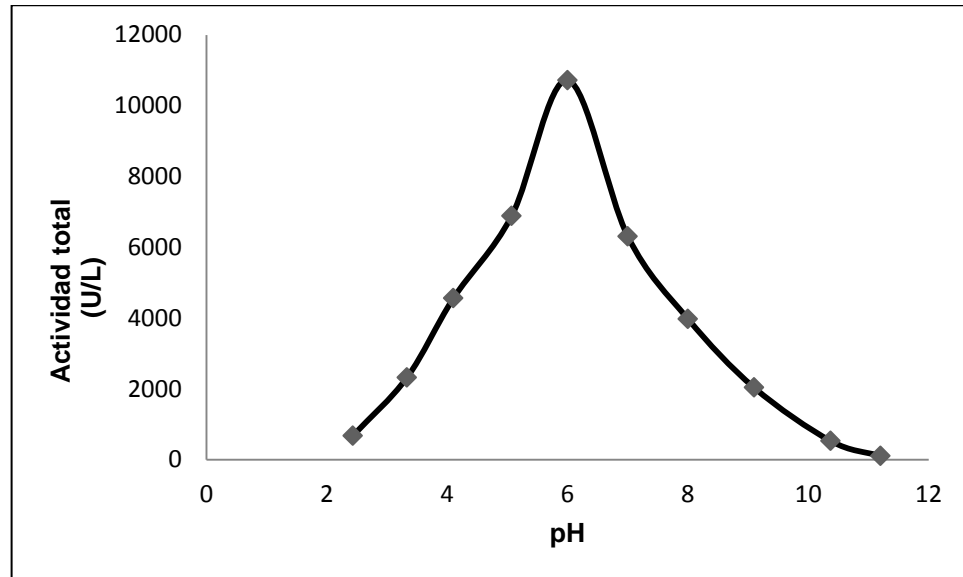


Figura 7. Gráfica de los valores de actividad enzimática total del CPOCh con la variación del pH.

El intervalo de pH al cual se observó actividad catalítica fue desde 3.33 hasta 9.10 y se obtuvieron los valores de 2325.15 y 2037.39 U/L, respectivamente, lo que es importante para el tratamiento de efluentes en donde el pH es variable.

4.1.3. Determinación del perfil catalítico de la peroxidasa a diferentes valores de temperatura

Los resultados obtenidos de la actividad del CPOCh con la variación de la temperatura se presentarán en la figura 8.

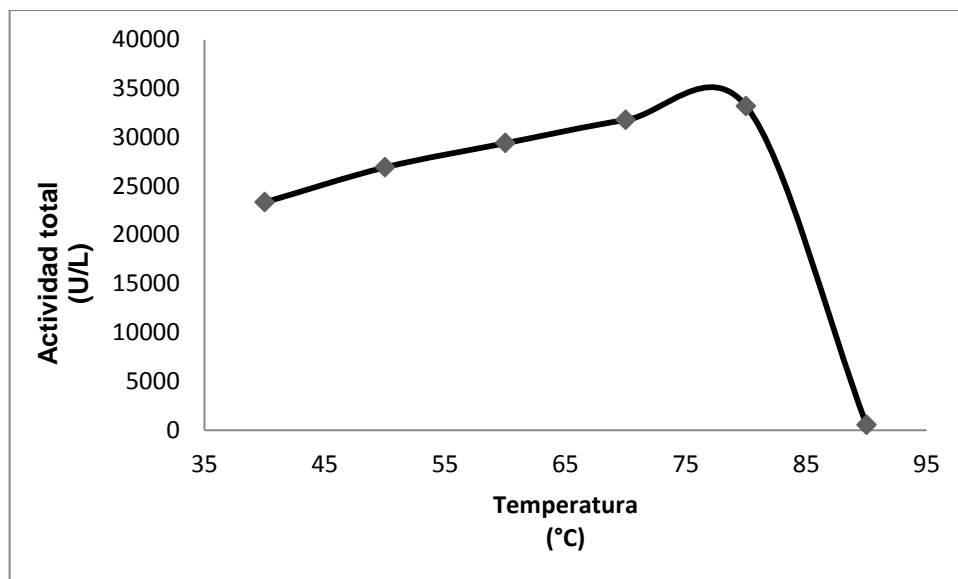


Figura 8. Valores de la actividad enzimática del CPOCh con respecto a la variación de la temperatura.

De los resultados anteriores se observa que la actividad del CPOCh se incrementó con el aumento de la temperatura hasta los 80°C y disminuyó significativamente a los 90°C. Los máximos valores obtenidos fueron a las temperaturas de 70 y 80°C. Resultado importante debido a que el CPOCh tendría una potencial aplicación en el tratamiento de efluentes cuyas temperaturas se encuentren dentro del intervalo aquí indicado.

Además, se estudio la estabilidad del CPOCh con el tiempo en el intervalo de temperatura indicado. Los resultados mostraron que para el intervalo de 40 a 70°C el concentrado fue estable durante los 30 min de incubación, mientras que para 80°C (figura 9) se observó que hay un pequeño incremento de ella y a partir de los 2 min empezó a disminuir hasta alcanzar el valor mínimo a los 5 min.

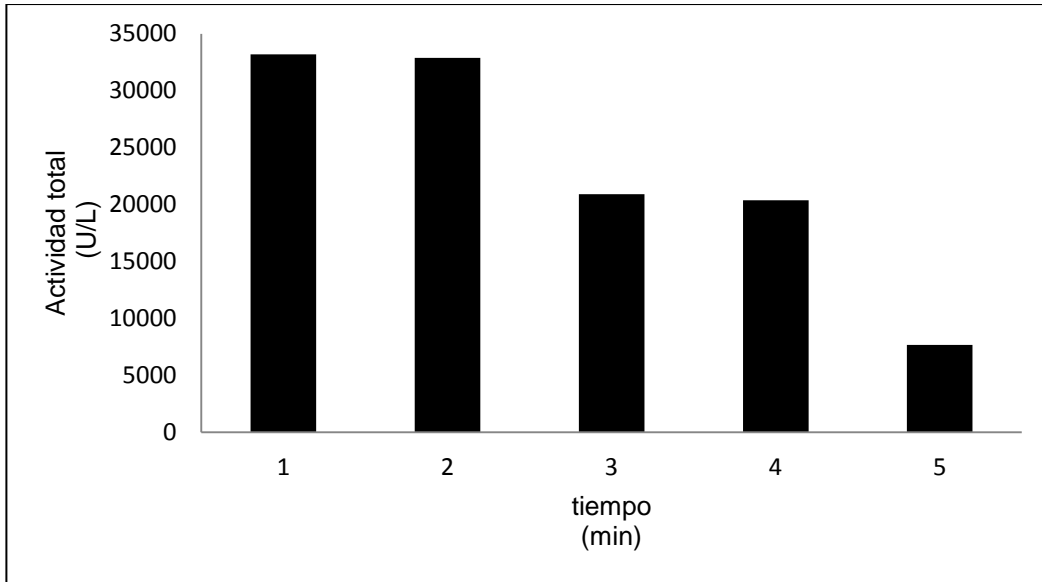


Figura 9. Valores de la actividad enzimática del CPOCh a 80°C con respecto al tiempo.

Para el caso de la temperatura a 90°C (figura 10) sólo se presentó actividad enzimática durante 2 min antes de que se desnaturalizara.

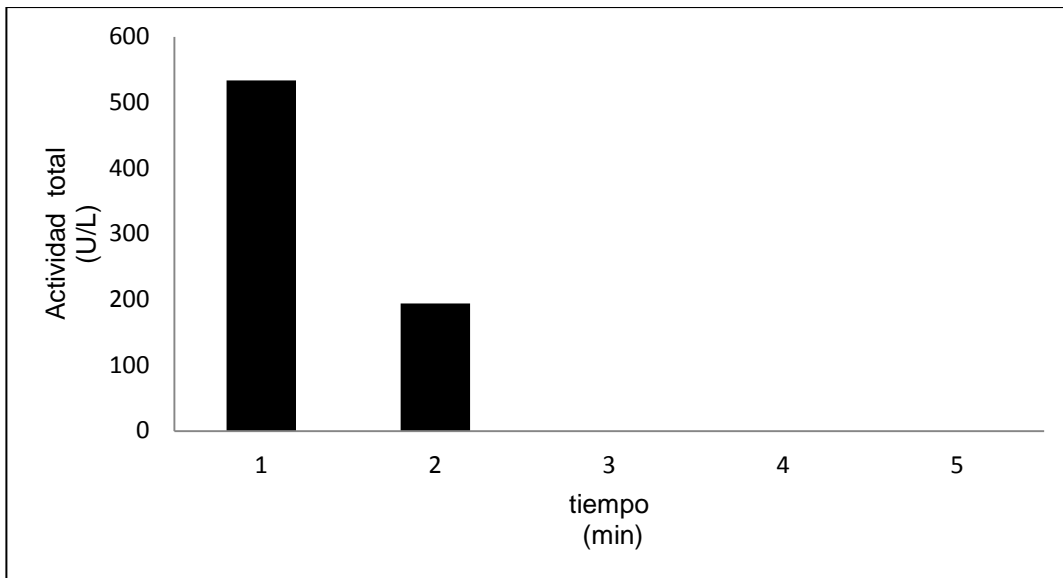


Figura 10. Valores de la actividad enzimática del CPOCh a 90°C con respecto al tiempo.

En las tablas 6 y 7 se resumen los valores de pH y temperatura, respectivamente, reportadas por distintos autores. Con respecto a los valores de pH se observa que el intervalo considerado para el CPOCh (3.3 a 9.10) coincide con la mayoría de las peroxidases reportadas, de manera similar se tiene para el caso de la temperatura del CPOCh a los 70 y 80°C.

Tabla 6. Intervalo de actividad catalítica de peroxidases con respecto al pH.		
Peroxidasa	pH	Referencia
La cHRP	2.2-12	Pina et al., 2001
Hojas de <i>Chamaerops excelsa</i>	2.0-12	Zamorano et al., 2009
Cebada	3.0-11	Rasmussen et al., 1997
Palma africana (<i>Elaeis guinnensis</i>)	2.2-12	Pina et al., 2001
Citocromo C peroxidasa	4.0-8.0	Dowe y Erman, 1985
MnP de <i>Irpex lacteus</i>	6.0	Shin et al., 2005

Tabla 7. Peroxidasas de diferentes fuentes y su temperatura máxima.		
Fuente de Peroxidasa	Temperatura (°C)	Referencia
Alcachofa	65	Rodríguez-López et al., 2002
Nabo	80	García et al., 2003
cHRP	81.5	McEldoon et al., 1995
Peroxidasa de Soya	90.5	McEldoon et al., 1995
Isoenzima catiónica de la peroxidasa de cacahuete	42.4	McEldoon et al., 1995
Cebada	75	Rasmussen et al., 1997
Alforfón	40	Suzuki et al., 2006
Sorgo	82	Dicko et al., 2006
Peroxidasa de las hojas de la palmera <i>Chamaerops excelsa</i>	72	Zamorano et al., 2009
Palma real	90	Sakharov et al., 2002
<i>Palma trachycarpus</i>	80	Caramyshev et al., 2006
Citocromo c peroxidasa	63	Dowe and Erman, 1985
Manganeso peroxidasa	60	Shin et al., 2005

Se observa que todas las peroxidasas presentan actividad a temperaturas altas y en intervalos amplios de pH, en especial las de las plantas son las más estables debido a elementos estructurales (presencia de iones de Ca^{2+} , glicanos y puentes disulfuro) que protegen la enzima de la desnaturalización. Por todo lo anterior, las peroxidasas de plantas entre las que encontramos a la de chayote son un grupo de enzimas con potencial aplicación en diversos procesos químicos así como en la descontaminación de aguas residuales industriales.

4.1.4. Determinación del tiempo de vida media

Con base en los resultados obtenidos de la actividad enzimática con respecto a la temperatura se realizaron los cálculos de los parámetros k_L y k_R a la temperatura de 80 °C (figura 11).

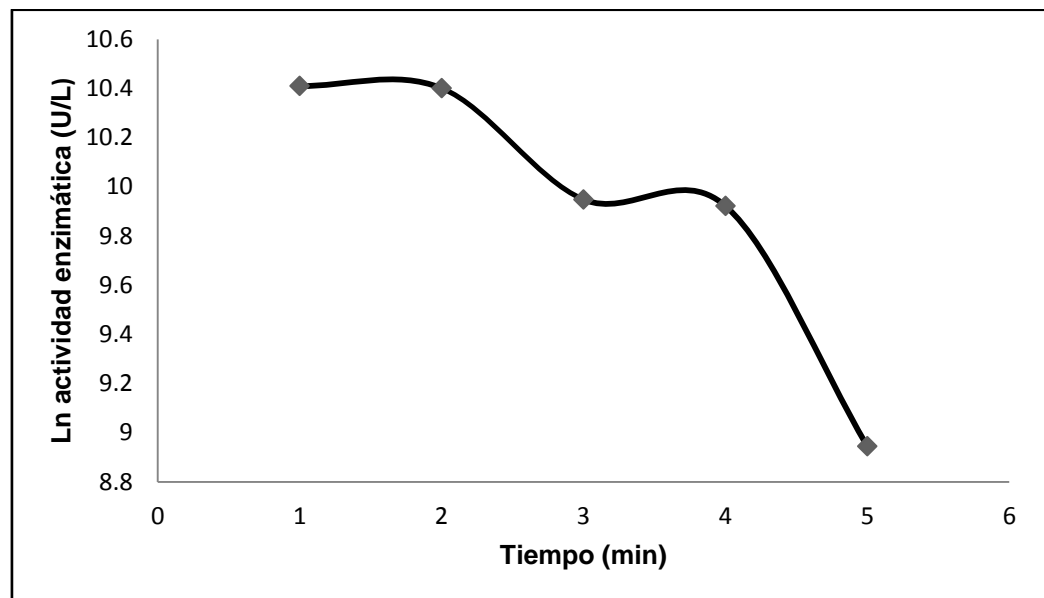


Figura 11. Gráfica del logaritmo natural de las actividades enzimáticas en función del tiempo de tratamiento térmico

Con base en la ecuaciones 18 y 19 para la k_R se tomó del minuto 1 al 2 y para la k_L del 4 al 5.

Ecuación 18.
$$m = \frac{k_L}{2.303}$$

Ecuación 19.
$$m = \frac{k_R}{2.303}$$

En la tabla 8 se resumen los valores obtenidos para k_L y k_R

Tabla 8. Valores de k_L y k_R			
pendiente	K_R	pendiente	K_L
0.00881	0.02028	0.97766	2.25155

Una vez obtenidas las fracciones termorresistente y termolábil se procedió a obtener los valores de vida media, que se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Tiempo de vida media (min).			
K_R	34.18174	K_L	0.30785

De la tabla anterior se tiene que la fracción termorresistente teóricamente necesita de 34 min para que la concentración de la enzima se reduzca a la mitad y la termolábil solo son requeridos 18.5 s. Por lo que se puede concluir que el concentrado de peroxidases es frágil a alta temperatura.

4.1.5 Estudio cinético

De los resultados obtenidos se observó un comportamiento Michaelis-Menten (Bohinski et al., 1998; Mathews et al., 2000) para el CPOCh, ya que al mantener constante las concentraciones de los sustratos guayacol y H_2O_2 y variar la concentración de la enzima, se obtuvo un comportamiento lineal en la velocidad (figura 12). Cuando se mantuvo constante la concentración de enzima y se variaron las concentraciones de guayacol y H_2O_2 , se observó la tendencia a un comportamiento hiperbólico entre la velocidad y la concentración de sustrato (figuras 13 y 14). Los resultados se resumen en la tabla 10.

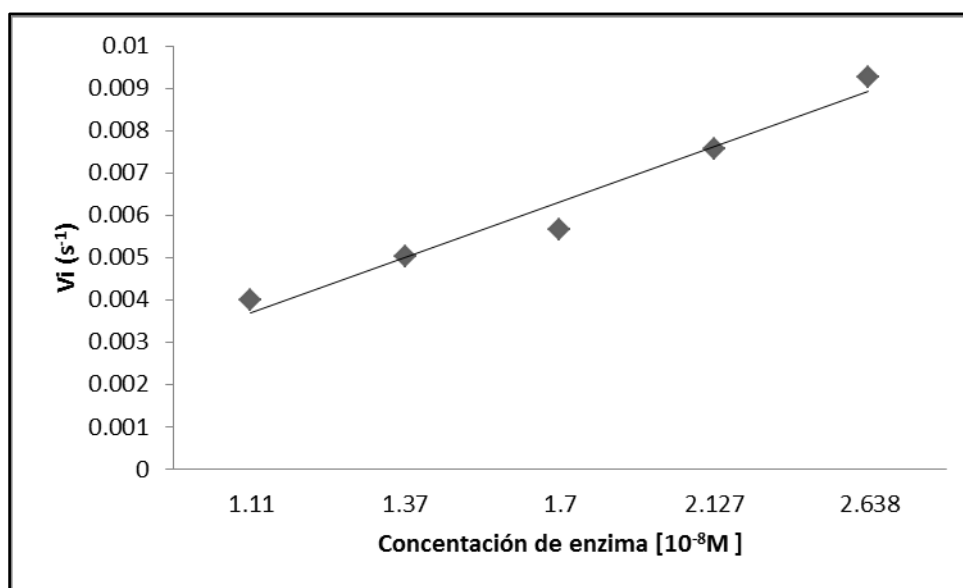


Figura 12. Variación de la concentración de la POCh a concentraciones constantes de guayacol ($4.1 \times 10^{-4} M$) y H_2O_2 ($1.2 \times 10^{-4} M$).

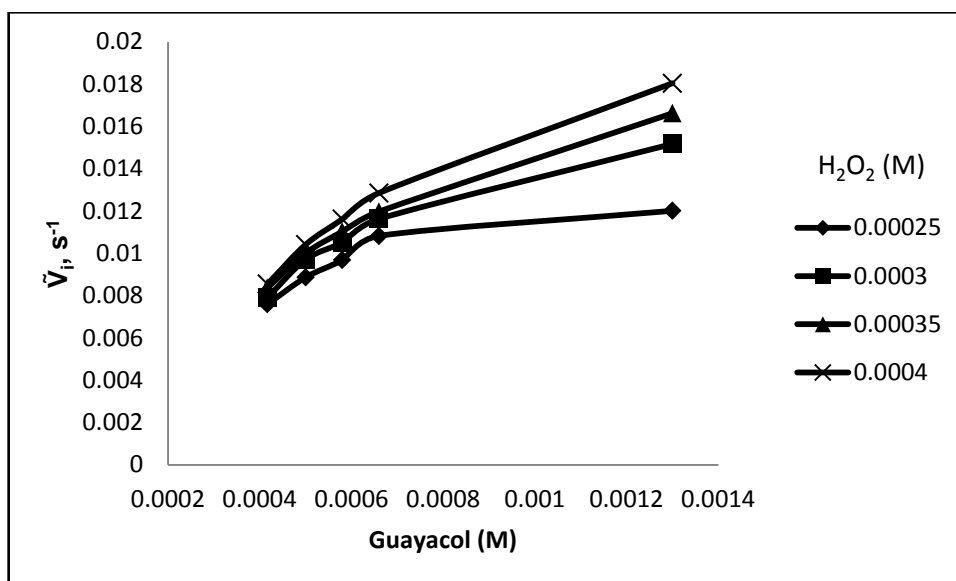


Figura 13. Cinéticas manteniendo la concentración de enzima constante y variando las concentraciones de guayacol y H₂O₂.

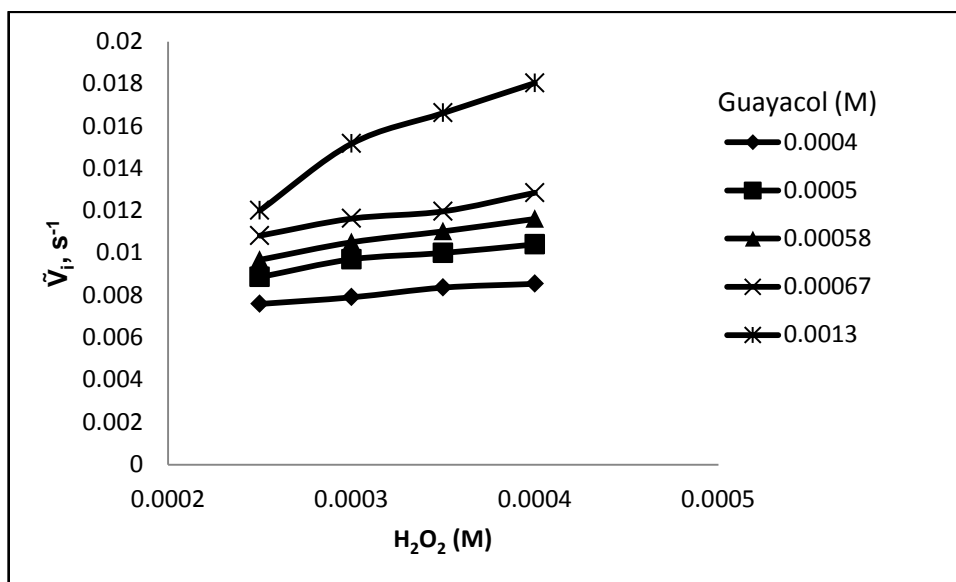


Figura 14. Cinéticas manteniendo constante la concentración de enzima y variando las concentraciones de guayacol y H₂O₂.

Tabla 10. Valores de velocidad inicial al mantener constante la concentración de enzima.					
H₂O₂ (M)	Guayacol (M)				
	0.0004	0.0005	0.00058	0.00067	0.0013
0.00025	0.007594	0.00886267	0.00968083	0.010822	0.012008
0.00030	0.007907	0.00970467	0.01051067	0.011628	0.015169
0.00035	0.008368	0.01000567	0.01102667	0.011972	0.016620
0.00040	0.008544	0.01041111	0.01161479	0.012851	0.018039

4.1.5.1 Determinación de las constantes catalíticas del CPOCh

Para calcular los parámetros cinéticos se tomó en cuenta que el sistema presentó un comportamiento según el modelo de Michaelis-Menten, se graficaron entonces la concentración de enzima/velocidad inicial contra el inverso de la concentración de peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones fijas de guayacol y el resultado fue una serie de rectas paralelas (figura 36, anexo A), lo cual nos indicó un comportamiento que se ajusta al modelo de ping-pong clásico representado por la ecuación 20

Ecuación 20.
$$\frac{[E]_0}{v_i} = \frac{K_A}{k_{cat}} \frac{1}{[A]} + \frac{1}{k_{cat}} \left[1 + \frac{K_B}{[B]} \right]$$

donde: $[E]_0$ es la concentración total de la enzima, V_i es la velocidad inicial, K_A es la constante de Michaelis respecto al H_2O_2 y K_B es la constante de Michaelis respecto al guayacol, $[A]$ es la concentración H_2O_2 , $[B]$ es la concentración de guayacol y k_{cat} es la constante de velocidad máxima teórica.

Se obtuvieron gráficas primarias en donde se gráfico $\frac{[E]_0}{v_i}$ contra $\frac{1}{[A]}$ para cada concentración de guayacol [B]. La pendiente de esa recta es igual a K_A/k_{cat} , y la intersección al eje Y es el segundo término de la ecuación 20: $\frac{1}{k_{cat}} \left[1 + \frac{K_B}{[B]} \right]$. De las intersecciones de estas rectas con la ordenada se pudo obtener la gráfica secundaria representada por la ecuación 21.

Ecuación 21.
$$Intersección\ primaria\ (I.P.) = \frac{K_B}{k_{cat}} \frac{1}{[B]} + \frac{1}{k_{cat}}$$

La gráfica de I.P contra $1/[B]$ es una línea recta (gráfica secundaria, figura 15) cuya pendiente corresponde a K_B/k_{cat} y la ordenada en el origen es $1/k_{cat}$. A partir de esta información se calcularon los valores de K_B y k_{cat} , y de la pendiente de las gráficas primarias K_A/k_{cat} se obtuvo el valor de K_A .

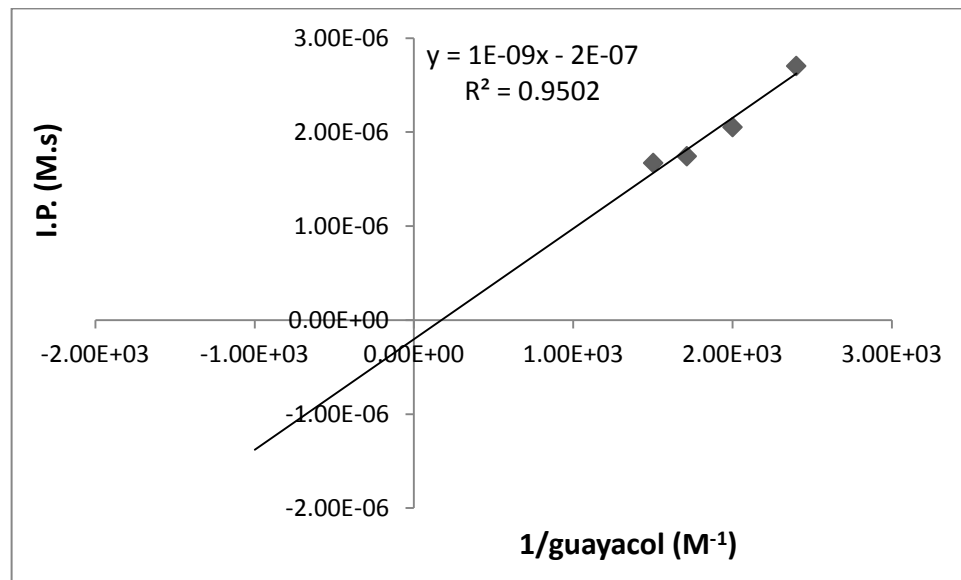


Figura 15. Gráfica secundaria del CPOCh.

De las gráficas primarias (anexo A) y secundarias para el CPOCh se obtuvieron los valores de las constantes de Michaelis-Menten con respecto al peróxido de

hidrógeno (K_A) y al guayacol (K_B) y la constante de velocidad máxima teórica (k_{cat}), cuyos valores se presentan en la tabla 11.

Tabla 11. Constantes catalíticas del CPOCh para la oxidación de guayacol			
Enzima	K_A (M)	K_B (M)	k_{cat} ($M^{-1}s^{-1}$)
CPOCh	1.5×10^{-3}	5×10^{-3}	5×10^6

Hay que considerar que se está trabajando con un conjunto de isoformas de peroxidasa de chayote con un valor de pureza bajo (Rz: 0.12), por lo que los parámetros cinéticos obtenidos no se pueden utilizar para caracterizar a ninguna ni compararla con peroxidases puras, pero si permite tener una idea de la actividad enzimática aparente y cumple el objetivo de este trabajo que es la aplicación en la remoción de diversos contaminantes.

4.2 Tratamiento de agua artificialmente contaminada con fenol y 2-clorofenol utilizando el CPOCh

4.2.1 Agua artificialmente contaminada con fenol y 2-clorofenol

Debido a las propiedades bactericidas del fenol y sus derivados los efluentes que contienen estos compuestos no pueden ser tratados en las plantas depuradoras biológicas convencionales, dado que a concentraciones de 50 ppm inhiben la reproducción de los microorganismos, y en concentraciones del orden de 1000 ppm los destruyen completamente. (Pruden y Le, 1976; Autenrieth et al., 1991).

Por lo anterior se estudiaron las concentraciones desde 500 a 1000 ppm de fenol. Las aguas artificialmente contaminadas presentantaron un pH de 6.94, las

cantidades de CPOCh y H₂O₂ utilizadas para remover al fenol a las diferentes concentraciones se presentan en la tabla 12 y la reacción se llevó durante 3 min.

Tabla 12. Volúmenes del CPOCh y H ₂ O ₂ utilizados para remover al fenol.		
Concentración de fenol (ppm)	CPOCh (6306.72 U/L) (mL)	H₂O₂ [12.3 mM] (mL)
500	6	3
600	8	4
700	10	5
800	12	6
900	14	7
1000	16	8

4.2.2 Determinación del porcentaje de transformación y remoción de fenol y 2-clorofenol

El agua artificialmente contaminada con fenol era inicialmente incolora y al momento de agregar el CPOCh y el H₂O₂ cambio a un color amarillo y presentó un pH de 5.1. Inmediatamente después se tornó color marrón debido a la reacción y a medida que transcurrió el tiempo se observó la formación de los productos insolubles en agua.

En las figuras del 37 al 42 del anexo B, se presentan los espectros de absorción UV/vis de las aguas artificialmente contaminadas con fenol a las distintas concentraciones antes y después de su tratamiento con el CPOCh. A partir de ellos se determinó el porcentaje de transformación del fenol en sus productos de reacción, así como el tiempo requerido.

La tabla 13 presenta los porcentajes de transformación determinados para cada una de las muestras de agua tratadas. De donde se observa que los porcentajes

de transformación del fenol en sus polímeros se encuentran en el intervalo del 95.33 a 97.07.

Tabla 13. Porcentaje de transformación del fenol en sus productos de reacción para las muestras de agua artificialmente contaminada a las diferentes concentraciones de estudio.

Concentración (ppm)	A_i (270 nm)	A_f (270 nm)	Porcentaje de transformación	Anexo B (figura)
500	1.055	0.039	96.30	37
600	1.488	0.045	96.97	38
700	1.657	0.055	96.68	39
800	1.983	0.058	97.07	40
900	2.254	0.079	96.49	41
1000	2.550	0.119	95.33	42

En la tabla 14 se presentan los valores de absorbancia a la longitud de onda de 400 nm de la formación de los polímeros de fenol y el tiempo requerido para su máxima obtención. Debido a la gran cantidad de producto formado se realizó una dilución 1:15 para la determinación la absorbancia correspondiente.

Tabla 14. Valores de máxima absorbancia de los productos de reacción y el tiempo requerido para su obtención de las muestras de agua artificialmente contaminadas con fenol a tratar ($\lambda=400$ nm).

Concentración (ppm)	Absorbancia (dilución 1:15)	Tiempo (min)	Anexo B (figura)
500	0.7059	3.0	37
600	0.9624	3.0	38
700	1.0866	1.5	39
800	1.2589	1.0	40
900	1.3401	1.0	41
1000	1.6229	1.0	42

De la tabla anterior se observa que a mayor concentración del fenol, el tiempo de reacción necesario para alcanzar la máxima conversión disminuyó de 3 a 1 min, mientras que la absorbancia debida a la formación de los productos de reacción se incrementó conforme aumentó la concentración del fenol en el agua a tratar.

En la tabla 15 se reportan los valores porcentuales de remoción de los productos de la reacción.

Tabla 15. Porcentajes de remoción de los polímeros de fenol de las muestras de agua tratadas a las diferentes concentraciones.

Concentración (ppm)	A_{400nm} (dilución 1:15)		Remoción (%)	Anexo B (figura)
	A_i	A_f		
500	0.7059	0.010	98.58	37
600	0.9624	0.016	98.33	38
700	1.0860	0.018	98.34	39
800	1.2589	0.019	98.49	40
900	1.3401	0.021	98.43	41
1000	1.6229	0.044	97.28	42

En estos resultados se observa que los porcentajes de remoción después de 24 h de reposo y posterior centrifugación son similares entre ellos y un poco mayor al 98%, excepto para la concentración de 1000 ppm que fue del 97%. Por lo que el CPOCh muestra gran potencial para la transformación del fenol a concentraciones letales para los microorganismos degradadores de este contaminante y también es posible la remoción de sus polímeros de manera eficiente.

En la tabla 16 se presenta la remoción de fenol por peroxidasas reportados por diversos autores.

Tabla 16. Uso de peroxidasas en el tratamiento de aguas residuales contaminadas con fenol reportados por otros autores.			
Enzima utilizada	[contaminante]/ Unidad enzimática	Remoción (%)	Referencia
HRP	0.370 mM/U	99.7	Al/Kassim et al., 1994
Peroxidasa de <i>Coprinus macrorhizus</i>	0.555 mM/U	98.2	Al/Kassim et al., 1994
HRP	0.098 mg/U	100	Zhang y Nicell, 2000
Peroxidasa de Soya	1.66 mM/U	> 95	Caza et al., 2000
HRP	4 mM/U	95	Wagner y Nicell, 2002

De lo reportado en la tabla 16 se observa que en general tanto las peroxidasas de hongos como de plantas muestran gran eficacia en la remoción de fenol y de manera similar el CPOCh actúa eficientemente en la eliminación de dicho sustrato.

El tratamiento final con cloro en las plantas tratadoras de agua produce clorofenoles de olor y sabor desagradable aún a concentraciones del orden de ppb.

Por lo que respecta al 2-clorofenol, a concentraciones mayores a 200 ppm las aguas residuales tampoco pueden ser tratadas efectivamente por métodos biológicos directos debido a su efecto antimicrobiano (Krijgsheld y van Der Gen, 1986; Lahaniatis et al., 1994).

Además el 2-clorofenol es considerablemente más tóxico que los fenoles diclorados (Borzelleca et al., 1985), y no sólo son perjudiciales para el ser humano, sino que también afectan la vida de otros mamíferos y la acuática, los valores de LD₅₀ para ratas es de 570 a 670 mg/kg y la LC₅₀ para organismos acuáticos son de 2 a 14 ppm/96 h (Krijgsheld y van Der Gen, 1986). Por estas razones se estudió al agua artificialmente contaminada con 2-clorofenol a 1000 ppm.

El agua artificialmente contaminada con 1000 ppm presentó un pH de 6.94 y para la remoción del mismo se utilizaron 18 mL del CPOCh y 9 mL de H₂O₂ (12.3 mM). Se logró transformar al 2-clorofenol en sus productos de reacción en un 95.9% y a éstos removerlos en un 99.6% (tabla 17 y figura 43, anexo B).

Tabla 17. Porcentaje de transformación y remoción de los productos de reacción de 2-clorofenol utilizando al CPOCh.					
2-clorofenol		Transformación (%)	Productos de Reacción		Remoción (%)
A _i (λ _{270nm})	A _f (λ _{270nm})		A _i (λ _{420nm})	A _f (λ _{420nm})	
2.65	0.1073	95.9	0.853	0.003	99.6

En la tabla 18 se presentan los porcentajes de remoción de 2-clorofenol reportados por otros autores.

De manera similar que para el fenol se observa que en general las peroxidasas incluyendo a la de chayote muestran gran reactividad por el sustrato 2-clorofenol con altos porcentajes de remoción

Tabla 18. Uso de peroxidasas en el tratamiento de aguas residuales contaminadas con 2-clorofenol.			
Enzima utilizada	[contaminantes]/ Unidad enzimática	Remoción (%)	Referencia
HRP	0.370 mM/ U	99.6	Al/Kassim et al., 1994
Peroxidasa de <i>Coprinus macrorhizus</i>	0.555 mM/ U	94.3	Al/Kassim et al., 1994
Peroxidasa de Soya	5.26 mM/U	> 95	Caza et al., 2000.
HRP	0.2 mM/U	95	Wagner y Nicell, 2002

Los productos de reacción del agua tratada enzimáticamente con el CPOCh presentaron un color amarillo oscuro para fenol y ligeramente menos oscuro para 2-clorofenol (foto 2).

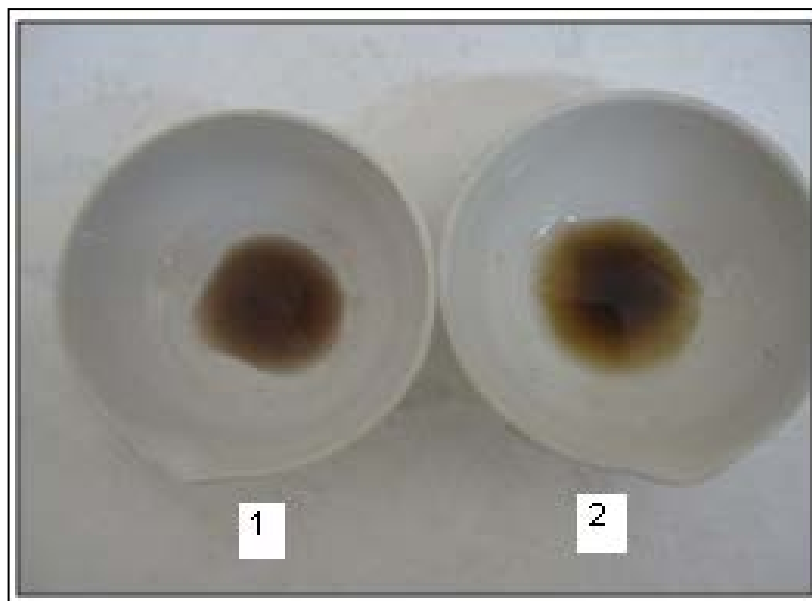


Foto 2. Aspecto de los productos de reacción en solución acuosa de (1) fenol y (2) 2-clorofenol.

4.3 Selección de los colorantes

Los colorantes utilizados para el estudio de remoción en aguas artificialmente contaminadas fueron seleccionados debido a que éstos son utilizados principalmente en la industria textil para el teñido de fibras como el algodón y el nylon. Está reportado que en el Estado de Puebla hay 191 empresas relacionadas con Industria textil, de las cuales 134 corresponden al municipio de Puebla de Zaragoza. Muchas de ellas descargan el agua residual sin el debido tratamiento en el río Alseseca principalmente en el caudal nororiental de la ciudad de Puebla, otras más en el río Atoyac que atraviesa los estados de Puebla y Tlaxcala (Matías, 2012; González et al., 2013).

En la tabla 19 se presentan los colorantes estudiados y el pH de las aguas artificialmente contaminadas con ellos.

Tabla 19.	Colorantes seleccionados y pH de las aguas artificialmente contaminadas con ellos.	
Colorante	pH	
Negro directo 22	7.03	
Azul solofenil BF	6.70	
Azul erionyl A-R	6.77	
Azul cibacron FN-R	7.17	
Azul cibanon RS-JM	7.17	

4.3.1 Tratamiento de agua artificialmente contaminada con colorantes textiles

Los espectros de absorción UV/vis de las aguas artificialmente contaminadas a las diferentes concentraciones de los colorantes estudiados antes y después de su tratamiento enzimático con el CPOCh se presentan en las figuras del 44 al 64 (anexo C). De ellos se observa que para el colorante negro directo 22 tiene 2 bandas muy anchas en la región de 450 a 700 nm, para el azul solofenil BF se presenta un máximo de absorción a la longitud de onda de 620 nm, para azul erionyl A-R se presentan 2 bandas de absorción a las longitudes de onda de 630 y 580 nm, para azul cibanon RS-JM muestra dos bandas anchas en el intervalo de longitudes de onda de 500 a 800 nm y para azul cibacron FN-R una banda a los 608 nm.

Se ha reportado que los espectros electrónicos de moléculas orgánicas que contienen cromóforos son complejos porque la superposición de las transiciones vibracionales sobre las transiciones electrónicas produce la combinación de líneas solapadas; el resultado es una banda de absorción ancha (Skoog et al., 2001), como las que están presentando los colorantes estudiados en este trabajo de investigación.

Debido a que cada experimento de remoción de los colorantes seleccionados a las diferentes concentraciones se realizaron por triplicado, en las tablas del 27 al 47 (anexo C) se presentan los valores de absorbancia determinados antes y después de su tratamiento enzimático con el CPOCh, así como el valor promedio de los mismos y a partir de éstos se calculó el porcentaje de remoción. Para todas los experimentos se utilizó 2.5 mL del CPOCh (concentración en el agua residual de 4.5×10^{-7} M) y 1.25 mL de H_2O_2 (concentración en el agua residual 6.11×10^{-3} M). El tiempo en el que se logró la máxima remoción fue a los 15 minutos.

En la tabla 20 se presentan los porcentajes de remoción del colorante negro directo 22 a las diferentes concentraciones y en la tabla 21 de los colorantes azul erionyl A-R, azul solofenil BF, azul cibanon RS-JM y azul cibacron FN-R.

Para el colorante negro directo 22 se observa de los datos obtenidos la gran capacidad del CPOCh para removerlo desde el 97.9% para 100 ppm y hasta el 99.6% para 500 ppm.

Con respecto a los colorantes estudiados los resultados mostraron que se logró removerlos desde un 95.9 hasta el 98.3%, lo que indica que el CPOCh presenta buena afinidad para su transformación

Tabla 20. Porcentajes de remoción del colorante negro directo 22 de las aguas artificialmente contaminadas a las diferentes concentraciones de estudio.						
Colorante	λ (nm)	Concentración (ppm)				
		100	200	300	400	500
Negro directo 22	490	97.9	98.84	99.42	99.4	99.6

Tabla 21. Porcentaje de remoción de los colorantes textiles en las aguas artificialmente contaminadas a las diferentes concentraciones de estudio.

Colorante	λ (nm)	Concentración (ppm)			
		50	100	150	200
Azul solofenil BF	620	96.6	98.0	97.9	97.2
Azul erionyl A-R	630	95.9	96.6	96.7	97.0
Azul cibanon RS-JM	585	96.5	96.4	97.8	96.8
Azul cibacron FN-R	608	96.7	97.2	98.3	97.4

Sánchez-López et al., (2010) han demostrado la capacidad del extracto enzimático (lacasa y manganeso peroxidasa) de *Trametes maxima* cepa MUCL 44155 para remover colorantes de la marca Ciba-Geigy (tabla 22).

Tabla 22. Porcentajes de remoción de diferentes colorantes por Mn-peroxidasa y Lacasas.

Colorante	Remoción (%)
Solofenil azul BFF	50
Solofenil rojo 7BE	50
Cibacron amarillo P-6gs	50
Cibacron rojo FN-3g	50
Cibacron marino FN-B	50
Cibacron escarlata C-6g	50
Cibacron violeta W-HB	50
Cibacron verde BF	50
Solofenil azul BF	82
Azo-orange II	95

De los resultados obtenidos para los colorantes estudiados en este trabajo y al comparar con lo que reporta el grupo de Sánchez-López et al., se tiene que para el azul solofenil BF lograron un porcentaje de remoción del 82% y los obtenidos con el CPOCh se encuentran diez unidades más altos. Con respecto al colorante negro directo 22 el porcentaje de remoción logrado con la CPOCh fue al menos del 97.9% y comparado con uno similar el azo-orange II, ellos lograron una remoción del 95.0%, valores muy similares, sin embargo hay que destacar que en esta investigación solo se utilizó un CPOCh y el grupo de Sánchez-López un complejo enzimático Mn-peroxidasa-lacasa.

4.4 Caracterización de los productos de reacción de fenoles y colorantes

4.4.1 Espectroscopía UV/vis de los productos de oxidación del fenol y 2-clorofenol

El espectro de absorción UV/vis de los productos obtenidos a partir de la transformación del fenol con el CPOCh se presenta en la figura 16, donde se observa una intensa banda a 399 nm, que al compararla con la banda de absorción característica del fenol localizada a 270 nm, confirma su transformación.

En la figura 17 se presenta el espectro de absorción UV/vis de los productos de transformación del 2-clorofenol, el cual presenta una banda de absorción máxima a 420 nm, mientras que la del contaminante en solución se localiza a 270 nm, lo cual indica su transformación.

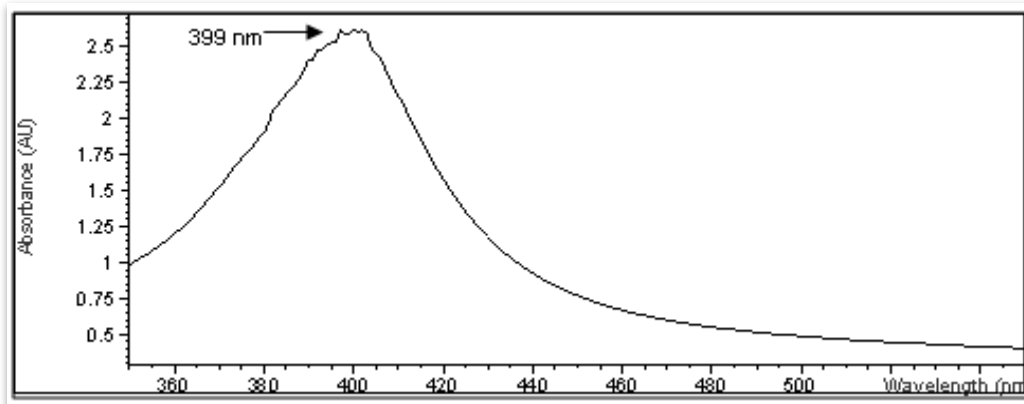


Figura 16. Espectro de absorción UV/vis de los productos de reacción del fenol después de su tratamiento con el CPOCh, presentando un máximo de absorción a los 399 nm.

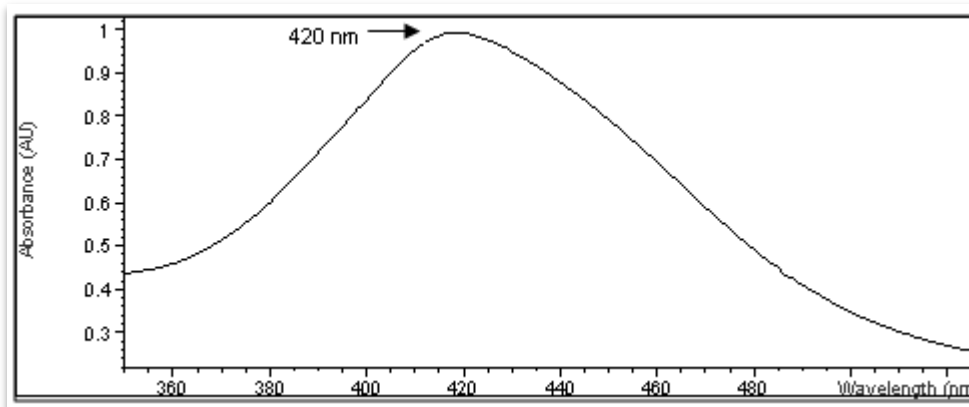


Figura 17. Espectro de absorción UV/vis de los productos de reacción de 2-clorofenol después de su tratamiento con el CPOCh.

Si se comparan las longitudes de onda de los productos de reacción del fenol y 2-clorofenol, este último presenta un efecto batocrómico con respecto al primer contaminante, probablemente por la presencia del cloro como sustituyente.

Danner et al. (1973) reportaron que la oxidación de fenol con HRP-H₂O₂ produce la formación de *o,o'*-bifenol como único metabolito, sin embargo, Sawhata y Neal (1982) obtuvieron el mismo compuesto y además la presencia de *p,p'*-bifenol con

una absorbancia máxima a los 400 nm, el cual es oxidado posteriormente a *p*-difenoquinona. En este trabajo de investigación se tuvo un comportamiento espectroscópico similar para los productos de oxidación del fenol (figura 16).

4.4.2 Espectroscopía de FTIR

En la figura 18 se presenta el espectro de FTIR de los productos de la reacción del contaminante fenol después de su tratamiento enzimático con el CPOCh (Goloukina et al., 1979; Skoog et al., 2001; Hesse et al., 1999).

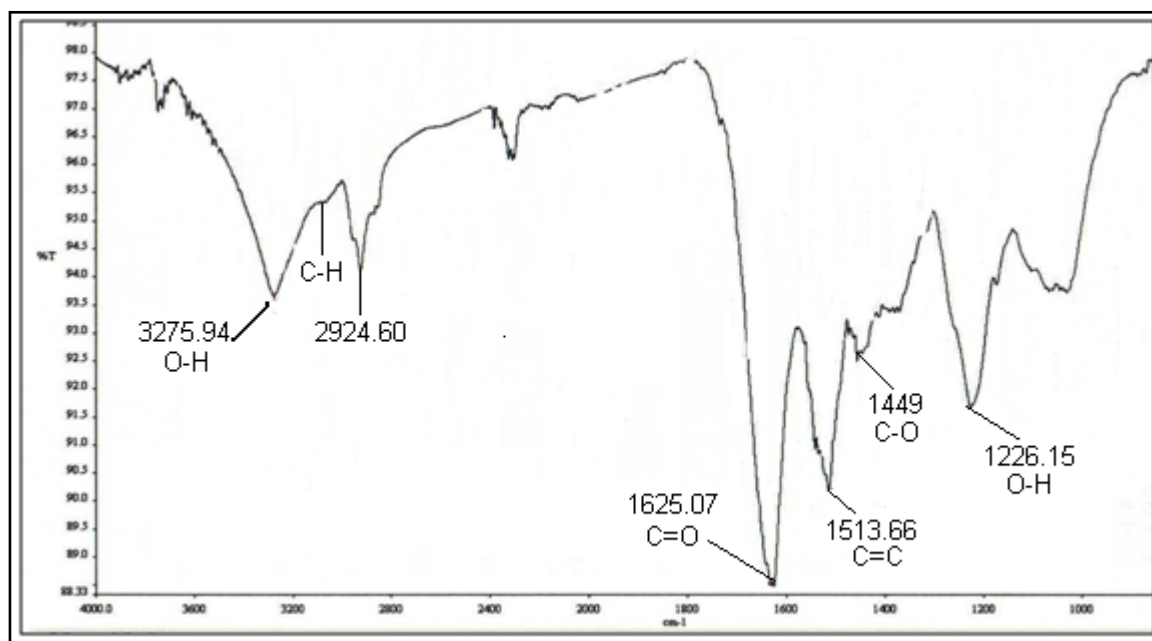


Figura 18. Espectro de FTIR de los productos de reacción de fenol después de su tratamiento con el CPOCh.

Si se comparan estos grupos funcionales con lo obtenido para el contaminante sin tratamiento enzimático (figura 65, anexo D), se observa la ausencia en este último de las banda de vibración a 1625.07 cm⁻¹ correspondiente al grupo C=O de

quinonas y la presencia a 658 cm^{-1} característica del anillo aromático monosustituido para fenol (Skoog et al., 2001).

En la figura 19 se presenta el espectro de FTIR de los productos de la reacción del contaminante 2-clorofenol después de haber sido tratado con el CPOCh.

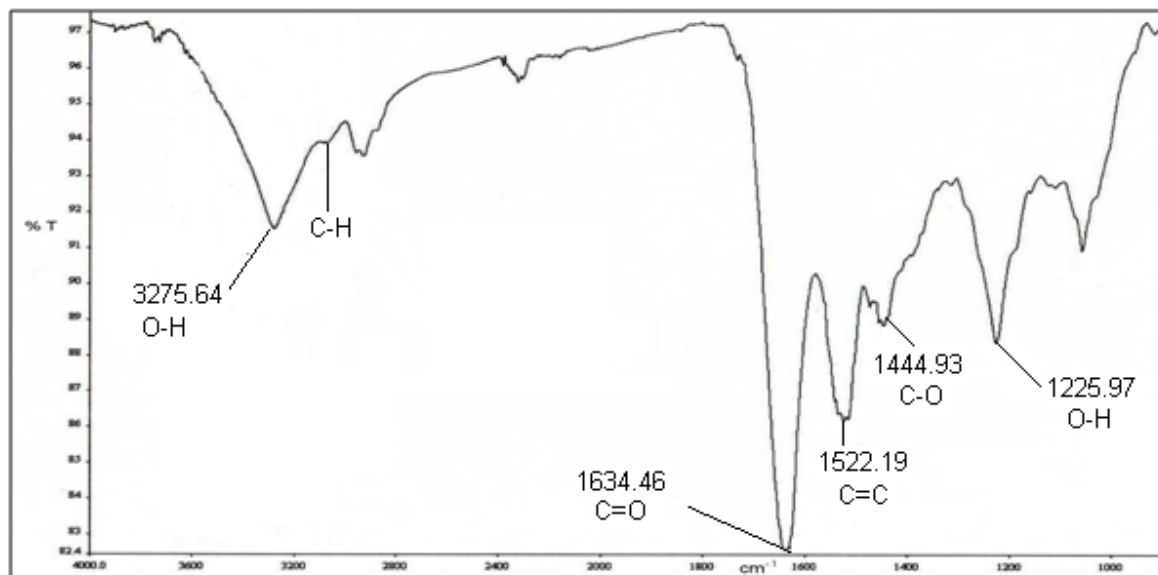


Figura 19. Espectro de FTIR de los productos de reacción del 2-clorofenol después de su tratamiento enzimático.

Al comparar los grupos funcionales del contaminante 2-clorofenol sin tratar (figura 66, anexo D) se observa la ausencia en este último de la banda de vibración a 1634.46 cm^{-1} correspondiente al grupo C=O de quinonas y la presencia de una nueva a 743 cm^{-1} , característica de compuestos aromáticos disustituidos como el 2-clorofenol (Skoog et al., 2001).

Por lo que para ambos contaminantes aparecen bandas características de quinonas, Sawhata y Neal (1982) y Smith et al. (1989) han reportado que la oxidación de fenol por peroxidasas origina *p,p'*-bifenol el cual se transforma a *p*-difenoquinona a través de la semiquinona.

4.4.3 RMN ¹H y Espectrometría de masas

Los análisis por RMN no resultaron claros debido a que se trata de una mezcla de productos de reacción, por lo que no se obtiene información contundente del mismo. Tanto para el análisis por RMN como para la espectrometría de masas es importante realizar una separación y purificación de productos para una identificación precisa. Por lo que solo se propone de los análisis realizados por FTIR que se producen quinonas que precipitan en el medio de reacción.

Un análisis preliminar de los grupos que se lograron identificar mediante RMN ¹H y espectrometría de masas como dímeros, producto de la oxidación de los compuestos fenólicos estudiados, se presenta en el anexo E.

Smith et al. (1989) así como otros autores (Sawhata y Neal 1982; Dec y Bollag 1994) han reportado que los productos de oxidación del fenol por mieloperoxidasas y HRP son *p,p'*-bifenol, *o,o'*-bifenol y *p,p'*-difenoquinona, mediante el mecanismo propuesto en la figura 20. El CPOCh también podría producir estos compuestos de oxidación y por lo tanto se propone continuar con los estudios correspondientes.

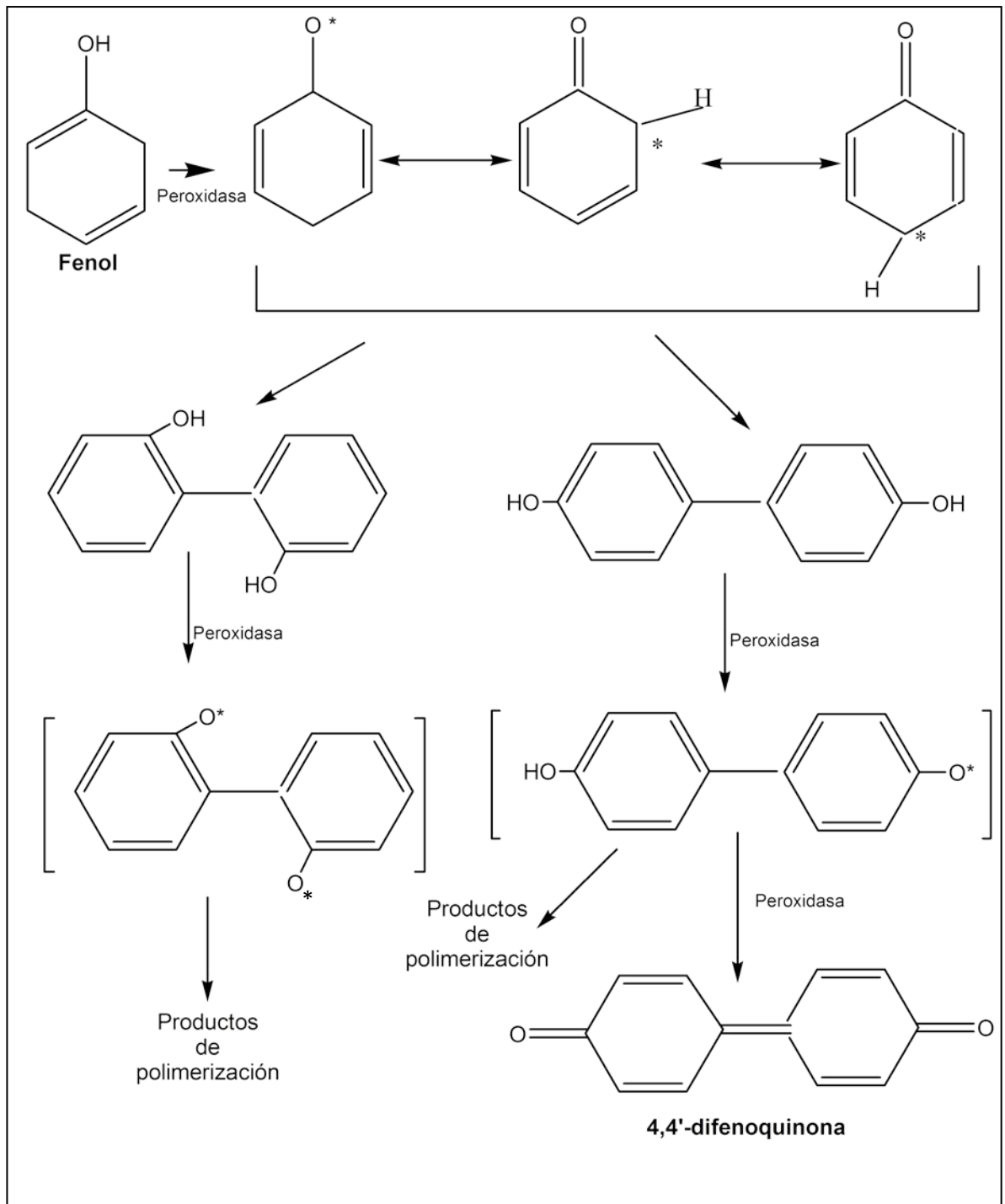


Figura 20. Transformación del fenol por peroxidasa a bifenol y 4,4'-difenol.

4.5 Caracterización espectroscópica UV/vis y FTIR de los productos de reacción de los colorantes

4.5.1 Negro directo 22

El colorante negro directo 22 está clasificado con el color Index 35435, lo que indica que es un colorante poliazos y cuya estructura se presenta en la figura 21 (Novact Corporation 2014).

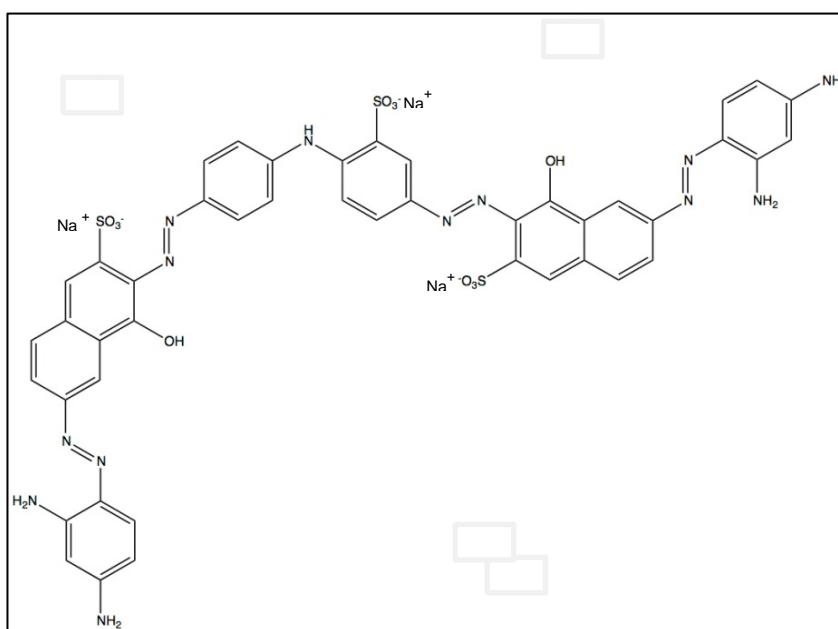


Figura 21. Fórmula estructural del colorante negro directo 22 de masa molecular 1083, NOVAC Corporation (2014).

Los productos de reacción del agua artificialmente contaminada con el colorante negro directo 22 a 100 ppm presentaron color negro. El espectro de absorción UV/vis del sobrenadante ya no presentó absorción en el intervalo de 400 a 700 nm (figura 22) sin embargo, en la región UV se incrementó la absorbancia a partir de la longitud de onda de 220 y teniendo un máximo aproximadamente a los 205 nm, con respecto al agua sin tratamiento, lo que evidencia una transformación del

contaminante con formación de nuevos compuestos (figura 23). Se tuvo el mismo comportamiento para las demás concentraciones estudiadas.

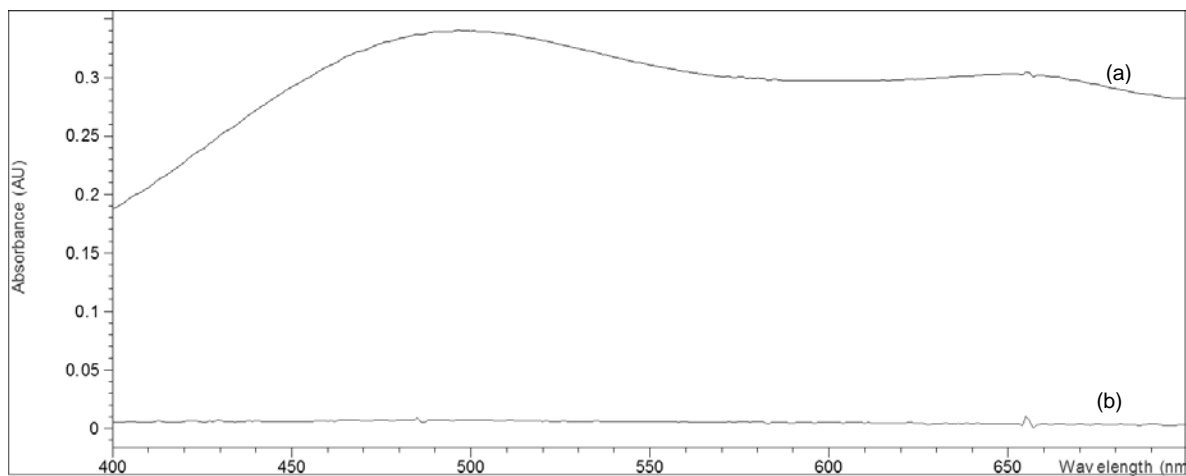


Figura 22. Espectro de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con el colorante negro directo 22 (100 ppm): (a) Agua sin tratar y (b) Agua tratada.

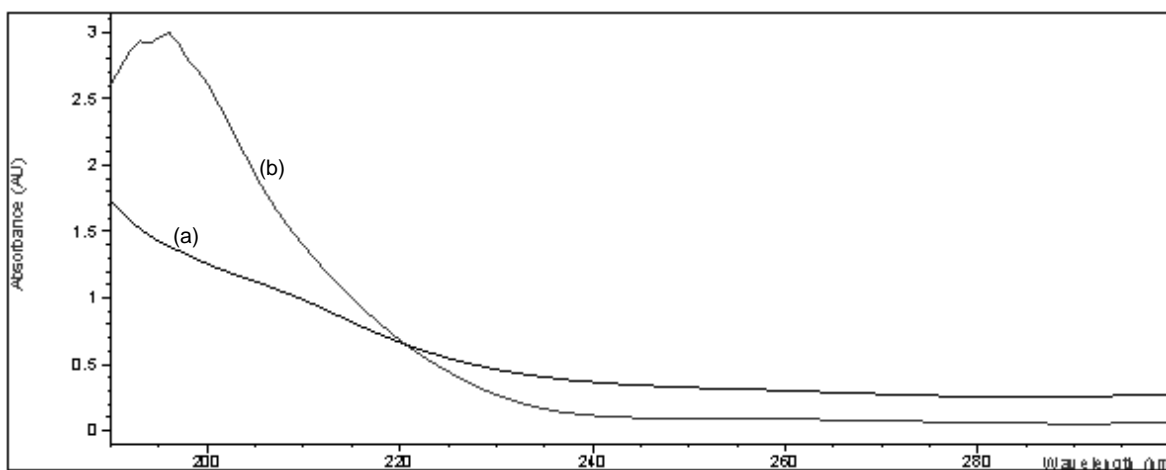


Figura 23. Espectro de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con el colorante negro directo 22 (100 ppm) en el intervalo de longitudes de onda de 300 a 190 nm donde: (a) Agua sin tratar y (b) Agua tratada.

El espectro de FTIR para el colorante negro directo 22 se presenta en la figura 24.

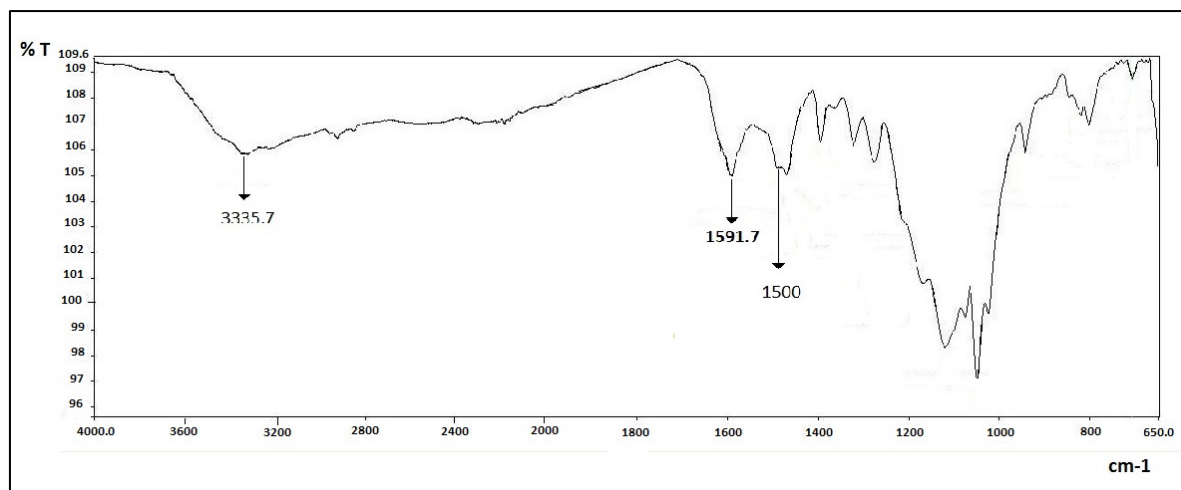


Figura 24. Espectro de FTIR del colorante negro directo 22.

Las principales bandas de vibración que presentó el colorante negro directo 22 se resumen en la tabla 23 (Hesse et al., 1999; Skoog et al., 2001).

Tabla 23. Principales bandas vibracionales obtenidas a partir del espectro del colorante negro 22.

Grupo funcional	λ (cm^{-1})
Aminas	3335.4
-N=N-	1591.7
C=C (vibraciones tensión) aromáticos	1500

El espectro de FTIR de los productos de reacción del colorante negro directo 22 (figura 25) mostró varias bandas de vibración que se resumen en la tabla 24, así como los grupos funcionales correspondientes (Skoog et al., 2001).

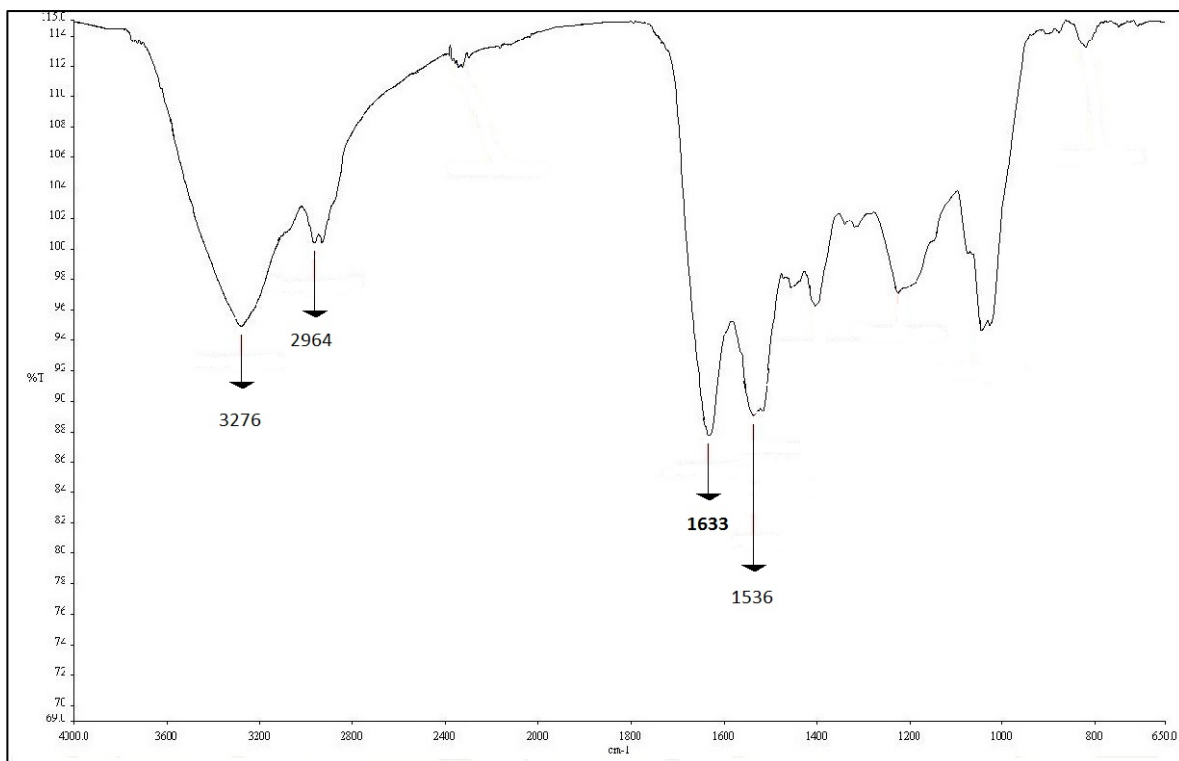


Figura 25. Espectro de FTIR de los productos de reacción del colorante negro directo 22.

Tabla 24. Principales bandas vibracionales obtenidas a partir del espectro de FTIR de los productos de reacción del colorante negro directo 22.

Grupo funcional	λ (cm^{-1})
Aminas	3276
C-H	2964
C=O (carbonilo de quinona)	1633
C=C (vibraciones tensión) aromáticos	1536

De los grupos funcionales aquí identificados se observa que ya no aparece la banda de vibración del grupo azo a los 1592 cm^{-1} (tabla 23) y se presenta la banda del grupo carbonilo de quinona de los productos de reacción en 1633 cm^{-1} .

El análisis del espectro de RMN ^1H de los productos de reacción del colorante negro directo 22 sugiere la presencia de hidrógenos de naftoquinona e hidrógenos aromáticos (anexo E). Con esta información y la proporcionada por FTIR solo se sugiere que se obtienen subproductos con grupos quinona, por lo que se recomienda realizar estudios que permitan confirmar lo aquí mencionado.

La bibliografía no reporta estudios sobre la degradación del colorante negro directo 22 (colorante poliazó) por peroxidasas sin embargo, varios autores han encontrado que en la degradación de colorantes azo mediante estas enzimas se obtienen productos como la 1,2-naftoquinona y acetanilida a partir del colorante disperse yellow 3 naftol (Spadaro y Renganathan, 1994), 1,2-naftoquinona y bencensulfonato y compuestos secundarios a partir del colorante orange II (López-Díaz, 2005), quinona monoamina y derivados nitroso o quinona y derivados fenildiaceno a partir de colorantes azo-sulfonados (Goszczyński et al., 1994), 1,2-naftoquinona y 4-sulfonfenilhidroperóxido y otros compuestos como productos finales de la degradación del colorante orange II (Chivukula et al., 1995).

Del estudio espectroscópico realizado en este trabajo de investigación y lo reportado por los autores antes mencionados, se propone que en la degradación del colorante negro directo 22 se obtienen principalmente productos de quinonas, que a diferencia de lo reportado para la degradación reductiva de compuestos azo como el orange II que da lugar a aminas aromáticas como el 1-amino-2-naftol (Zimmermann et al., 1982), las cuales pueden atravesar con mayor facilidad las membranas celulares, aumentando por tanto la toxicidad cerca de 100 veces según Gottlieb et al., (2003), por lo que seguir una vía de oxidación de estos colorantes mediante peroxidasas genera sustancias menos tóxicas en relación a la anaerobiosis reductiva por bacterias.

4.5.2 Azul solofenil BF

En la figura 26 se muestra el espectro de absorción UV/vis del colorante azul solofenil BF con una intensa banda de absorción entre los 500 y 700 nm y

con un máximo a los 620 nm, además en 257 nm se observa una banda secundaria y en 210 nm una banda asociada a aromáticos (Hesse et al., 1999).

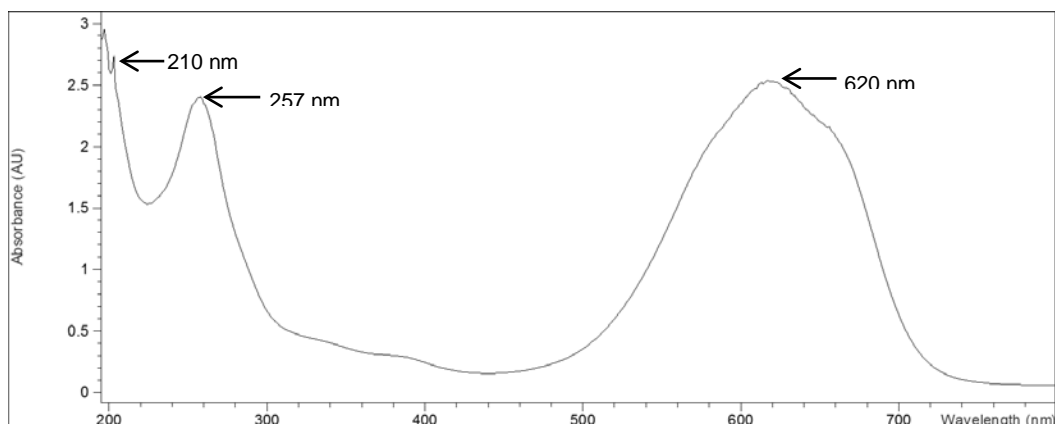


Figura 26. Espectro de absorción UV/vis del colorante azul solofenil BF a 200 ppm.

El colorante azul solofenil BF presenta la fórmula molecular $C_{30}H_{16}Cl_2N_4Na_2O_8S_2$ con una masa de 739.958 y número CAS: 6527-70-4 (Chemical Trading Guidechem, 2014). La fórmula estructural se presenta en la figura 27.

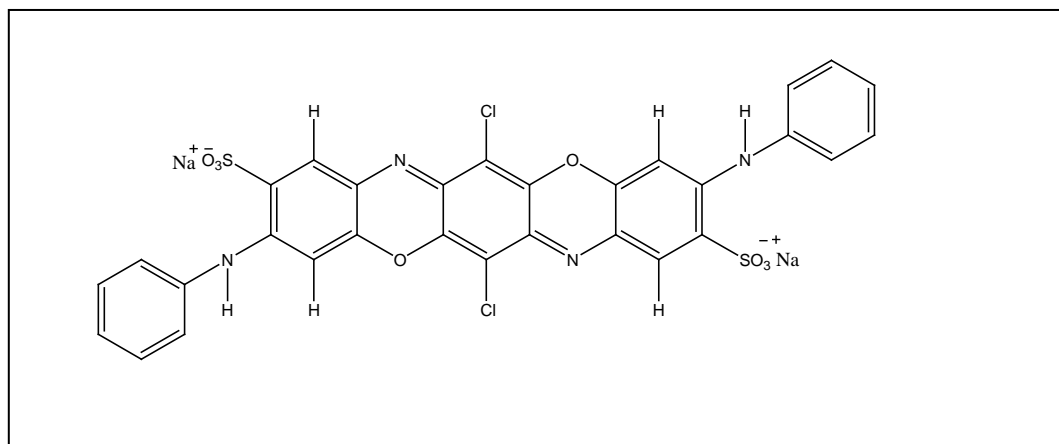


Figura 27. Estructura química del colorante azul solofenil BF (Chemical Trading Guidechem, 2014).

Tezcanli-Guyer y Ince (2003) reportaron el espectro de absorción UV/vis y la estructura para el colorante basic blue 3, que muestra un máximo de absorción a

650 nm y asignado al grupo cromóforo de oxazina y una banda secundaria a 254 nm, en general un espectro de UV/vis similar al de azul solofenil BF el cual también es de naturaleza oxazina.

El espectro de FTIR del colorante azul solofenil BF se muestra en la figura 28 (Hesse et al., 1999; Skoog et al., 2001) y en la tabla 25 las principales bandas de vibración detectadas.

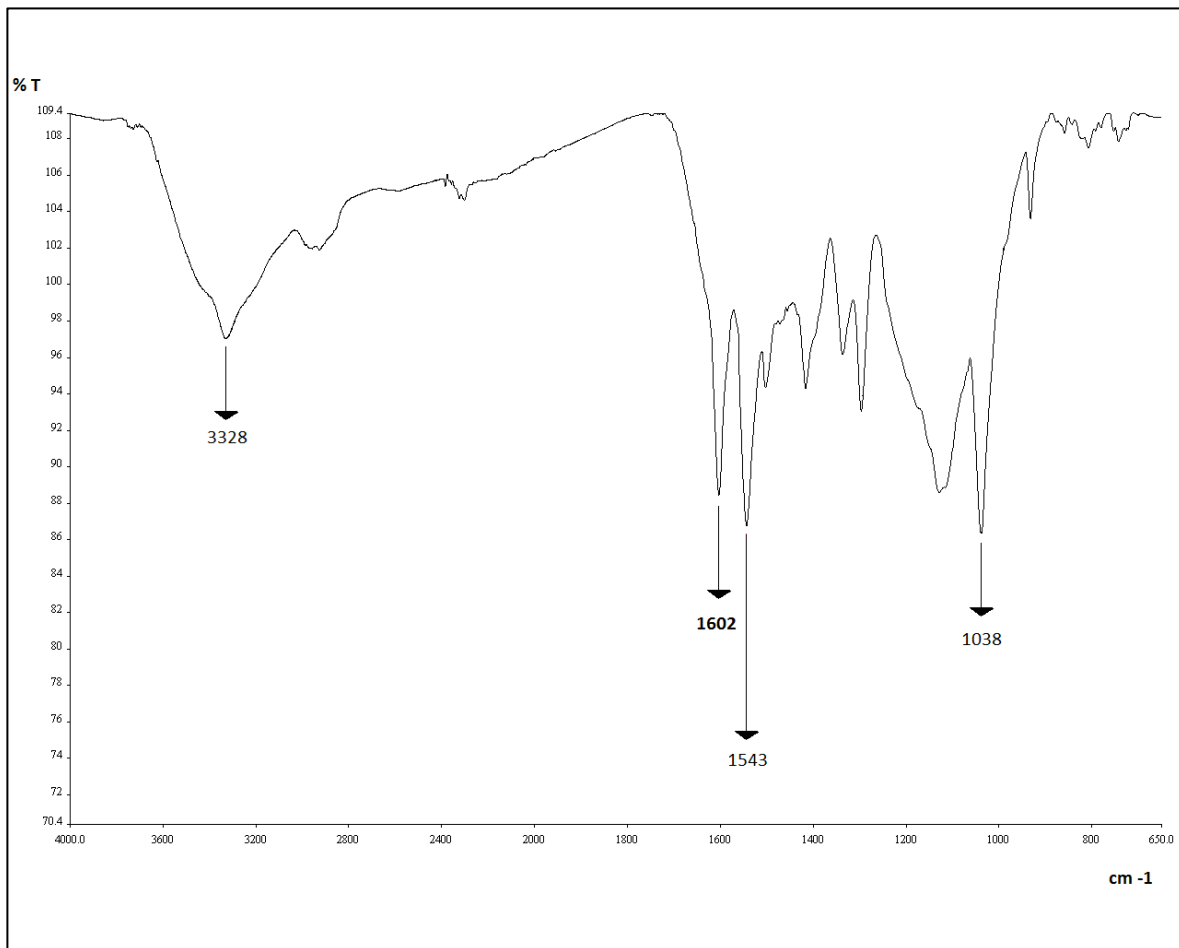


Figura 28. Espectro de FTIR del colorante azul solofenil BF.

Tabla 25. Principales grupos funcionales identificados a partir del espectro de FTIR del colorante azul solofenil BF.	
Grupo funcional	No. de onda (cm⁻¹)
C-Cl (vibración de tensión)	1038
C=C (vibración de tensión)	1543
Iminas	1602
Aminas	3328

Como se ve en la tabla 25 presenta grupos como aminas e iminas, que confirman la naturaleza del colorante.

Con respecto al tratamiento del agua artificialmente contaminada con el colorante azul solofenil BF, en la figura 29 se presentan los espectros de absorción UV/vis antes y después de su tratamiento enzimático, donde se observa una disminución en la absorbancia alrededor de los 620 nm sin embargo, a partir de los 520 nm y hacia niveles de mayor energía hay un incremento de la misma indicando una reacción química y síntesis de nuevos compuestos después de su tratamiento enzimático.

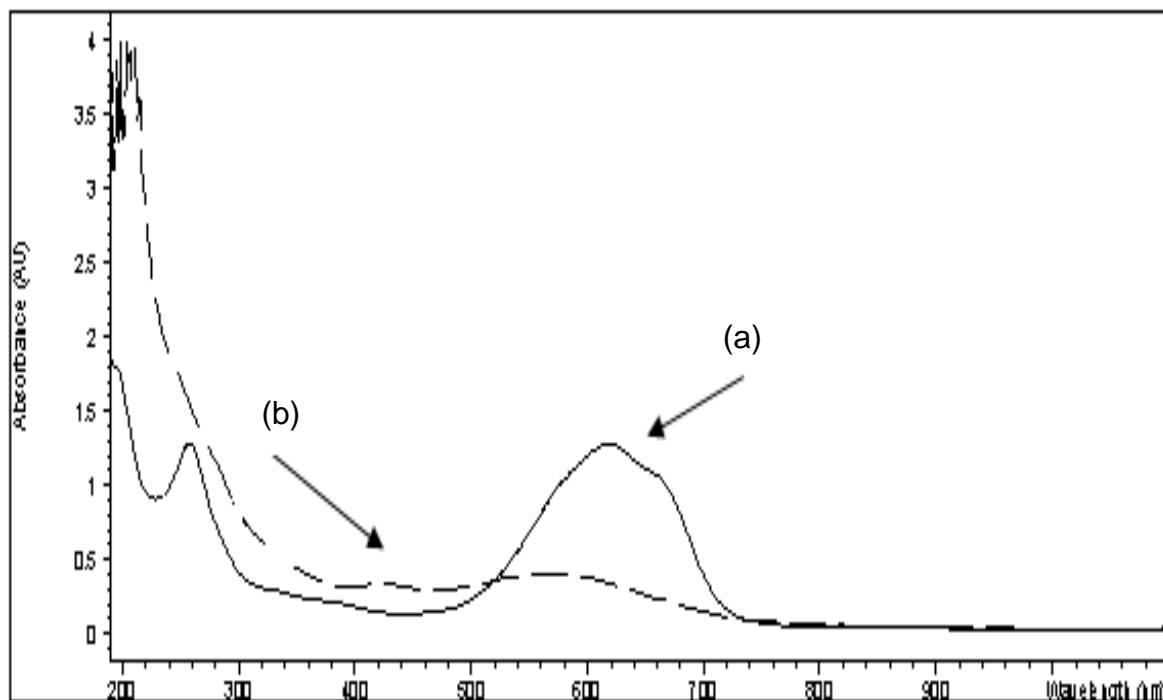


Figura 29. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con el colorante azul solofenil BF. a) Agua sin tratar b) Agua tratada sin centrifugar.

Sánchez-López et al. (2010) obtuvieron un comportamiento similar al estudiar mediante espectroscopía de absorción UV/vis los productos de reacción del azul solofenil BFF utilizando un concentrado enzimático de lacasas y manganeso-peroxidasa producidos por *Trametes máxima*, obteniendo un incremento en la absorbancia en los 510 nm y hacia la región UV.

El espectro de FTIR de los productos de reacción del colorante azul solofenil BF se muestra en la figura 30 y los grupos funcionales identificados de mayor relevancia se presentan en la tabla 26 (Hesse et al., 1999; Skoog et al., 2001).

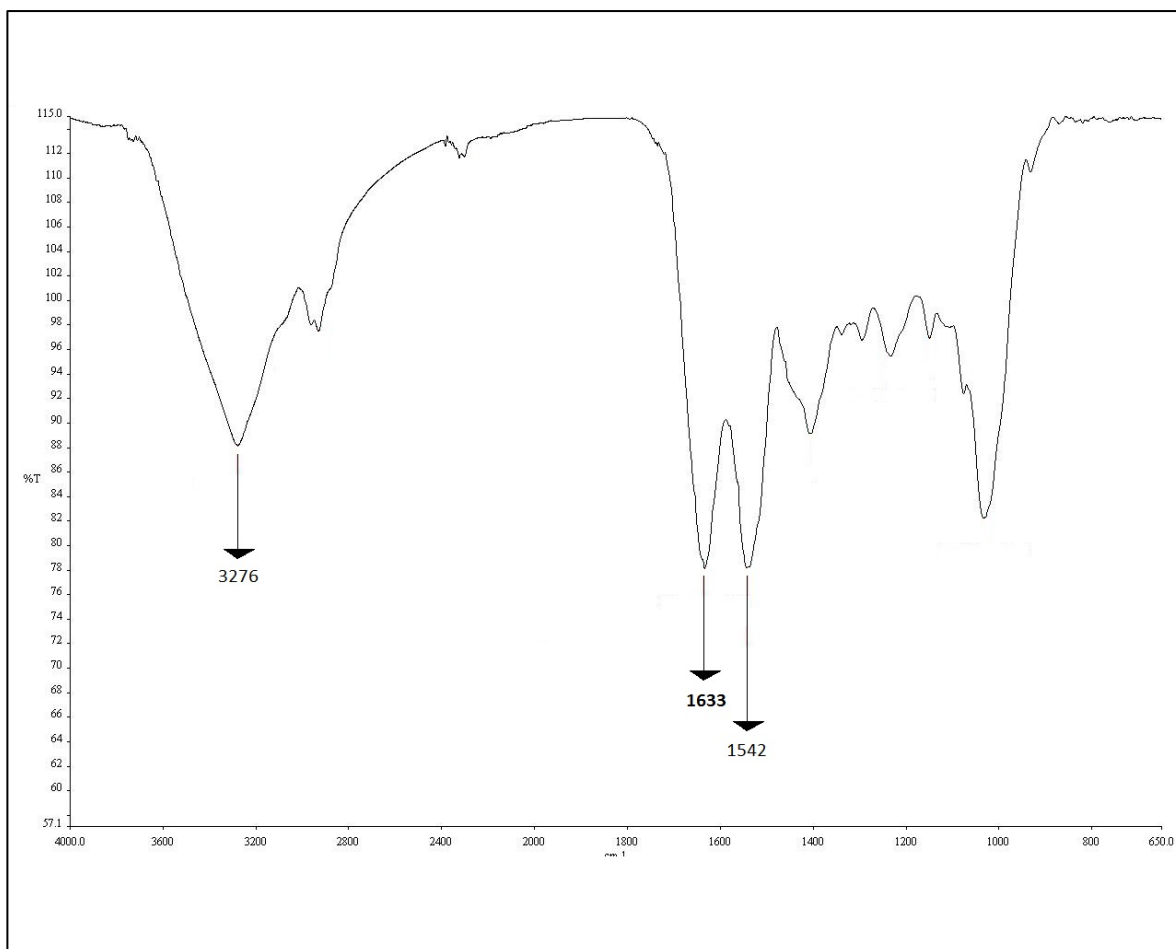


Figura 30. Espectro de FTIR de los productos de reacción del colorante azul solofenil BF.

Tabla 26. Principales grupos funcionales identificados del espectro FTIR de los productos de reacción del colorante azul solofenil BF.

Grupo funcional	No. de onda (cm⁻¹)
Aminas	3276
C=O (carbonilo de quinonas)	1633
C=C (vibración de tensión de aromáticos)	1542

Se observa que de los grupos funcionales obtenidos de los productos de reacción del colorante ya no está presente la del grupo imina (1602 cm^{-1}), y aparece una banda a los 1633 de quinona, lo que indica que el colorante azul solofenil BF en el agua artificialmente contaminada se ha transformado en otros productos después de su tratamiento con el CPOCh.

El análisis del espectro de RMN ^1H del colorante azul solofenil BF se presenta en el anexo E y en virtud que los productos de reacción no se encuentran puros, solo se sugiere que sean quinonas.

No se encontraron reportes en la literatura de la degradación de colorantes de oxazina por peroxidasas y así compararlos con lo obtenido en esta investigación, por lo tanto de los estudios realizados de UV/vis, FTIR y RMN ^1H se mostró que se logró transformar al colorante y se propone que sus productos de reacción sean del tipo quinona, sugiriéndose realizar un estudio más detallado para confirmar lo propuesto.

4.5.3 Azul erionyl A-R

El espectro de absorción UV/vis del colorante azul erionyl A-R (figura 31) presentó dos máximos de absorción a las longitudes de onda de 630 y 580 nm y otras en la región ultravioleta en los 230 y 255 nm .

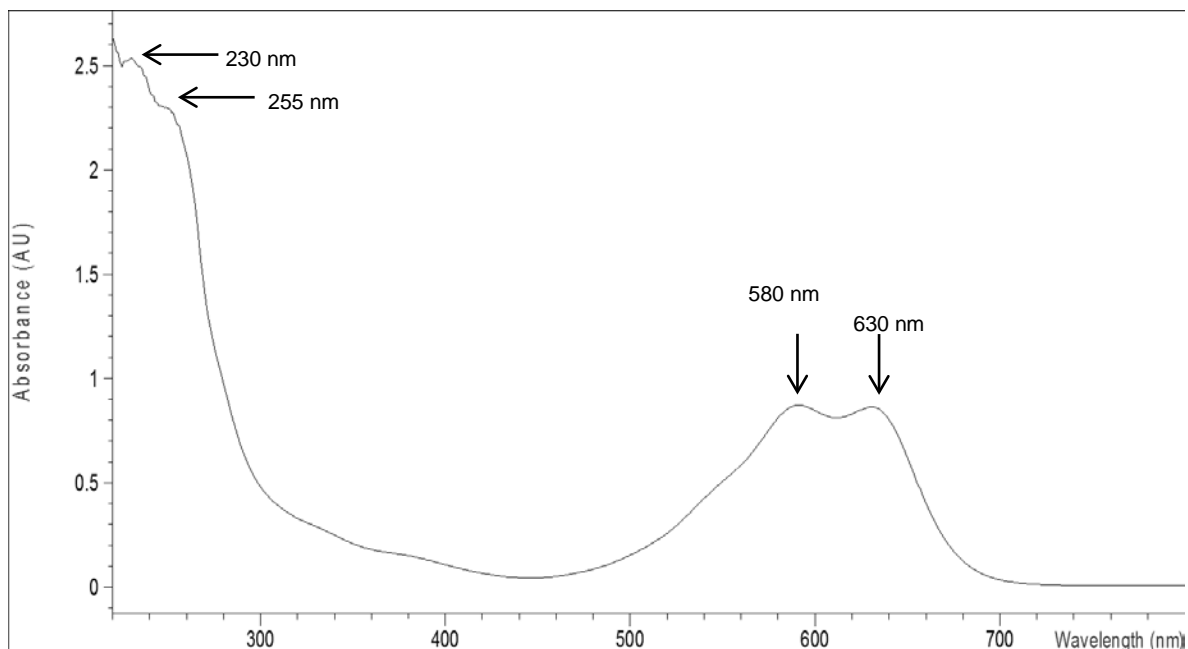


Figura 31. Espectro de absorción UV/vis del colorante azul erionil.

El colorante azul erionil A-R está clasificado como azul ácido 260 con número CAS 62168-86-9 (Dye World dye variety, 2014) tiene una fórmula molecular $C_{26}H_{23}ClN_3NaO_6S$ con una masa de 563.96 g/mol, pertenece a la familia de las antraquinonas y su estructura se presenta en la figura 32. Este colorante es utilizado para teñir fibras de poliamida.

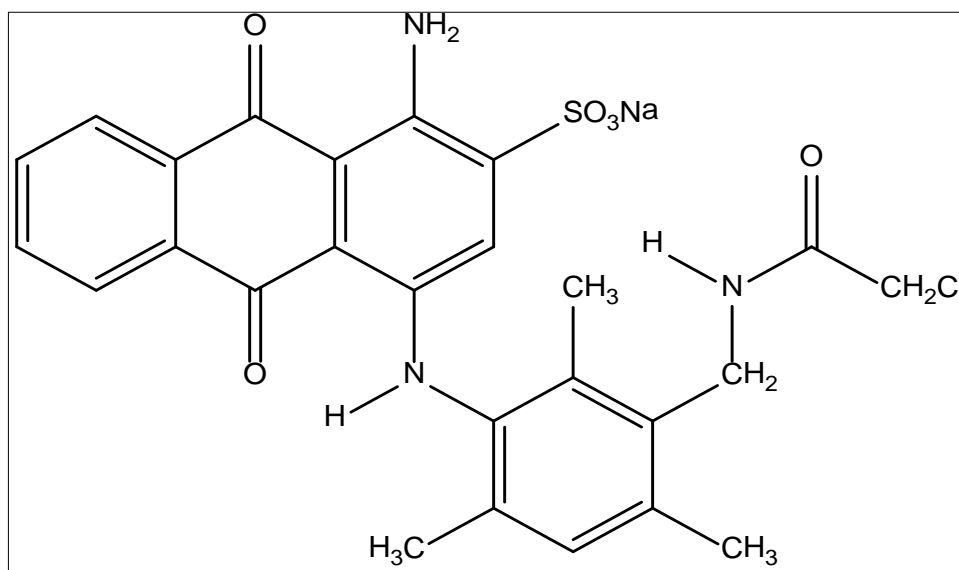


Figura 32. Estructura química del colorante azul erionil A-R.

Después de la reacción enzimática del colorante azul erionyl A-R, el espectro de absorción UV/vis (figura 33) presentó una disminución en la absorbancia entre los 680 y 522 nm, y a partir de esta última longitud de onda hay un incremento de la absorbancia hasta los 264 nm, en donde nuevamente se presenta una intersección con el espectro UV/vis del agua sin tratar disminuyendo la absorbancia. Todos estos cambios en el espectro del agua tratada, muestra que sí hubo una reacción química del colorante.

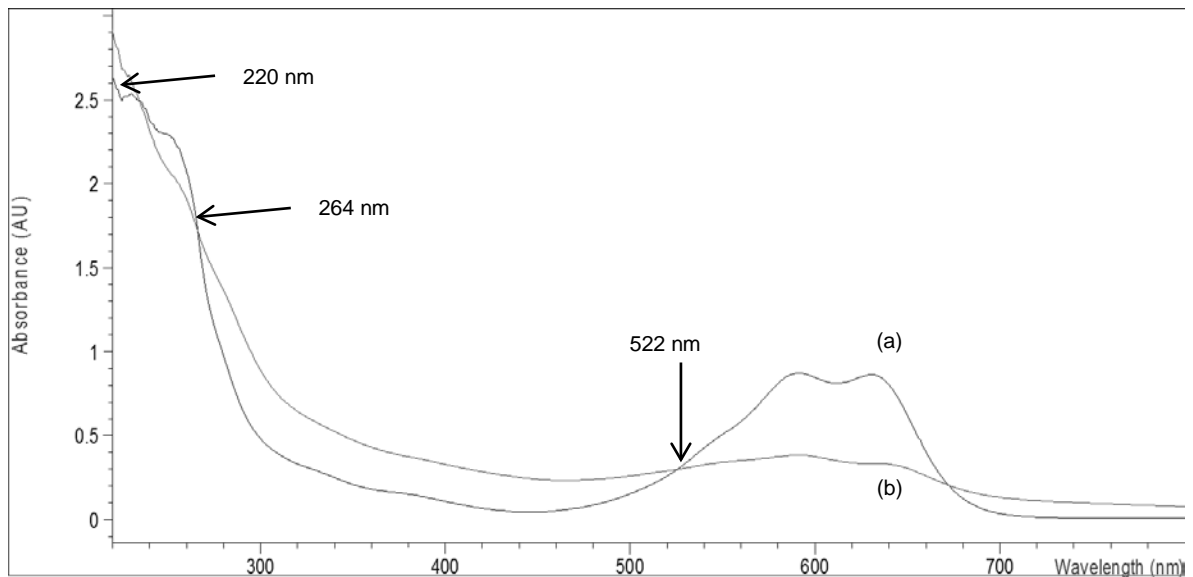


Figura 33. Espectros de absorción UV/vis del colorante azul erionyl A-R. (a) Agua sin tratar y (b) Agua tratada con el CPOCh sin centrifugar.

Sánchez-López et al. (2010) demostraron la capacidad de *Trametes maxima* cepa MUCL 44155 de producir enzimas lacasa y manganeso peroxidasa capaces de degradar al colorante azul erionyl A-R, y cuyo espectro de absorción UV/vis de los productos de reacción presentó un incremento en la absorbancia a partir de los 520 nm y hacia la región ultravioleta.

Sugano et al. (2009), reporta el espectro de absorción UV/vis del colorante azul reactivo 5 (tipo antraquinona), que al ser degradado por la peroxidasa DyP de *Thanatephorus cucumeris Dec I* presentó una disminución en la absorbancia a los 600 nm y aproximadamente a los 510 nm hubo un incremento de la misma,

debido al color café-rojizo después de la reacción. Sí esto se compara con lo encontrado para el azul de erionyl A-R y el CPOCh se tiene un comportamiento similar.

Sugano (2009) realizó estudios mediante ionización por electroespray (ESI) y resonancia magnética nuclear, encontrando que colorantes de antraquinona incluyendo el azul 5 reactivo, son degradados por DyP produciendo como resultado: ácido ftático, un producto de peso molecular de 472.5 (producto 2) y otro de 301.5 (producto 3). Estos últimos son generados por la reacción de peroxidasas, mientras que el ácido ftático fue producido por la reacción de hidrolasas y oxigenasas y posteriormente es transformado al compuesto 2,2-disulfonilazobenceno, como se describió en la figura 4.

Es importante mencionar que existe poca información de los productos de reacción de colorantes del tipo antraquinona utilizando peroxidasas y en el reporte que encontramos utilizan enzimas fúngicas, en las cuales además participan hidrolasas y oxigenasas, mientras que la degradación del azul erionyl en este trabajo solo se utilizó al CPOCh.

4.6. Remoción de colorantes de muestras de aguas residuales textiles

4.6.1. Origen del agua residual textil a tratar

Las muestras de agua se recolectaron de una lavandería de mezclilla de la población de Santa Ana Xalmimilulco, que se ubica en el municipio Huejotzingo en el Estado de Puebla en las coordenadas geográficas de latitud 19.0133 y longitud de -98.3933 y a 2220 metros sobre el nivel del mar (msnm).

4.6.2 Parámetros determinados al agua residual textil a tratar

Los parámetros determinados a las muestras de las aguas textiles se resumen en la tabla 27.

Tabla 27. Parámetros determinados a las muestras de aguas residuales textiles.				
Muestra	Color	Sedimento	pH	T (°C)
Teñido	Negro intenso	Poco	8.36	80
Total	Negro	Moderado	8.95	70

Como se observa ambas presentaron alta temperatura al momento de la descarga, poco sedimento en la muestra de teñido con respecto a la muestra total, debido a que esta última es el conjunto de varias etapas en el proceso de tratamiento de la mezclilla además, de que se mezcla con agua residual doméstica y el pH de ambas fue mayor a 8.

4.6.3. Tratamiento del agua residual textil

Los espectros de absorción UV/vis de la muestra de teñido antes y después de haber sido tratada con el CPOCh y H₂O₂ se presentan en la figura 34. Es importante mencionar que debido a la alta concentración del colorante en el agua, la muestra fue diluida en una relación de 1:6, para el estudio espectroscópico. Para ambas muestras se adicionaron 2.5 mL del CPOCh (4.5×10^{-7} M) y 1.25 mL de H₂O₂ (6.15×10^{-3} M).

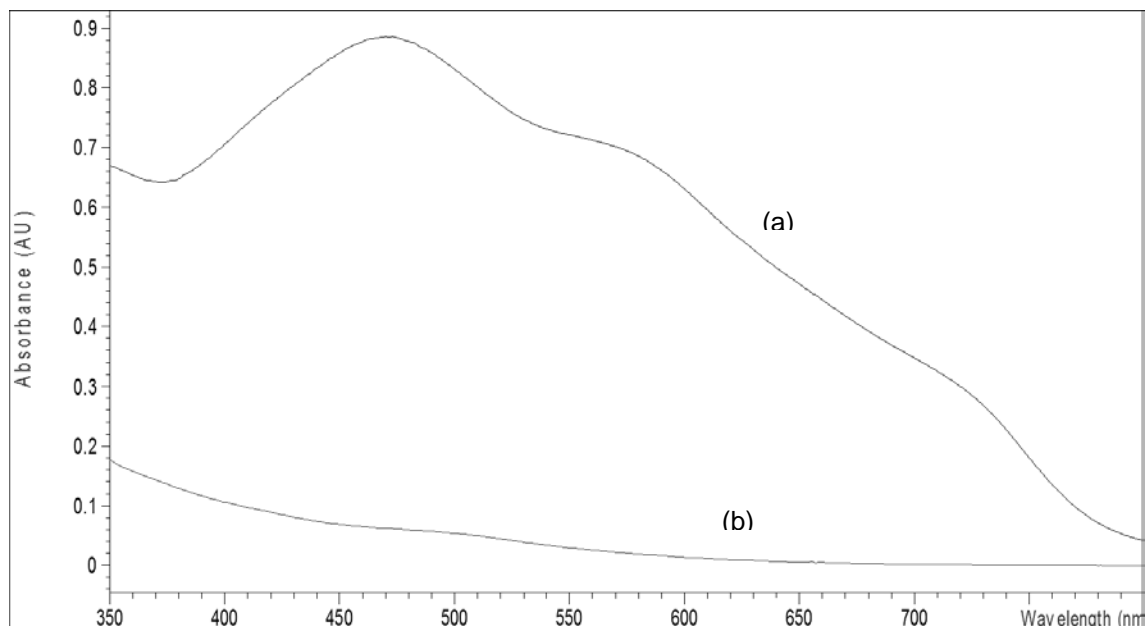


Figura 34. Espectros de absorción UV/vis de la muestra de tñido: (a) Agua sin tratar y (b) Agua después de haber sido tratada.

Para el caso de la muestra total presentó sedimentos como fibras de algodón, entre otros. En la figura 35 se presentan los espectros de absorción UV/vis de ésta antes y después del haber sido tratada enzimáticamente con el CPOCh.

Tanto para la muestra de tñido como para la total, sus espectros de absorción UV/vis mostraron cambios significativos después de su tratamiento enzimático, lo que indica una transformación del colorante.

En la tabla 28 se presentan los resultados obtenidos del porcentaje de remoción promedio de las muestras de aguas tratadas (anexo F).

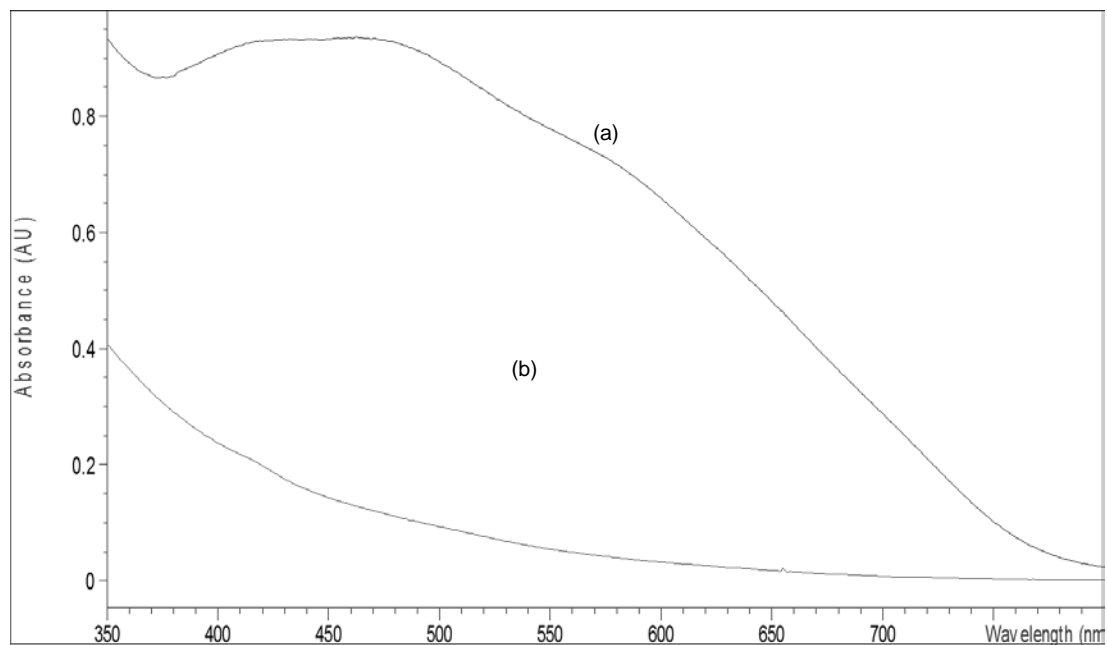


Figura 35. Espectros de absorción UV/vis del agua de la muestra total: (a) Agua sin tratar y (b) Agua después de haber sido tratada.

Tabla 28. Porcentaje de remoción de las muestras del agua residual textil tratadas con el CPOCh.		
Muestra	λ (nm)	Remoción (%)
Teñido	470	93.20
Total	470	83.35

De la tabla anterior se observa que el mayor porcentaje de remoción logrado fue para la muestra de teñido aunque solo un poco mayor que el de la muestra total. Una probable explicación es que para el caso de la muestra de teñido sólo tiene agua y el colorante, mientras que la muestra total es una mezcla de aguas residuales de diferentes etapas del proceso en la lavandería como el desgomado,

blanqueo, teñido, lavado, descruce de la fibra (donde se utiliza a la enzima α -amilasa, humectantes y otras sustancias) que podrían estar interfiriendo con la actividad enzimática del CPOCh o bien que no permite que las moléculas del colorante y la enzima interactúen eficientemente. Además, es importante resaltar que el CPOCh removió al contaminante en muestras de agua que presentan un pH alcalino.

Se determinó la concentración del colorante negro directo 22 en las muestras de agua residual textil antes y después de su tratamiento enzimático mediante una curva de calibración del mismo (anexo G).

La tabla 29 presenta los valores de la concentración del colorante negro directo 22 de las muestras de agua residual textil antes y después del tratamiento, así como la remoción obtenida.

Tabla 29. Concentración de colorante negro directo 22 de las muestras de agua residual textil antes y después de su tratamiento			
Muestra	Concentración antes del tratamiento (ppm)	Concentración después del tratamiento (ppm)	Remoción (ppm)
Teñido	1492.00	161.82	1330.18
Total	262.54	52.86	209.68

Es importante mencionar que el colorante azo negro directo 22 como parte fundamental en la composición de las muestras de agua residual textil tratadas, fue el mismo con el que se realizaron los estudios de remoción del agua artificialmente contaminada, por lo que los productos de oxidación obtenidos del agua residual se espera sean principalmente quinonas como fue propuesto de los correspondientes de las aguas artificialmente contaminadas.

Varios autores reportan que la oxidación de colorantes azo por peroxidasas origina principalmente la formación de naftoquinonas (Spadaro y Renganathan, 1994; Goszczynski et al., 1994; Chivukula et al., 1995; López-Díaz, 2005), por lo que es importante mencionar que las naftoquinonas son pigmentos naturales, que tienen características espectrales al poseer dos grupos carbonilo en las posiciones 1,4 y con menor frecuencia en 1,2 o 1,3 en el anillo del naftaleno; su distribución es amplia y se han aislado de plantas, hongos, bacterias, encontrándose en mayor proporción en plantas superiores (Lopez et al., 2011). En contraste Mohana et al. (2008) reporta que utilizando un consorcio microbiano aplicado en el tratamiento de un agua contaminada con negro directo 22 obtienen como productos de degradación 1-naftol y difenilamina como producto de la reducción anaeróbica. Cabe mencionar que la difenilamina se ha reportado con efectos agudos de enrojecimiento cuando está en contacto con la piel y los ojos, cuando se inhala se presenta tos y dolor de garganta y como efectos crónicos se ha reportado daños en riñones (ECO-SUR, 2012) y para el 1-naftol provoca irritación en vías respiratorias, tos, dificultades respiratorias y dermatitis, mientras que por ingestión provoca ansiedad, problemas renales, aturdimiento, dolores de cabeza y espasmos (Quantyka Fine Chemicals, 2014).

El agua residual del proceso de teñido y acabado de la mezclilla de la lavandería de Santa Ana Xalmimilulco es descargada directamente al drenaje y posteriormente se incorpora al afluente del río Atoyac el cual debería ser saneado, sin embargo las estadísticas de nivel de cumplimiento son engañosas, ya que actualmente cuando se habla de aumentar el porcentaje de agua residual tratada, en los planes gubernamentales sólo se refieren al agua colectada en los sistemas formales de alcantarillado municipal y que reciben tratamiento, pero no consideran las descargas industriales (BID, 2013).

Por lo antes mencionado es urgente proponer al sector industrial textil alternativas de tratamiento de sus aguas residuales como la aquí encontrada para disminuir la contaminación de ríos como el Atoyac y el Alseseca.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

1. El concentrado de peroxidasas de chayote fue capaz de remover a los contaminantes estudiados en altos porcentajes.
2. Los estudios mostraron que la actividad enzimática del concentrado de peroxidasas de chayote fue estable en el intervalo de pH de 3.33 a 9.10, presentando su mayor valor a pH 6.0, mientras que para la temperatura fue de 40 a 70°C durante 30 minutos, con su máximo a 70°C. Además, aunque por un periodo de tiempo corto se presentó buena actividad a los 80°C, la vida media para la fracción termorresistente y termolábil fue de 34.18 min y 18.50 s, respectivamente a esta temperatura.
3. El estudio cinético del concentrado de peroxidasas de chayote mostró un comportamiento según Michaelis-Menten, ajustándose al modelo de ping-pong clásico y las constantes catalíticas aparentes determinadas fueron para peróxido de hidrógeno (K_A) de 1.5×10^{-3} M, para guayacol (K_B) de 5×10^{-3} M y la constante de velocidad máxima teórica fue de $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.
5. El agua artificialmente contaminada con fenol a las diferentes concentraciones se logró transformarlo del 95.33 al 97.07% con tiempos de reacción de 1 a 3 min y sus productos de reacción fueron removidos con una eficacia del 97.28 al 98.58%.
6. El 2-clorofenol se logró transformar en un 95.9% en el agua artificialmente contaminada y tratada enzimáticamente y sus productos de reacción fueron removidos en un 99.6%.
7. Se logró remover al colorante negro directo 22 en el agua artificialmente contaminada a las concentraciones estudiadas en el intervalo de 97.9 a 99.6%.

9. Para los colorantes textiles azul solofenil BF, erionyl A-R, cibanon RS-JM y cibacron FN-R en aguas artificialmente contaminadas a las diferentes concentraciones estudiadas se lograron remociones en el intervalo del 95.9 al 98.3%.

10. Los estudios por espectroscopía FTIR de los compuestos de oxidación del fenol y 2-clorofenol mostraron que se formaron quinonas y por espectrometría de masas se sugiere la formación de dímeros.

11. La caracterización espectroscópica de los productos de reacción del colorante negro directo 22 y azul solofenil BF mostró que la reacción de oxidación conduce a la formación de quinonas.

12. Las muestras de agua residual con el colorante negro directo 22 obtenidas de la lavandería de Santa Ana Xamimilulco, Puebla, después de su tratamiento con el concentrado de peroxidasas de chayote se logró remover el 83.35% para la muestra total y el 93.20% para la de teñido.

El concentrado de peroxidasas de chayote logró remover a los colorantes estudiados que son de naturaleza azo, oxazina y antraquinona, abriendo así la posibilidad de aplicarlo a otros semejantes.

BIBLIOGRAFÍA

- Agency for toxic substances and disease registry. (1999). Toxicological profile for chlorophenols. U.S. Department of Health and Human Services
- Akkara, J., A., Holliston, Madhv, S. R., Ayyagari, Brighton, David, L. & Kaplan., Stoww. (2002). Large-Scale Production of Polyphenols or Polyaromatic amines using enzyme-mediated reactions, Patent No: US 6444450 B2.
- Al/Kassim, L., Taylor, K.E., Nicell, J.A., Bewtra, J,K., Biswas, N. (1994). Enzimatic removal of selected aromatic contaminants from wastewater by a fungal peroxidase from *Coprinus macrorhizus* in batch reactors. J. Chem. Tech. Biotechnol., 61,179-182.
- Atanor (2010) extraído de:
http://www.atanor.com.ar/esp/negocios_domesticos/quimicos/productos/fenol.php.
- Autenrieth, R., Bonner, J., Akgerman, A., Okaygun, M., McCreary, E.M. (1991). Biodegradation of phenolic wastes. Journal of Hazardous Materials, 28, 29-53.
- Baek, H. K. and Van Wart, H. E. (1989). Elementary steps in the formation of horseradish peroxidase compound I: direct observation of compound O, a new intermediate with a hyperporphyrin spectrum. Biochemistry, 28(14), 5714-5719.
- Bansal, N., Kanwar, S. S., Torres-Duarte, C., Vazquez-Duhalt, R. (2010). Peroxidase(s) in environment protection. The Scientific World Journal Applications and Prospective of Peroxidase Biocatalysis in the Environmental Field. In Biocatalysis Based on Heme Peroxidases. Springer, Berlin Heidelberg 179-206.
- Bhunja, A., Durani, S., Wangikar, P. P. (2001). Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. Biotechnol Bioeng., 72(5), 562-567.
- BID (Banco Interamericano de Desarrollo) (2013). Tratamiento de aguas residuales en México, Recogido de: http://hispagua.cedex.es/sites/default/files/hispagua_documento/Tratamiento_de_aguas_residuales_en_Mexico.pdf Octubre, 2013. Bioquímica. Pearson. 130
- Board, N. (2003). The Complete Technology Book on Dyes & Dye Intermediates, ed. National Institute of Industrial Research: Dehli, pp. 730.
- Bohinski, R. C. (1998). Bioquímica.5a. Ed. Addison Wesley Logman de México, S.A. de C. V, México, p 180-1994.

- Borzelleca, J.F., Hayes, J.R., Condie, L.W., Egle J.L. (1985). Acute toxicity of monochlorophenols, dichlorophenols and pentachlorophenols in the mouse. *Toxicology Letters*, 29(1), 39-42.
- Cadena, I. J. (2010). GISeM: Rescatando y Aprovechando los Recursos Filogenéticos de Mesoamérica Volumen 1: Chayote. Colegio de Postgraduados, 5-6.
- Canadian Environmental Protection Act. (2010). Priority Substances List Assessment Report Protection Act Phenol. Environment Canada, Health Canada.
- Caramyshev, A. V., Firsova, Y. N., Slasty, E. A., Tagaev, A. A., Potapenko, N. V., Lobakova, E. S., Pletjushkina, O. Y. and Sakharov, I. Y. (2006). Purification and characterization of windmill palm tree (*Trachycarpus fortunei*) peroxidase. *J. Agric. Food Chem.*, 54(26); 9888-9894.
- Casella, L., Monzani, E., Nicolis, S., Torres, E., Ayala, M. (2010). Potential Applications of Peroxidases in the Fine Chemical Industries. In *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*. Springer, 111-153.
- Casella, L., Monzani, E., Nicolis, S., Torres, E., Ayala M. (2010). *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*. Springer, Germany, 6:111–143.
- Caza, N., Bewtra, J.K., Biswas, N. and Taylor, K.E. (2000) Removal of toxic phenol and compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase. *Water Research.*, 33, 3012-3018.
- Chivukula, M., Spadaro, J. T. and Renganathan, V. (1995). Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides. *Biochemistry*, 34,7765-7772.
- Cooper, V.A. and Nicell, J.A. (1996). Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. *Water Res.*, 30(4),954-964.
- Cruz, A y Querol, D. (1985). *Catalogo de Recursos Genéticos de Chayote (Sechium edule Sw)*. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Danner, D. J., Brignat, D. J., Archeneaux, D. and Patel, V. (1973). The oxidation of phenol and its reaction product by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Arch. Bioquem. Biophys.*, 156(2), 759-763.

- Dec, J. and Bollag, J. M. (1994). Dehalogenation of Chlorinated Phenols during Oxidative Coupling. *Environ SciTechnol.*, 28(3), 484-490.
- Delee, W., O'Neill, C., Hawkes, F.R. y Pinheiro, H. M. (1998). Anaerobic treatment of textile effluents: a review. *J Chem Technol Biotechnol.*, 73(4),323–335.
- Dicko, M.H., Gruppen, H., Hilhorst, R., Voragen, A.G. and van Berkel, W.J. (2006). Biochemical characterization of the major sorghum grain peroxidase. *FEBS J*, 273(10), 2293-2307.
- Dowe, R. J. and Erman, J. E. (1985). Physicochemical characterization of the alkaline denaturation of cytochrome c peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 87(2),183-189.
- Dunford, H. B. (1982). *Advances in Inorganic Biochemistry*, Volumen 4, 41-68.
- Dunford, H. B. (1991). Peroxidases in Chemistry and Biology. Everse, J., Everse, E. and Grisman, M.B. Eds., Vol II, Chap. I, CRC Press, Inc. Boca Raton, 1-24.
- Dunford, H. B. (1999). Heme Peroxidases. Ed. Wiley -VCH: USA, ISBN 0-471-24244-6. 507.
- Dye World dye variety (2014). Acid Blue 260 Recuperado de: <http://www.worlddyevariety.com/acid-dyes/acid-blue-260.html>.
- ECO-SUR (2012) Difenilamina. Recuperado de: <http://ecosur.net/Sustancias%20Peligrosas/difenilamina.html>.
- English, A. M. (1994). *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*. in R.B. King. 2. Wiley, Chichester, 1682-1697.
- Flores, M. (1989). El chayote *Sechium edule* swartz (cucurbitaceae). *Revista Biológica Tropical*, Supl. 37. Universidad de Costa Rica, Costa Rica. C.A. 11-54.
- Fu, Y. and Viraraghavan, T. (2001). Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresour Technol.*, 79(3), 1037–1040.
- García, B. E. and Fuentes, S. J. A. (2008). ¿Contaminando con sus jeans?. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la universidad veracruzana. La ciencia y el hombre*. Recuperado de: <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol21num1/articulos/contaminando/index.html>.

García, B., Duarte-Vázquez, M. A. y Regalado, C. (2003). Propiedades de la enzima indicadora del escaldado en el procesamiento de alimentos vegetales. Recuperado de:

http://www.Pncta.com.mx/pages/pncta_investigaciones_03h.asp?page=03e15

George, P. (1953). The 3rd intermediate compound of horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, 201, 427-434

Ghiourelotis, M. and Nicell, J. A. (2000). Toxicity of soluble reaction products from the peroxidase-catalyzed polymerization of substituted phenolic compounds. *J Chem Technol Biotechnol.*, 7,98–106.

Gnanamani, A., Bhaskar, M., Ganga, R., Sekaran, G., Sadulla, S. (2004). Chemical and enzymatic interactions of Direct Black 38 and Direct Brown 1 on release of carcinogenic amines. *Chemosphere*, 56(9), 833-841.

Golka, K., Kopps, S. and Myslak, Z. (2004). Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. *Toxicol.*, 151(1), 203-210.

Goloukina, I.F., Krivoshei, I.V., Starodub, V.A., Aleshin, V.G, Gella., I.M., Nemoshkalenko, V.V., Senkovich., A.I. and Surov., Y.N. (1979). Infrared and x-ray photoelectron spectroscopic investigation of tetrathiofulvalene complexes. *Theoretical and Experimental Chemistry*, 15(2), 139-143.

González, P. A., Montero, M. R., Campa, U. M. F., RappoMiguez, S., Pérez, A.R., Aguilar, O. H. & Ortiz, Z. D. (2013) Tribunal Permanente de los Pueblos. Documento de la preaudiencia “Pueblos unidos en defense de la vida” como eje tematico Devastacion ambiental y derechos de los pueblos” Realizada en Plaza Juárez de la ciudad capital de Tlaxcala.

Goszczyński, S., Paszczyński, A., Pasti-Grigsby, M. B., Crawford, R. L. y Crawford, D. L. (1994). New pathway for degradation of sulfonated azo dyes by microbial peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Journal of Bacteriology*, 176(5), 1339-1347.

Gottlieb, A., Shaw, C., Smith, A., Wheatley, A. and Forsythe, S. (2003). The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. *Journal of Biotechnology*, 101(1), 49-56.

Graça, M.B., Soares, M., Amorim, T.P., Lageiro, M., Costa-Ferreira, M. (2006) Pilot-scale Enzymatic Decolorization of Industrial Dyeing Process Wastewater. *Textile Research Journal*, 76(1), 4–11.

- Gregory, P. (2000). Dyes and Dye Intermediates. In Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology; Ed.; John Wiley & Sons, Inc. Vol. pp (Posey y Kim, 1987).
- Guerrero, E., Aburto, P., Torr s, E., Villegas, O., González, E., Zayas, T., Hernández, F., Torres, E. (2013). Improvement of catalytic efficiency of chloroperoxidase by its covalent immobilization on SBA-15 for azo dye oxidation. *J. Porous Mat.*, 20(2), 387-396.
- Chemical Trading Guide Guidechem. (2014). Sirius supra blue fgl-CF stain (CAS No. 6527-70-4). Recuperado de:
<http://www.guidechem.com/dictionary/6527-70-4.html>.
- Hansa, A., Pillay, V.L., Buckley, C.A. (1999). Analysis of reactive dyes using High Performance Capillary Electrophoresis. *Wat. Sci. Tech.*, 39 (10-11), 169-172.
- Haschke, R.H. and Friedhoff, J.M. (1978). Calcium-related properties of horseradish peroxidase. *Bioquem. Res. Commu.*, 80(4),1039-1042.
- Hesse,M., Meier, H. and Zeeh, B. (1999). M todos Espectrosc picos en Química Org nica, 2^{da} Ed., SINTESIS, España. ISBN 9788477385226
- Horton, H.R., Moran, L.A., Scrimgeour, K. G., Perry, M. D., Rawn, J. D., Gonzalez y Pozo, V., Bucio O. L., Souza, A. V., G mez Q. L. E. (2008). Principios de bioquímica.4^a ed. México, Pearson Educación. ISBN: 9702610257.
- Huang, Q., Selig, H., Weber, W. J. (2002). Peroxidase-catalyzed oxidative coupling of phenols in the presence of geosorbents: rates of non-extractable product formation. *Environ. Sci. Technol.*, 36, 596-602.
- Husain, Q. (2010). Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 9(2), 117-140.
- Juárez, N. H. (2004). All ... donde viven los más pobres. Cadenas globales. Regiones productoras. La industria maquiladora del vestido. Ed. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla -Universidad Obrera de México- Universidad de Guadalajara- Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. 279.
- Keilin, D. and Hartree, E. F. (1989). Horseradish peroxidase. *J. Biochem.*, 103, 639-699.

- Kennedy, K., Alemany, K., Warith, M. (2002). Optimization of soybean peroxidase treatment of 2,4-dichlorophenol. *Water SA*, 28 (2), 149-158. ISSN 0378-4738.
- Krijgsheld, K.R. and van der Gen, A. (1986). Assesment of impact of the emission of certain organochlorine compounds on the aquatic environment. Part 1: Monochlorophenols and 2, 4-Dichlorophenol. *Chemosphere*, 15(1), 825-860.
- Lahaniatis, E. S., Bergheim, W., Kotzias, D. and Pilidis G. (1994). Formation of chlorinated hydrocarbons by water chlorination. *Chemosphere*, 28(2), 229-235.
- Liers, C., Pecyna, M. J., Kellner, H., Worrich, A., Zorn, H. Steffen, K. T., Hofrichter, M. and Ulrich, R. (2013). Substrate oxidation by dye-decolorizing peroxidases (DyPs) from wood- and litter-degrading agaricomycetes compared to other fungal and plant heme-peroxidases. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 97(13), 5839-49.
- Ling, A., Lund, L. (1978). Determining Kinetic Parameter for Thermal Inactivation of Hear-resistant and Hear-labile isoenzymes from Thermal destruction curves. *Journal of Food Science*, 43(4). 1307-1310.
- López, M. V. (1986). Inmovilización de enzimas. *Mensaje Bioquímico*. Vol. VI. México, 317-321.
- López-Díaz, C. (2005). Oxidación del tinte azo Orange II mediante MnP en reactores enzimáticos operados en continuo. (Tesis Doctorado) UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA Departamento de Ingeniería Química.
- Marilize, L.R-H, Khan, N., Gail,B.S. (2011). Actinobacterial peroxidases: an unexplored resource for biocatalysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(5), 681-713.
- Mathews, C.K., Holde, K.E. y Ahrn, K.G. (2000). *Biochemistry*. 3a. Ed. Addison Wesley Longman, Inc, USA, ISBN 361-364, 375-383.
- Matías, O.A.I. (2012). Diagnóstico de las descargas de agua residual de la industria textil en el municipio de Puebla mediante la técnica - ERFCA-modificada. Tesis de Licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ingeniería Química.
- McEldoon, J.P., Pokora, A.R., Dordick, J.S. (1995). Lignin peroxidase-type activity of soybean peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(4), 359-365.

- McLafferty, F. and Turecek, F. (1993). Interpretation of mass spectra. Fourth edition. University Science Book, Mill Valley, California.
- Méndez, H. D. (2000). Determinación de los parámetros cromatográficos para la obtención y purificación parcial de peroxidases de chayote. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Michałowicz, J., Duda, W. (2007). Phenols – Sources and Toxicity. Polish J. of Environ. Stud., 16(3), 347-362.
- Mohana, S., Shrivastava, S., Divecha, J. and 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(3), 562-569.
- Morais, L.C., Freitas, O.M., Goncalves, E.P., Vasconcelos, L.T. y González, B.C.G. (1999). Reactive dyes removal from wastewaters by adsorption on eucalyptus bark: Variables that define the process. Water Research, 33(4), 979-988.
- Morales-Blancas, E.F, Chandia, V.E, Cisneros-Zevallos, L. (2002). Thermal Inactivation Kinetics of Peroxidase and Lipoxygenase of Broccoli, Green Aspartacus and Carrots. Journal of Food Science, 67(1), 146-154.
- Nayak, P.L. (1998). Enzyme-catalyzed polymerization: an opportunity for innovation. Des Monomers Polym., (3)1,259-284.
- Newstrom, L. E. (1991). Evidence for the origin of chayote *Sechium edule* (cucurbitaceae). Economic Botany, 45(3), 410-428.
- Novact Corporation. (2014). Allied direct black vsf 1200%. Recuperado de <http://www.novact.info/id53.html>.
- Ortiz de Montellano, P.R. (2010). Catalytic Mechanisms of Heme Peroxidases. In Biocatalysis Based on Heme Peroxidases. Torres, E., Ayala, M. Springer, Berlin Heidelberg, 79-107. ISBN 978-3-642-12626-0.
- Qayyum, H., Maroof, H., Yasha, K. (2009). Remediation and treatment of organopollutants mediated by peroxidases: review Crit. Rev. Biotechnol., 29,94-119.
- Palma R.C.M. y Morales S.E. (2011). Derecho al 2013 agua. Retos y Perspectivas. Acceso a la justicia en la contaminación de ríos de México. El Salto Jalisco y el Atoyac Puebla. Ed. INDESOL. México.

- Pina, D. G., Shnyrova, A. V., Gavilanes, F., Rodríguez, A., Leal, F., Roig, M. G., Sakharov, I. Y., Zhadan, G. G., Villar, E. and Shnyrov, V. L. (2001). Thermally induced conformational changes in horseradish peroxidase. *Eur. J. Biochem.*, 268(1),120-126.
- Pruden, B. B. and Le., H. (1976). Wet air oxidation of soluble components in waste water. *Can J. Chem. Eng.*, 54(4), 319-325.
- Quantyka Fine Chemicals (2014). 1-Naftol, 99% PS. Recuperado de: <http://www.quantyka.com.mx/catalogo/HDSM/N/162855.htm>
- Rasmussen, B. C., Henriksen, A., Abelskov, A. K., Jensen, R. B., Rasmussen, S. K., Hejgaard, J. and Welinder, K. G. (1997). Purification, characterization and stability of barley grain peroxidase BP1, a new type of plant peroxidase. *Physiol. Plant.*, 100(1),102-110.
- Regalado, C., García-Almendárez, B.E., Duarte-Vázquez, M.A. (2004). Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochem.*, 3(1-2):243-256.
- Reihmann, M. and Ritter, H. (2005). Syntesis of Phenol Polymers Using Peroxidases., *Adv Polym Sci.*,194, 1-49.
- Reihmann, M.H. and Ritter, H. (2001). Oxidative Copolymerisation of para-functionalized phenols catalyzed by Horseradish peroxidase and Thermocrosslinking via Diels-Alder and (1, 3) Cycloaddition. *Macromol Biosci.*, 1:85–90.
- Rittmann, B.E. and McCarty, P.L. (2001). *Biotechnología del Medio Ambiente*. McGraw-Hill.
- Riu, J., Schönsee, I., Barceló, D.and Ráfols, C. (1997). Determination of sulphonated azo dyes in water and wastewater. *Trends in Analytical Chemistry*, 16(1), 405-419.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. and Nigam, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresour Technol.*, 77(3), 247–255.
- Rodakiewicz-Nowak, J. (2000). Phenols oxidizing enzymes in water-restricted media. *Topics in Catalysis*, 11-12(1-4),419-434.

- Rodríguez-López, J. N., López-Molina D., Tudela-Serrano, J.B y García Cánovas, F. (2002). Enzima con actividad peroxidasa aislada de alcachofa (*Cynara scolymus* L.). procedimiento para su aislamiento y purificación y aplicaciones. Patente 2167278. España
- Rodríguez-Tapia, L., Morales, J. (2011). Contaminación e internalización de costos en la industria textil. Revista Internacional de Ciencias Sociales y Humanidades. Revista Internacional de Ciencias Sociales y Humanidades, SOCIOTAM, XXI(1), 143-169.
- Sakharov, I. Yu., Vesga Blanco, M. K. and Sakharova, I. V. (2002). Substrate Specificity of African Oil Palm Tree Peroxidase. Biochemistry (Moscow), 67(9),1043-1047.
- Saldaña, F.P. (2006). Caracterización de fuentes puntuales de contaminación en el río Atoyac, Mexico, Memorias del XXX Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Punta del Este-Uruguay,1-7.
- Sánchez-López, M.I., Guerra, G., Hechevarria, Y., Domínguez, O., Manzano, A. M., Torres, G., Arguelles, J. y Ramos-Leal, M. (2010). Estabilidad y actividad enzimática del crudo enzimático del cultivo de *Trametes maxima*, decoloración in vitro de colorantes sintéticos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. Centro Nacional de Investigaciones Científicas de Cuba, (41), 1-13. ISSN (Versión impresa): 0253-5688
- Sandhya, S. (2010). Biodegradation of Azo Dyes Under Anaerobic Condition: Role of Azoreductase. In Biodegradation of Azo Dyes. The Handbook of Environmental Chemistry, 9, 39-57.
- Sawhata T. and Neal. R. A. (1982). Horseradish peroxidase-mediated oxidation of phenol. Biochemical and Biophysical Research Communications, 109(3), 988-994.
- Segel, I.H. (1975). Enzyme Kinetics. Edit. Jhon Wyley and Sons.
- Shin, K-S. y Kim, Ch-J. (1998). Decolorisation of artificial dyes by peroxidase from the white-rot fungus, *Pleurotus ostreatus*. Biotechnology Letters, 20(6), 569–572.
- Shin, K., Oh, I. and Kim, C. (1997). Production and purification of Remazol brilliant blue R decolorizing peroxidase from the culture filtrate of *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology, 63(5), 1744–1748.

- Shin, K-S., Kim, Y. H. and Lim, J-S. (2005). Purification and characterization of manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*. *The Journal of Microbiology*, 43(6),503-509.
- Skoog, D, A., Holler F. J. and Nieman, T, A. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*. 5^{ta} Ed., McGraw Hill. Madrid, España.
- Smith, M. T., Yager, J. W., Steinmetz, K. L. and Eastmond, D. A. (1989). Peroxidase-Dependent Metabolism of Benzene's Phenolic Metabolites and Its Potential Role in Benzene Toxicity and Carcinogenicity. *Environmental Health Perspectives*, 82,23-29.
- Spadaro, J. T. and Renganathan, V. (1994). Peroxidase-catalyzed oxidation of azo dyes: mechanism of Disperse Yellow 3 degradation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 312(1), 301-307.
- Stolz, A. (2001). Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56(1-2), 69–80.
- Sugano, Y. (2009). DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. *Cell. Mol. Life Sci.*, 66(8),1387-403.
- Sugano, Y., Matsushima, Y., Tsuchiya, K., Aoki, H., Hirai, M., Shoda M. (2009). Degradation pathway of an anthraquinone dye catalyzed by a unique peroxidase DyP from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1. *Biodegradation*, 20(3), 433–440.
- Suzuki, T., Honda, Y., Mukasa, Y.,& Kim, S. (2006) Characterization of peroxidase in buckwheat seed. *Phytochem.*, 67; 219-224
- Takahashi, H. y Hashimoto, Y. (2001). Formaldehyde-mediated modification of deoxyguanosine with amines: one-pot cyclization as a molecular model for genotoxicity. *Bioorg Med Chem Lett.*, 11(5), 729–731.
- Tezcanli-Guyer, G. and Ince, N.H. (2003). Degradation and toxicity reduction of textile dyestuff by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 10(4-5), 235–240.
- Torres E., Bustos-Jaimes I., Le Borgne S. (2003) Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental*, 46(1), 1-15.

- Torres, E. and Ayala, M. (2013). Biocatalysis by Metalloenzymes. In Comprehensive Inorganic Chemistry II (Second Edition); R. Editors-in-Chief: Jan and P. Kenneth Ed.; Elsevier: Amsterdam, Chapter 6.24, 685-735.
- Torres-Duarte, C., Vazquez-Duhalt (2010). Applications and Prospective of Peroxidase Biocatalysis in the Environmental Field. E. Torres and M. Ayala (eds.) In Biocatalysis Based on Heme Peroxidases. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 179-206.
- Uyama H. Kurioka H, Kaneko I, Kobayashi S. (1994). Synthesis of a new family of Phenol resin by enzymatic oxidative polymerization. *Chemistry Letters*, 23(3), 423-426.
- Van Deurzen, M.P.J., van Rantwijk, F. and Sheldon, R.A. (1997). Selective oxidations catalyzed by peroxidases. *Tetrahedron*, 53(39), 13183-13220.
- Vazquez-Duhalt, R., Marquez-Rocha, F. J., Ponce, E., Navarro, L. and Viana, M. T. (2005). Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. *Applied Ecology and Environmental Research*,. 4(1),1-25.
- Vazquez-Duhalt, R., Torres, E., Valderrama, B., Le Borgne, S. (2002). Will Biochemical Catalysis Impact the Petroleum Refining Industry? *Energy & Fuels*, 16(5), 1239-1250.
- Venkata Rao, B. y Sastry, C. A. (1987). Removal of dyes from water and wastewater by adsorption. *Indian J. Environmental protection*, Vol. 7, N° 5, 363-373.
- Verstraete, W. (2002). Environmental biotechnology for sustainability. *J. Biotechnol.*, 94(1), 93-100.
- Vicerrectorado de investigación-Universidad de Sevilla. (2014). *Resonancia magnética nuclear*. Recuperado de <https://investigacion.us.es/scisi/sgi/servicios/mn>
- Viihari, L. (2000). Enzymes in the pulp and paper industry. TAPPI pulping process and product. Quality conference. [CD-ROOM].
- Villegas, Rosas., M. L. O., Geissler, G., Handal, Silva, A. and González, Vergara, E. (2003). Inmovilización de una peroxidasa de chayote (*Sechium edule (Jacq) Sw.*) y su potencial aplicación en la remoción de sustancias fenólicas en aguas contaminadas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 19(2), 73-81.
- Violante-Mota F., Tellechea, E., Moran, J. F., Sarath G., Arredondo-Peter, R. (2010). Analysis of peroxidase activity of rice (*Oryza sativa*) recombinant

- hemoglobin1: Implications for in vivo function of hexacoordinate non-symbiotic hemoglobins in plants. *Phytochemistry*, 71, 21–26.
- Vozari-Hampe, M.M., Viegas, C., Saucedo, C., Rosseto, S., Manica, G. and Hampe, O.G. (1992). A lectin from *Sechium edule* exúdate. *Phytochemistry*, 31(5), 1447-1480.
- Wagner, M. and Nicell, J. A. (2001). Peroxidase-catalyzed removal of phenols from a petroleum refinery wastewater. *Water Sci. Technol.*, 32(2), 253-260.
- Wagner, M. and Nicell, J. A. (2002) Detoxification oh phenolic solutions with hoseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Waster Research* 36(16), 4041-4052.
- Weiburger, S. H. (2002). Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. *Mutat Res.*, 9(20), 506-507.
- Wittcoff, H and Reuben, B. (1985). *Productos químicos orgánicos industriales*. Limusa. 434-440.
- Xiloteo, C.M. Exportaciones hacia EU, Canadá y con miras en el mercado europeo. México: Comienza la nueva temporada de chayote y malanga de APAV. (2011). La Asociación de Productores Agrícolas de Veracruz de México (APAV). Recuperado de:
<http://www.freshplaza.es/article/56373/M%C3%A9xico-Comienza-la-nueva-temporada-de-chayote-y-malanga-de-APAV>).
- Zámocký, M and Obinger, C (2010). Molecular Phylogeny of Heme Peroxidases. In *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*. Eds.Torres, E. and Ayala, M. Springer, Berlin Heidelberg. Chapter 22, 7-35.
- Zamorano, L.S., Barrera Vilarmau, S., Arellano, J. B., Zhadan, G. G., Hidalgo C. N., Bursakov, S. A., Roig, M. G. and Shnyrov, V. L. (2009). Termal stability of peroxidase from *Chamaerops excelsa* palm tree at pH 3.0. *Inter. J. Biol.Macromol.*, 44(4), 335-341.
- Zhang, G. and Nicell, J. A. (2000). Treatment of aqueous pentachlorophenol by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Research*, 34(5), 1629-1637.

Zimmermann, T., Kulla, H. G. and Leisinger, T. (1982). Properties of purified Orange II azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *Pseudomonas* KF46. *European Journal of Biochemistry*, 129(1), 197-203.

ANEXO A
Gráficas primarias

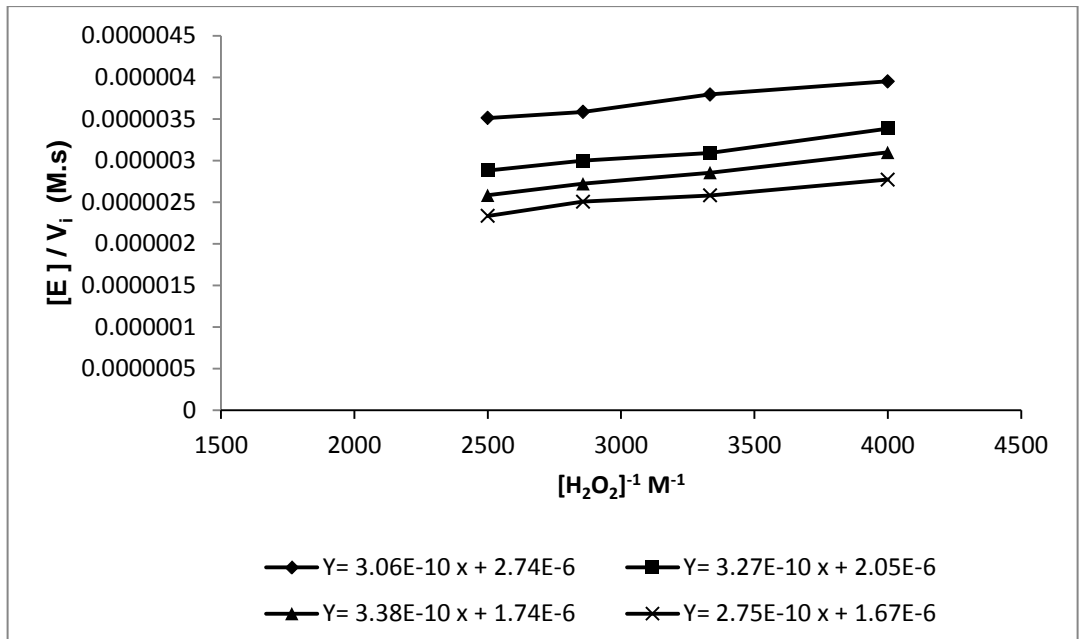


Figura 36 Gráficas primarias del CPOCh.

ANEXO B

Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con fenol a distintas concentraciones

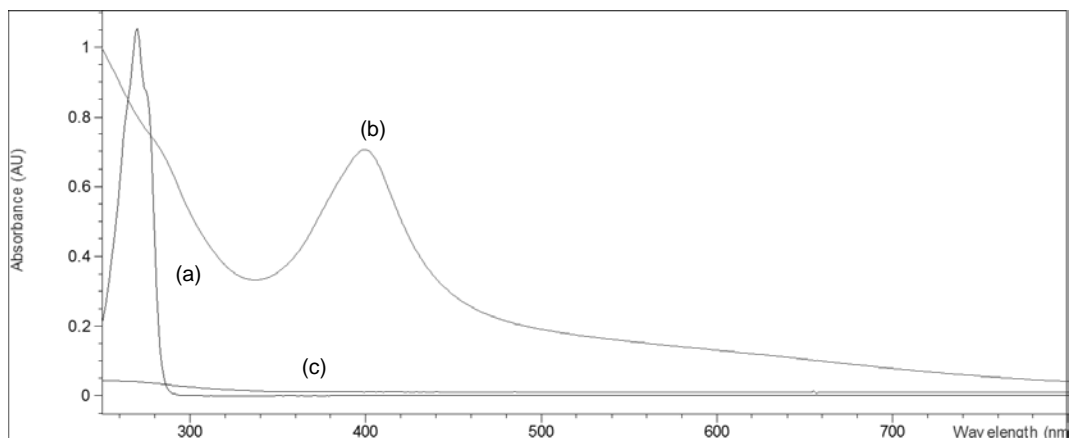


Figura 37. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada a 500 ppm con fenol para su tratamiento. (a) Agua sin tratar (dilución 1:4). (b) Agua con la máxima formación de productos (dilución 1:15). (c) Agua después de tratada, en reposo durante 24 h y centrifugada.

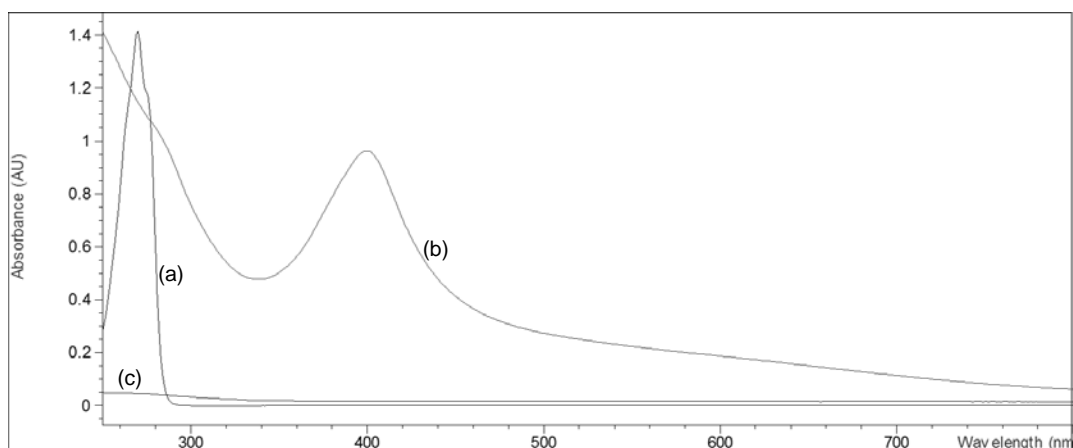


Figura 38. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada a 600 ppm con fenol para su tratamiento. (a) Agua sin tratar (dilución 1:4). (b) Agua con la máxima formación de productos (diluida 1:15). (c) Agua después de tratada, en reposo durante 24 h y centrifugada.

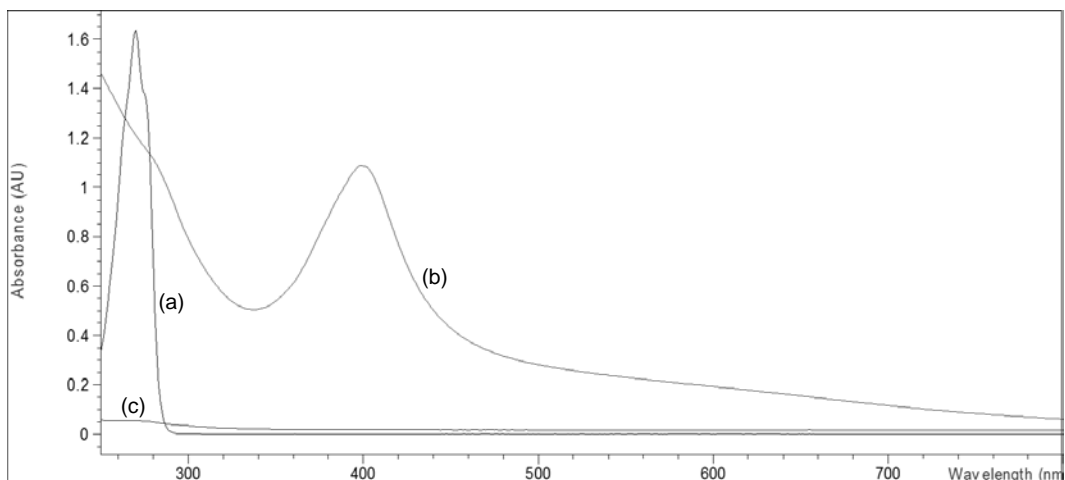


Figura 39 Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada a 700 ppm con fenol para su tratamiento. (a) Agua sin tratar (dilución 1:4). (b) Agua con la máxima formación de productos (diluida 1:15). (c) Agua después de tratada, en reposo durante 24 h

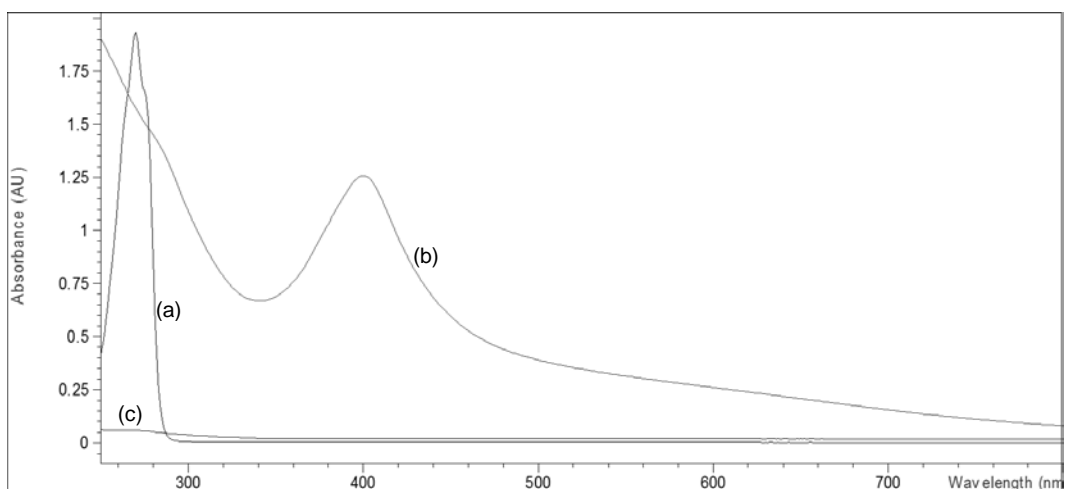


Figura 40. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada a 800 ppm con fenol para su tratamiento. (a) Agua sin tratar (dilución 1:4). (b) Agua con la máxima formación de productos (diluida 1:15). (c) Agua después de tratada, en reposo durante 24 h y centrifugada.

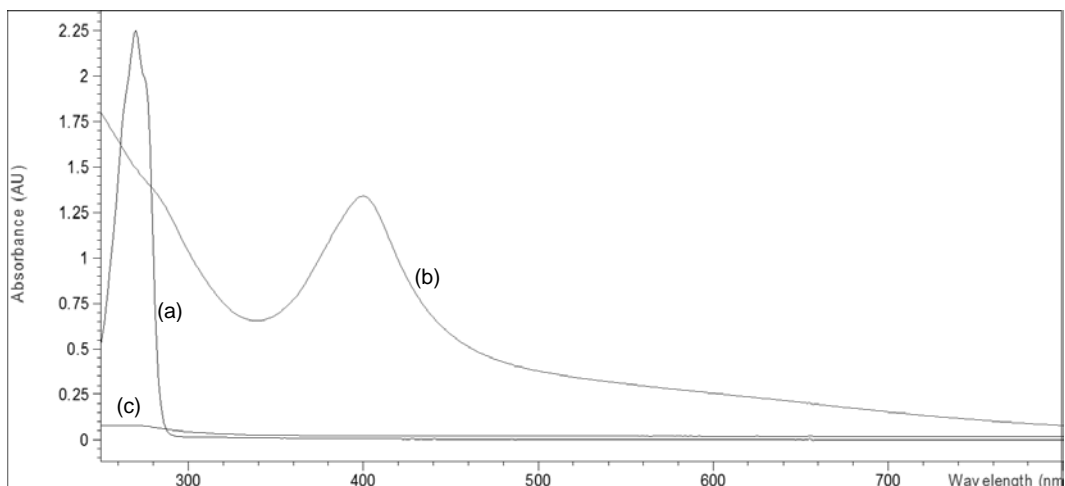


Figura 41. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada a 900 ppm con fenol para su tratamiento. (a) Agua sin tratar (dilución 1:4). (b) Agua con la máxima formación de productos (diluida 1:15). (c) Agua después de tratada, en reposo durante 24 h

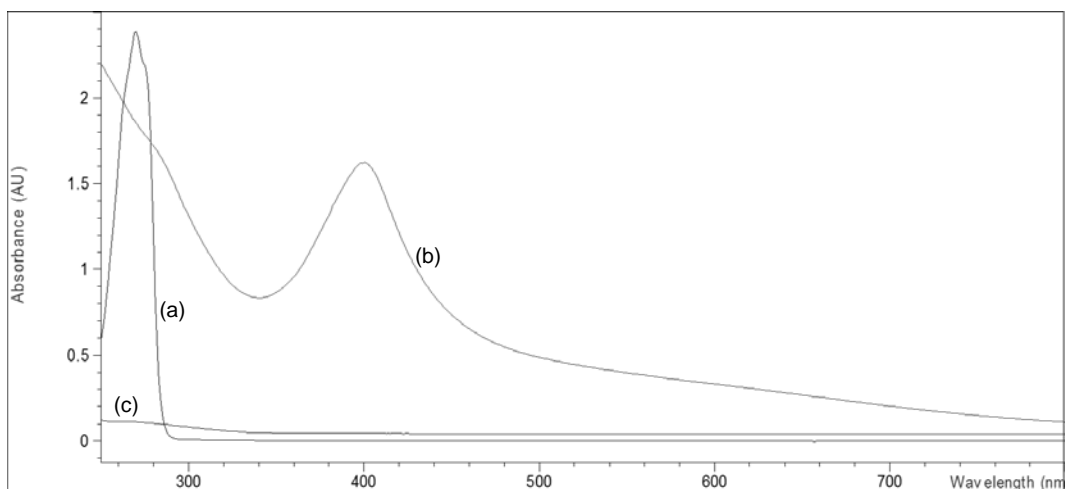


Figura 42. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada a 1000 ppm con fenol para su tratamiento. (a) Agua sin tratar (dilución 1:4). (b) Agua con la máxima formación de productos (dilución 1:15). (c) Agua después de tratada, en reposo durante 24 h.

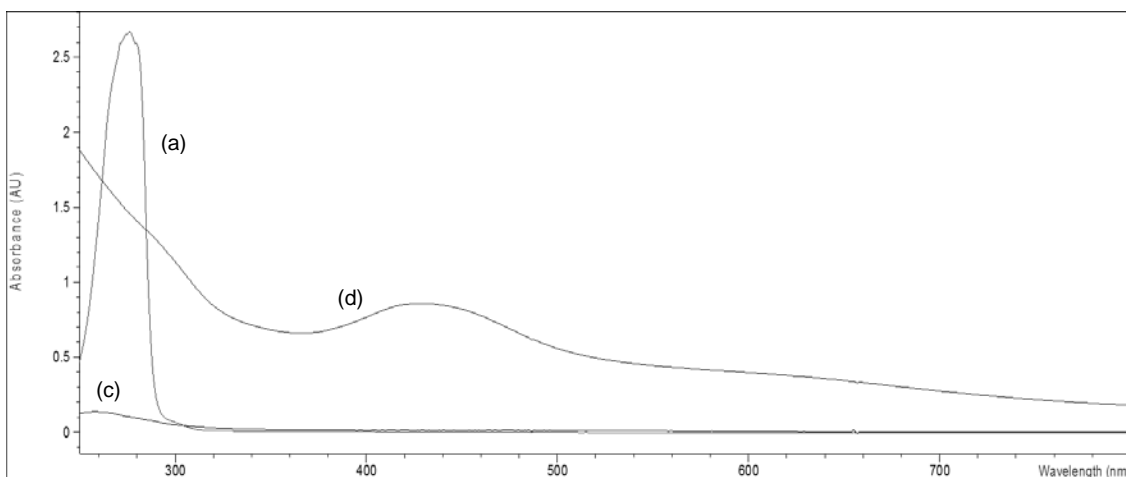


Figura 43. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada a 1000 ppm de 2-clorofenol para su tratamiento. (a) Agua sin tratar (dilución 1:4). (b) Agua con la máxima formación de productos (dilución 1:15). (c) Agua después de tratada, en reposo durante 24 h y centrifugada.

ANEXO C

Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con los colorantes estudiados a las diferentes concentraciones

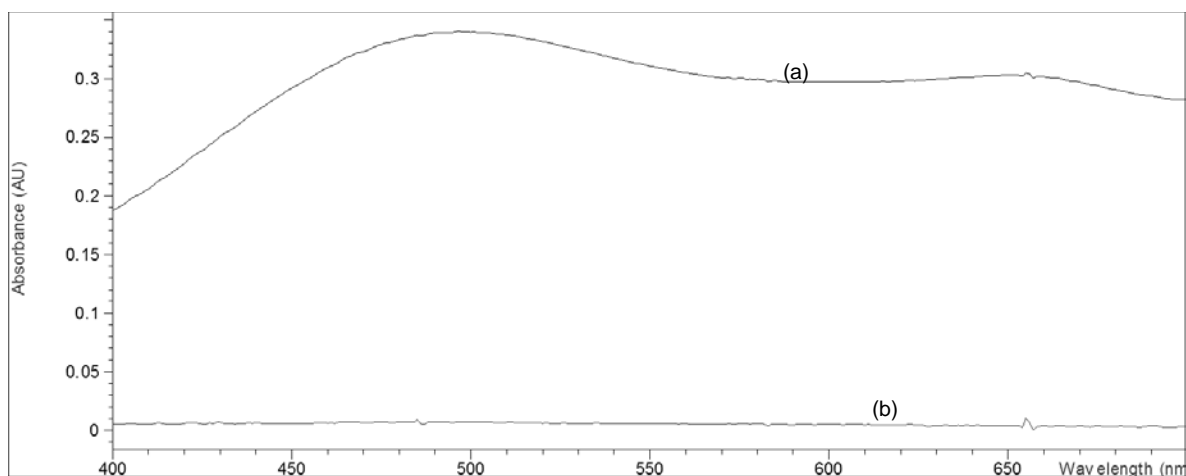


Figura 44. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con el colorante negro directo 22 a 100 ppm: (a) Agua sin tratar y (b) Agua tratada.

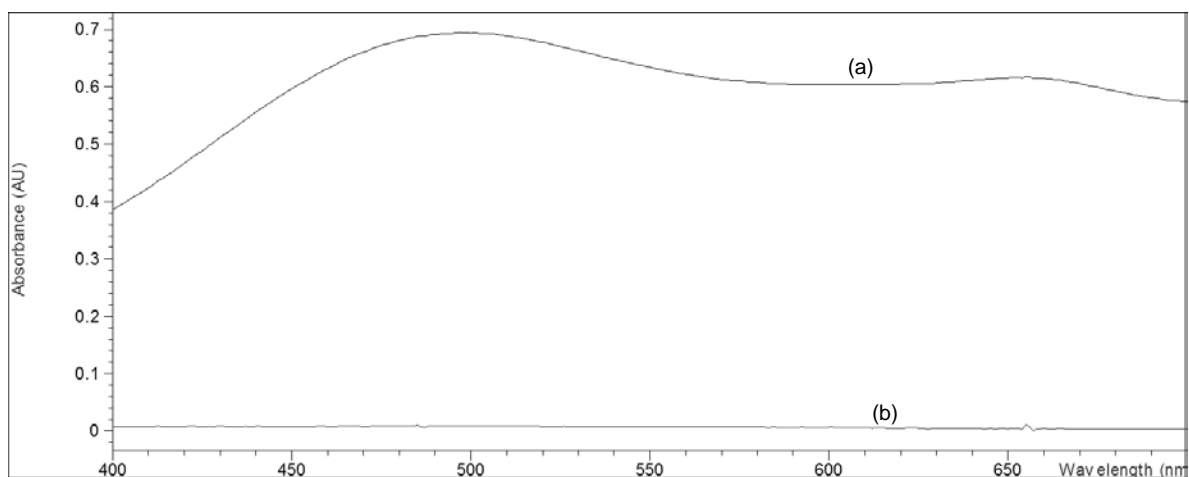


Figura 45. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con el colorante negro directo 22 a 200 ppm: (a) Agua sin tratar y (b) Agua tratada.

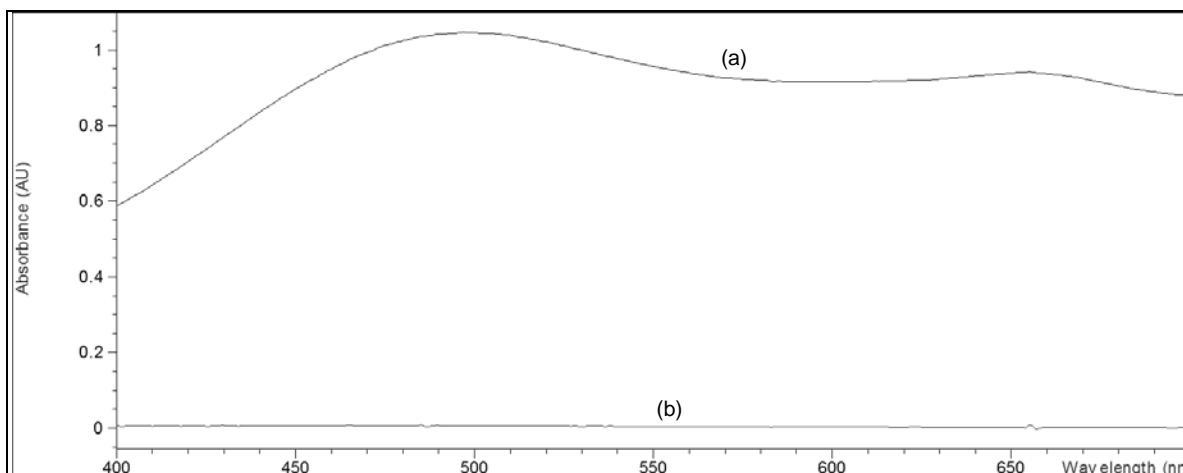


Figura 46. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con el colorante negro directo 22 a 300 ppm: (a) Agua sin tratar y (b) Agua tratada.

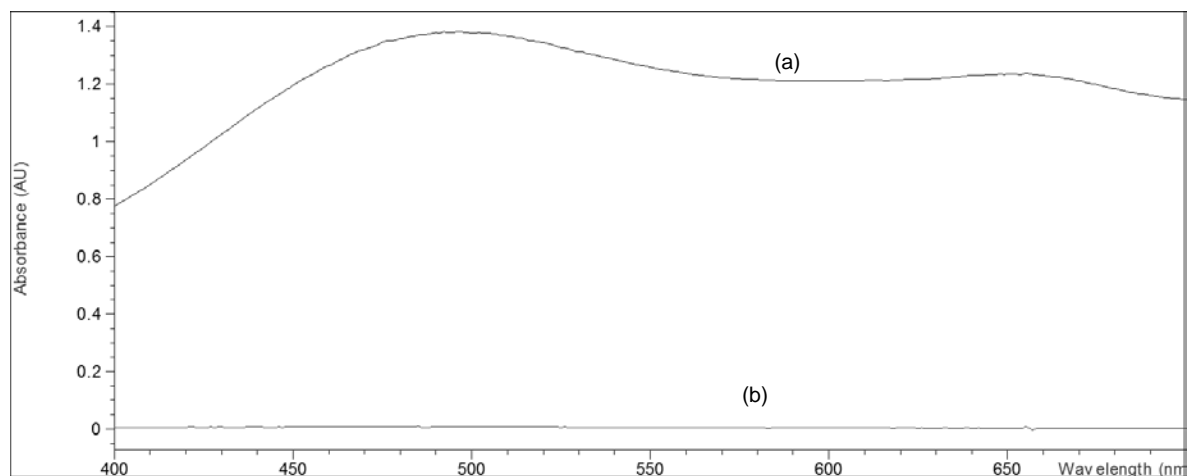


Figura 47. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con el colorante negro directo 22 a 400 ppm: (a) Agua sin tratar y (b) Agua tratada.

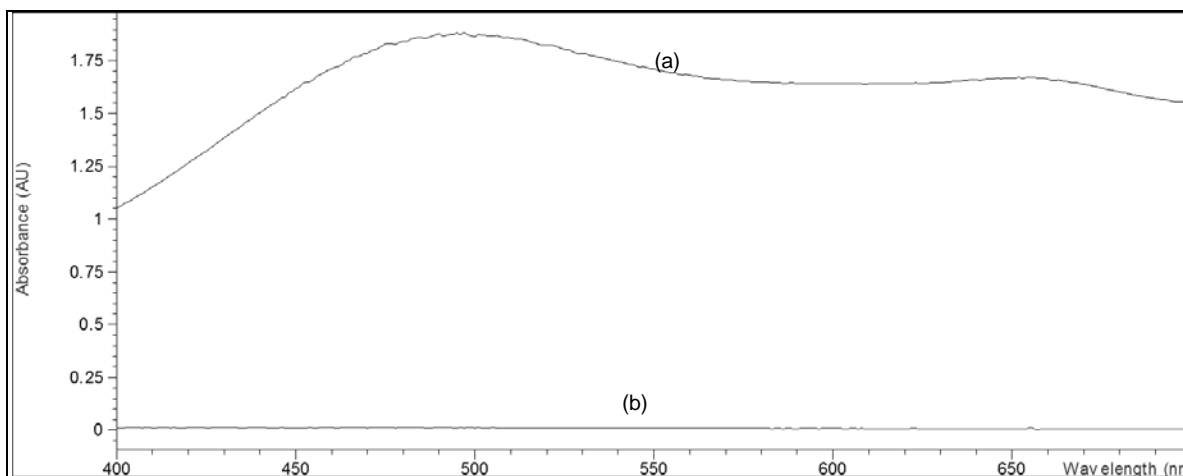


Figura 48. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con el colorante negro directo 22 a 500 ppm: (a) Agua sin tratar y (b) Agua tratada.

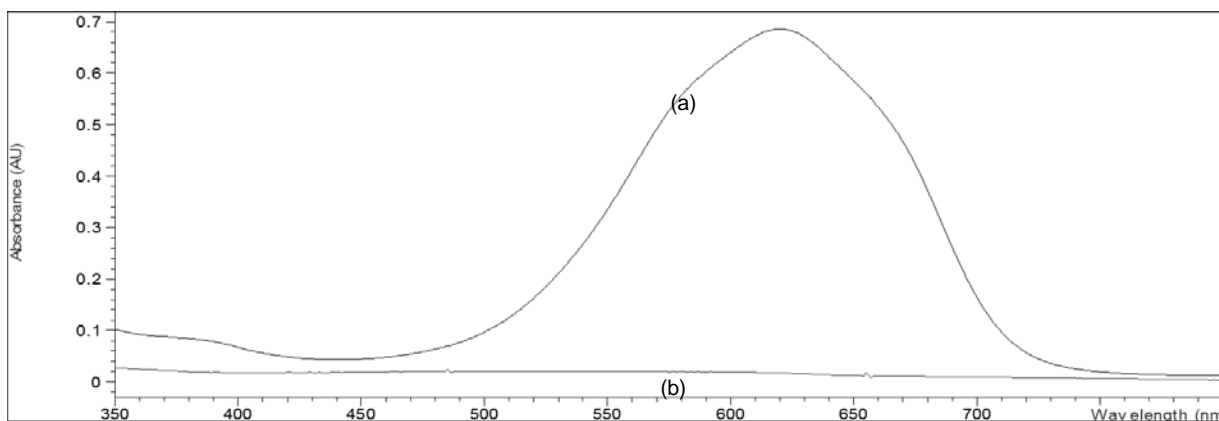


Figura 49. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con el colorante azul solofenil BF a 50 ppm: (a) Agua sin tratar y (b) Agua tratada.

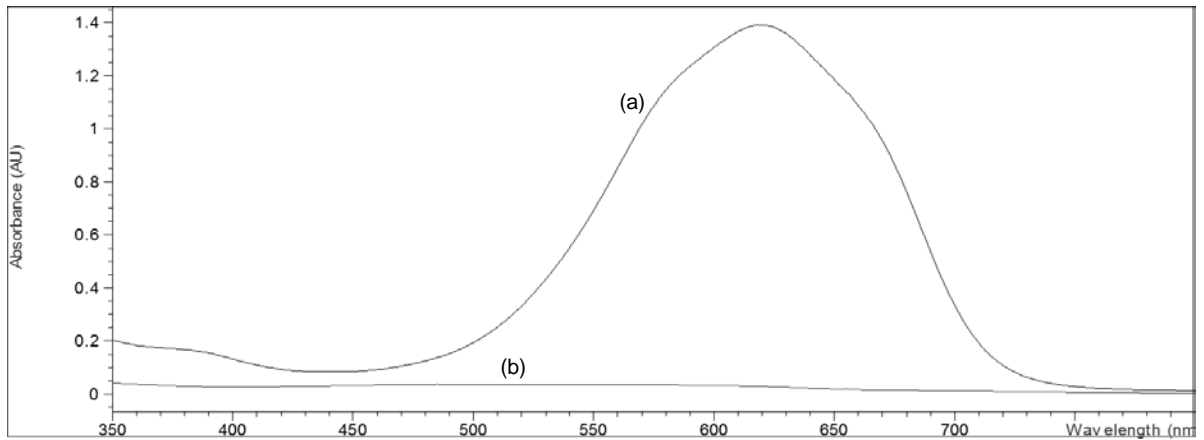


Figura 50. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con el colorante azul solofenil BF a 100 ppm: (a) Agua sin tratar y (b) Agua tratada.

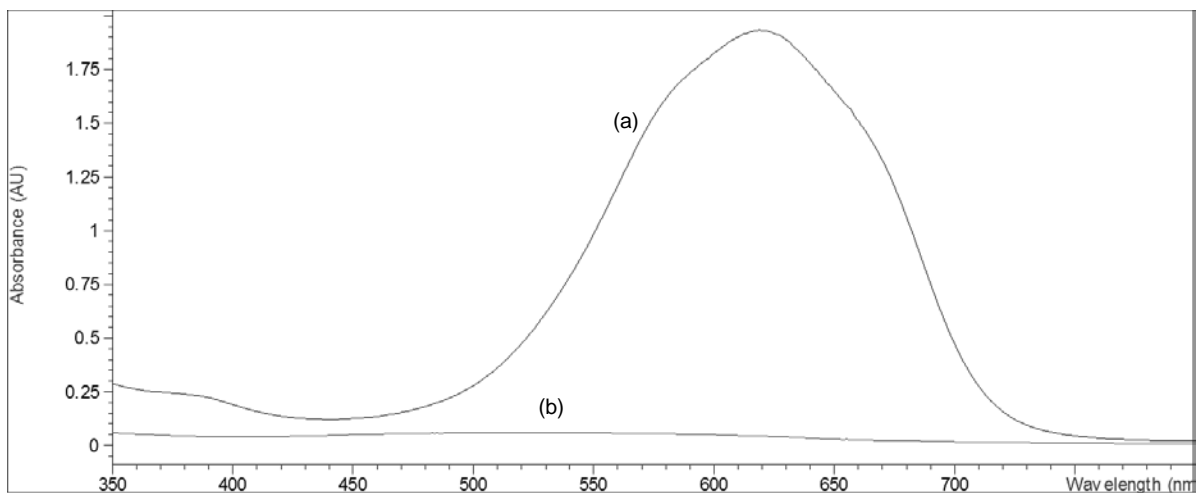


Figura 51. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con el colorante azul solofenil BF a 150 ppm: (a) Agua sin tratar y (b) Agua tratada.

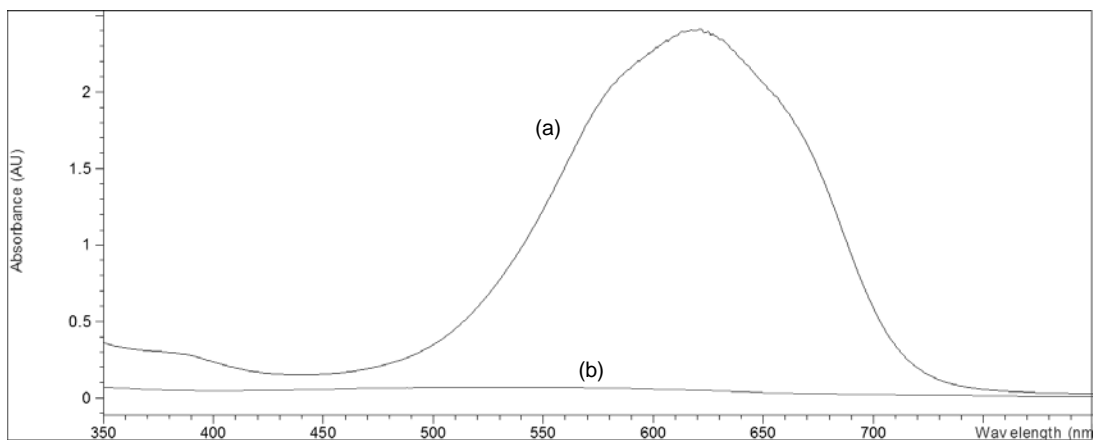


Figura 52 Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con el colorante azul solofenil BF a 200 ppm: (a) Agua sin tratar y (b) Agua tratada.

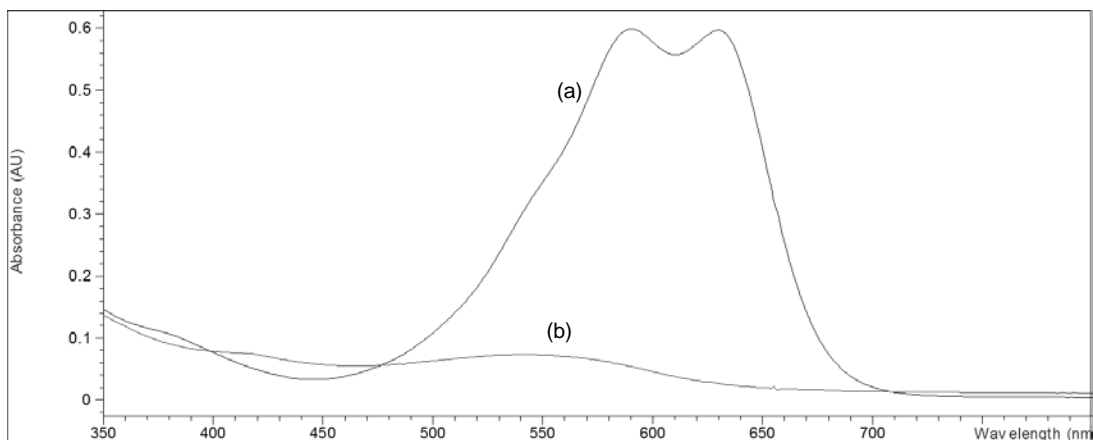


Figura 53. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con el colorante azul erionyl A-R a 50 ppm: (a) Agua sin tratar y (b) Agua tratada.

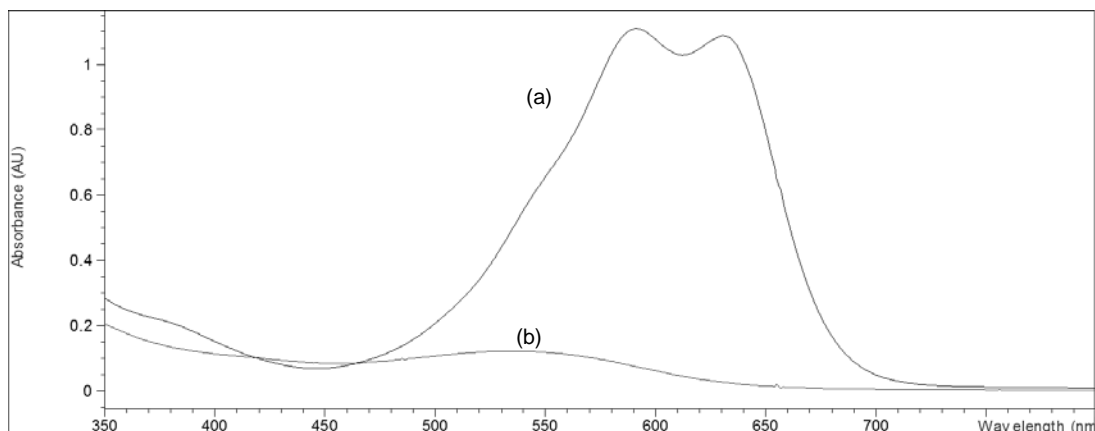


Figura 54. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con el colorante azul erionyl A-R a 100 ppm: (a) Agua sin tratar y (b) Agua tratada.

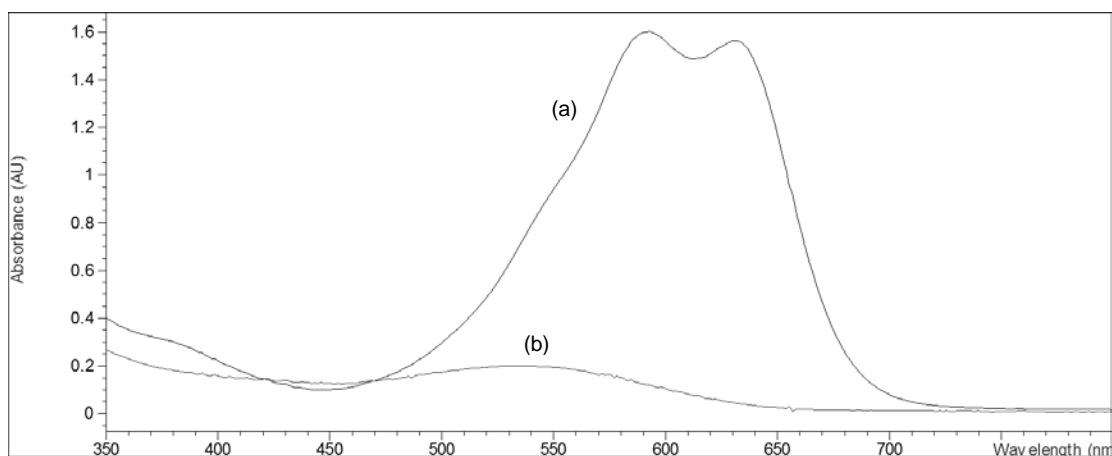


Figura 55. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con el colorante azul erionyl A-R a 150 ppm: (a) Agua sin tratar y (b) Agua tratada.

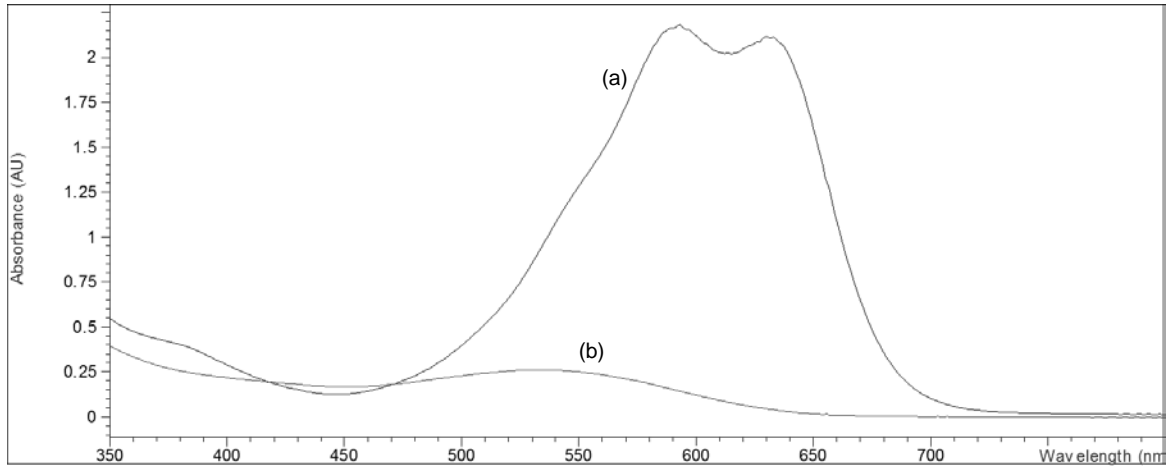


Figura 56. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con el colorante azul erionyl A-R a 200 ppm: (a) Agua sin tratar y (b) Agua tratada.

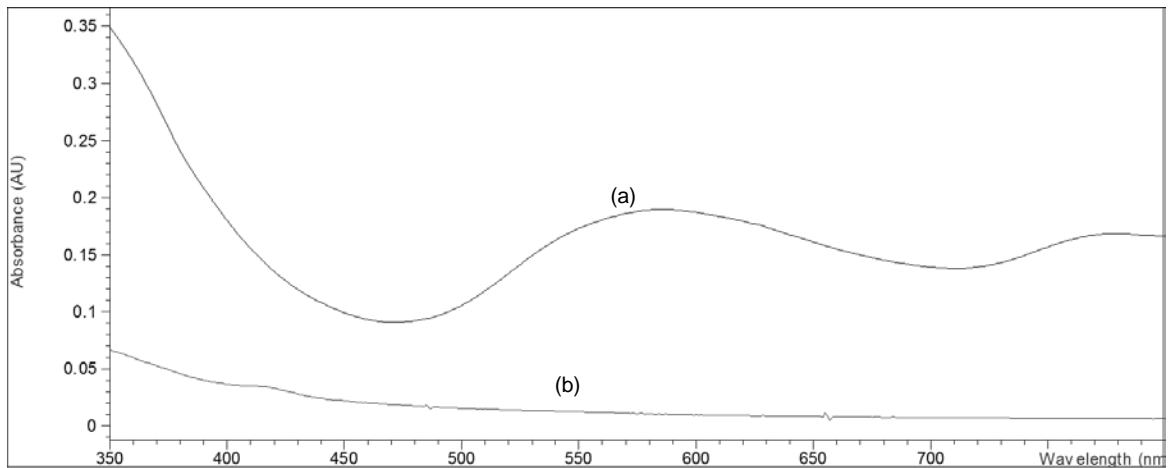


Figura 57. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con el colorante azul cibanon RS-JM a 50 ppm: (a) Agua sin tratar y (b) Agua tratada.

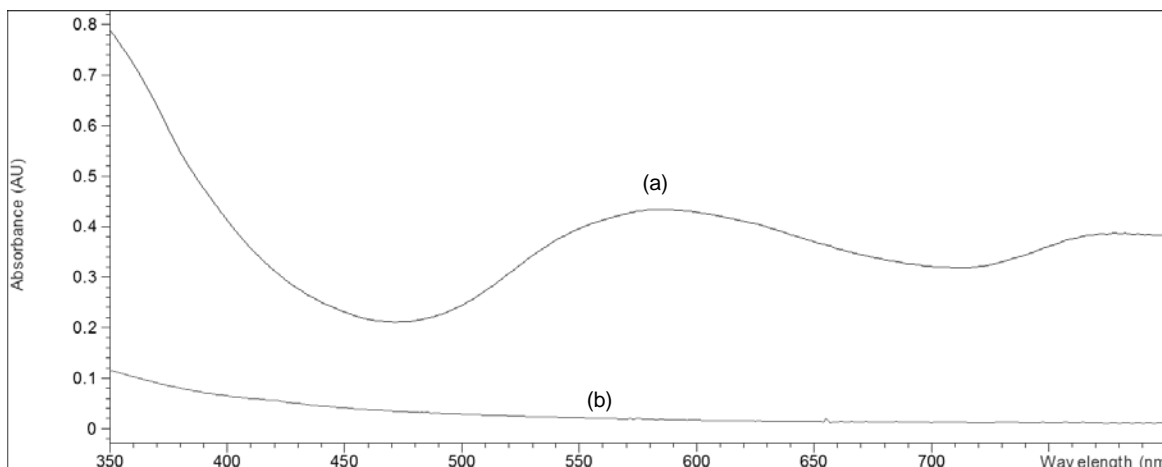


Figura 58. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con el colorante azul cibanon RS-JM a 100 ppm: (a) Agua sin tratar y (b) Agua tratada.

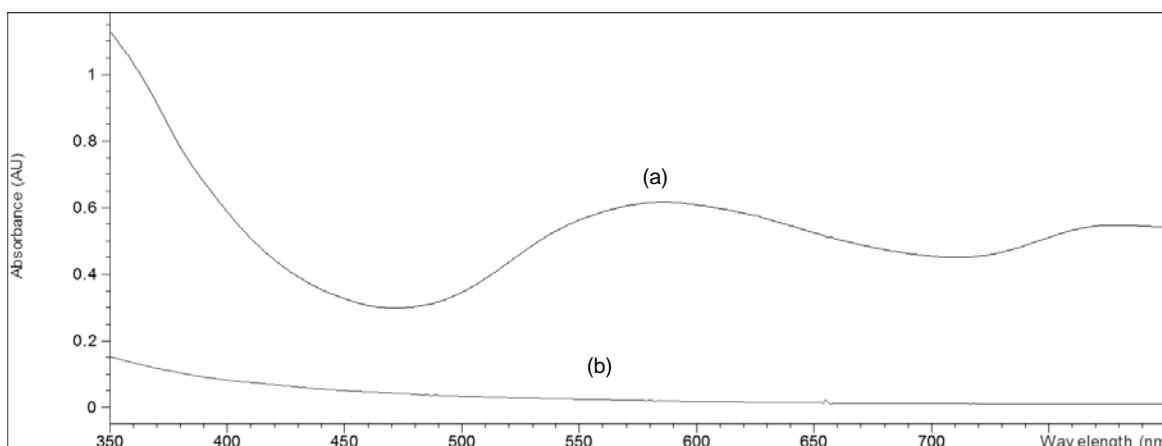


Figura 59. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con el colorante azul cibanon RS-JM a 150 ppm: (a) Agua sin tratar y (b) Agua tratada.

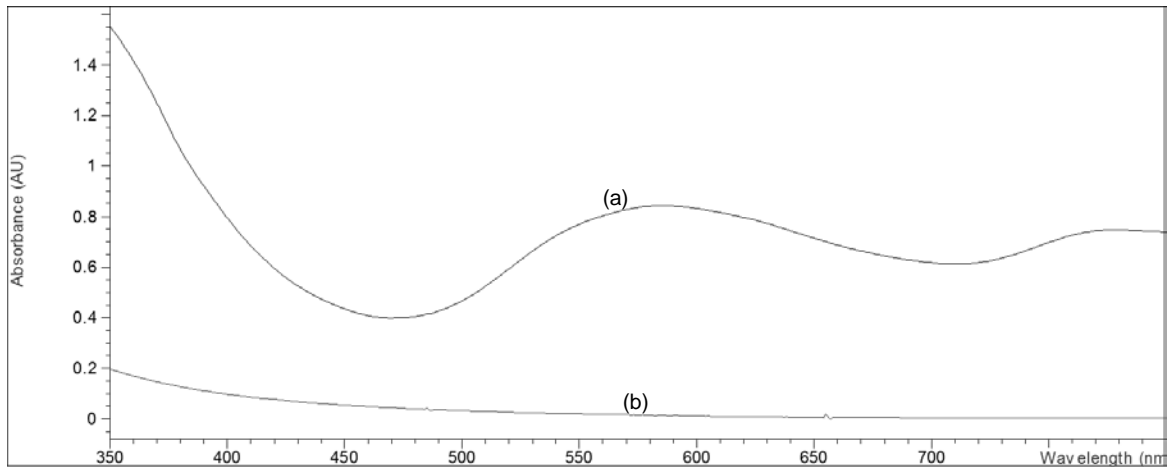


Figura 60. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con el colorante azul cibanon RS-JM a 200 ppm: (a) Agua sin tratar y (b) Agua tratada.

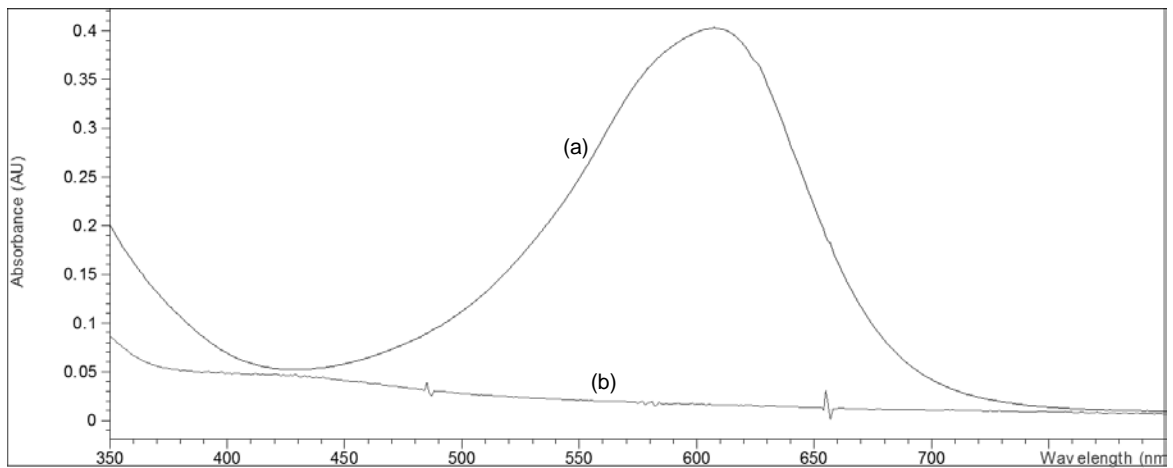


Figura 61. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con el colorante azul cibacron FN-R a 50 ppm: (a) Agua sin tratar y (b) Agua tratada.

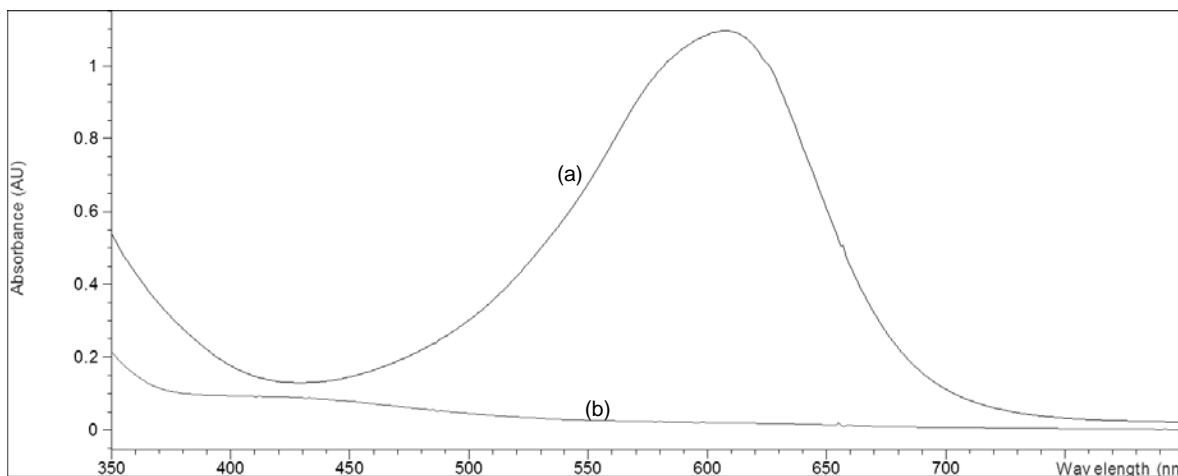


Figura 62. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con el colorante azul cibacron FN-R a 100 ppm: (a) Agua sin tratar y (b) Agua tratada.

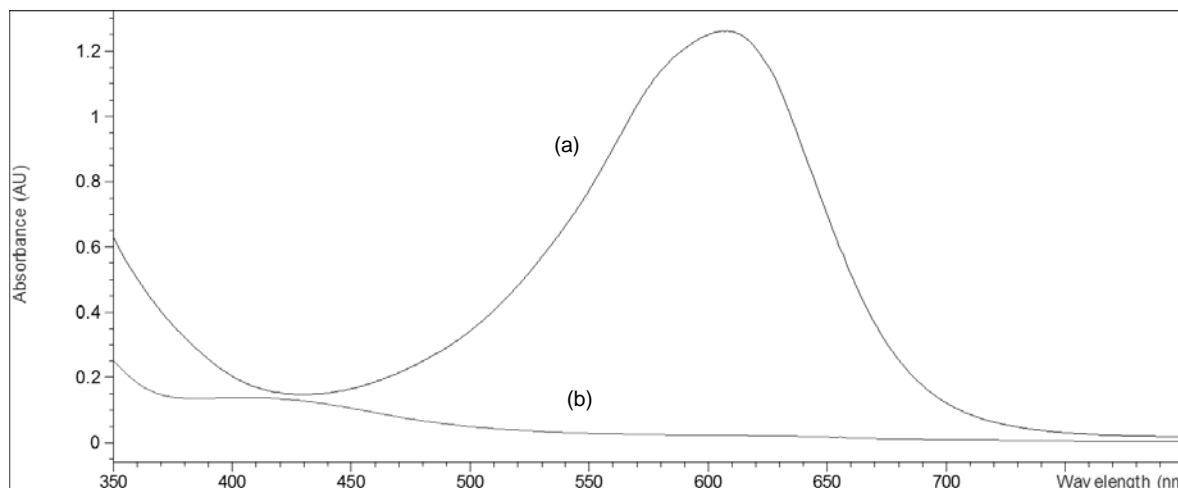


Figura 63. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con el colorante azul cibacron FN-R a 150 ppm: (a) Agua sin tratar y (b) Agua tratada.

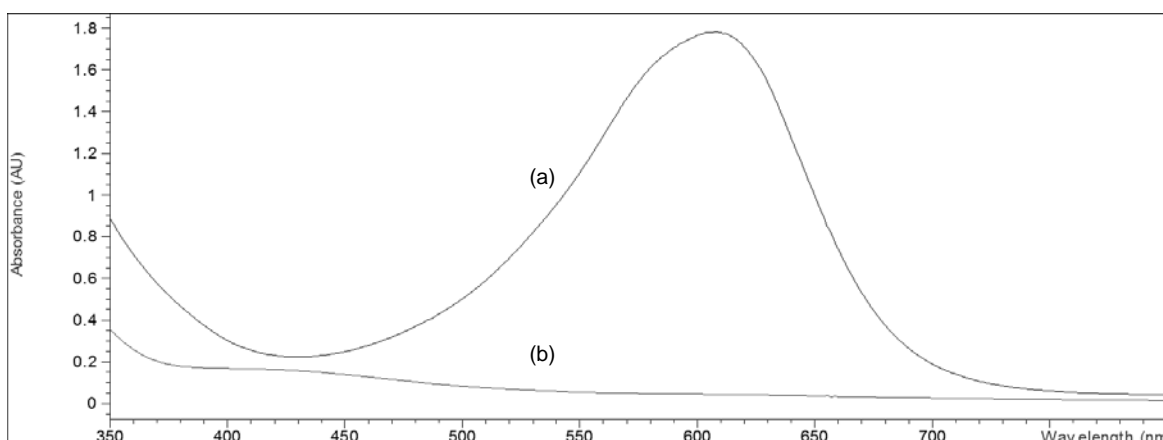


Figura 64. Espectros de absorción UV/vis del agua artificialmente contaminada con el colorante azul cibacron FN-R a 200 ppm: (a) Agua sin tratar y (b) Agua tratada.

Las tablas del 30 al 50 se presentará el resumen de los datos experimentales obtenidos a partir de la espectroscopía UV/vis, para los colorantes utilizados en la preparación de aguas artificialmente contaminadas.

Tabla 30. Valores de absorbancia ($\lambda=490$ nm) del colorante negro directo 22 a 100 ppm.		
No. de repeticion	A_i	A_f
1	0.3410	0.0007
2	0.3501	0.0006
3	0.3425	0.0007
Promedio	0.3445	0.0006
% de remoción	97.9	

Tabla 31. Valores de absorbancia ($\lambda=490$ nm) del colorante negro directo 22 a 200 ppm.

No. de repeticion	A_i	A_f
1	0.7501	0.0007
2	0.7598	0.0006
3	0.7601	0.0007
Promedio	0.7560	0.0007
% de remoción	98.99	

Tabla 32. Valores de absorbancia ($\lambda=490$ nm) del colorante negro directo 22 a 300 ppm.

No. de repeticion	A_i	A_f
1	1.0402	0.006
2	1.0399	0.005
3	1.0401	0.006
Promedio	1.0410	0.006
% de remoción	99.42	

Tabla 33. Valores de absorbancia ($\lambda=490$ nm) del colorante negro directo 22 a 400 ppm.

No. de repeticion	A_i	A_f
1	1.3702	0.010
2	1.3741	0.020
3	1.3699	0.010
Promedio	1.3714	0.010
% de remoción	99.40	

Tabla 34. Valores de absorbancia ($\lambda=490$ nm) del colorante negro directo 22 a 500 ppm.

No. de repeticion	A_i	A_f
1	1.8901	0.010
2	1.8999	0.009
3	1.8908	0.010
Promedio	1.8936	0.011
% de remoción	99.60	

Tabla 35. Valores de absorbancia ($\lambda=620$ nm) del colorante azul solofenil BF a 50 ppm.

No. de repeticion	A_i	A_f
1	0.6625	0.0150
2	0.6885	0.0214
3	0.6885	0.0332
Promedio	0.6798	0.0232
% de remoción	96.6	

Tabla 36. Valores de absorbancia ($\lambda=620$ nm) del colorante azul solofenil BF a 100 ppm.

No. de repeticion	A_i	A_f
1	1.3888	0.028
2	1.3881	0.028
3	1.4888	0.028
Promedio	1.4213	0.028
% de remoción	98.0	

Tabla 37. Valores de absorbancia ($\lambda=620$ nm) del colorante azul solofenil BF a 150 ppm.

No. de repeticion	A_i	A_f
1	2.08	0.0426
2	1.9293	0.0447
3	1.9102	0.0382
Promedio	1.9731	0.0418
% de remoción	97.9	

Tabla 38. Valores de absorbancia ($\lambda=620$ nm) del colorante azul solofenil BF a 200 ppm.

No. de repeticion	A_i	A_f
1	2.4763	0.1002
2	2.390	0.0505
3	2.400	0.0537
Promedio	2.4221	0.0680
% de remoción	97.2	

Tabla 39. Valores de absorbancia ($\lambda=630$ nm) del colorante azul erylil a 50 ppm.

No. de repeticion	A_i	A_f
1	0.6088	0.02169
2	0.5969	0.0264
3	0.6197	0.02621
Promedio	0.6084	0.02476
% de remoción	95.9	

Tabla 40. Valores de absorbancia ($\lambda=630$ nm) del colorante azul erionyl a 100 ppm.		
No. de repeticion	A_i	A_f
1	1.1081	0.0470
2	1.088	0.0345
3	1.0562	0.0267
Promedio	1.077	0.03606
% de remoción	96.6	

Tabla 41. Valores de absorbancia ($\lambda=630$ nm) del colorante azul erionyl a 150 ppm.		
No. de repeticion	A_i	A_f
1	1.562	0.04918
2	1.562	0.04918
3	1.6102	0.05568
Promedio	1.5780	0.5134
% de remoción	96.7	

Tabla 42. Valores de absorbancia ($\lambda=630$ nm) del colorante azul erionyl a 200 ppm.		
No. de repeticion	A_i	A_f
1	2.061	0.0748
2	2.050	0.0645
3	2.1141	0.0451
Promedio	2.0750	0.0614
% de remoción	97.0	

Tabla 43. Valores de absorbancia ($\lambda=585$ nm) del colorante azul cibanon RS-JM a 50 ppm.

No. de repeticion	A_i	A_f
1	0.1848	0.0069
2	0.1895	0.0104
3	0.1856	0.0023
Promedio	0.1866	6.5×10^{-3}
% de remoción	96.5	

Tabla 44. Valores de absorbancia ($\lambda=585$ nm) del colorante azul cibanon RS-JM a 100 ppm.

No. de repeticion	A_i	A_f
1	0.3975	0.0127
2	0.4346	0.01878
3	0.4169	0.0135
Promedio	0.4163	0.0149
% de remoción	96.4	

Tabla 45. Valores de absorbancia ($\lambda=585$ nm) del colorante azul cibanon RS-JM a 150 ppm.

No. de repeticion	A_i	A_f
1	0.5855	0.0093
2	0.6025	0.01104
3	0.6160	0.01937
Promedio	0.6013	0.0132
% de remoción	97.8	

Tabla 46. Valores de absorbancia ($\lambda=585$ nm) del colorante azul cibanon RS-JM a 200 ppm.

No. de repeticion	A_i	A_f
1	0.9281	0.0278
2	0.7782	0.0274
3	0.8431	0.0268
Promedio	0.8498	0.0274
% de remoción	96.8	

Tabla 47. Valores de absorbancia ($\lambda=608$ nm) del colorante azul cibacron FN-R a 50 ppm.

No. de repeticion	A_i	A_f
1	0.4026	0.0160
2	0.3907	0.01428
3	0.4008	0.01077
Promedio	0.3980	0.01368
% de remoción	96.6	

Tabla 48. Valores de absorbancia ($\lambda=608$ nm) del colorante azul cibacron FN-R a 100 ppm.

No. de repeticion	A_i	A_f
1	1.0077	0.02410
2	1.0971	0.01968
3	1.0646	0.04410
Promedio	1.0646	0.02900
% de remoción	97.2	

Tabla 49. Valores de absorbancia ($\lambda=608$ nm) del colorante azul cibacron FN-R a 150 ppm.		
No. de repeticion	A_i	A_f
1	1.2617	0.02256
2	1.2135	0.0228
3	1.2310	0.0171
Promedio	1.2354	0.0209
% de remoción	98.3	

Tabla 50. Valores de absorbancia ($\lambda=608$ nm) del colorante azul cibacron FN-R a 200 ppm.		
No. de repeticion	A_i	A_f
1	1.7818	0.04298
2	1.7706	0.04852
3	1.7311	0.0444
Promedio	1.7611	0.0453
% de remoción	97.4	

ANEXO D

Espectros de FTIR del fenol y 2-clorofenol

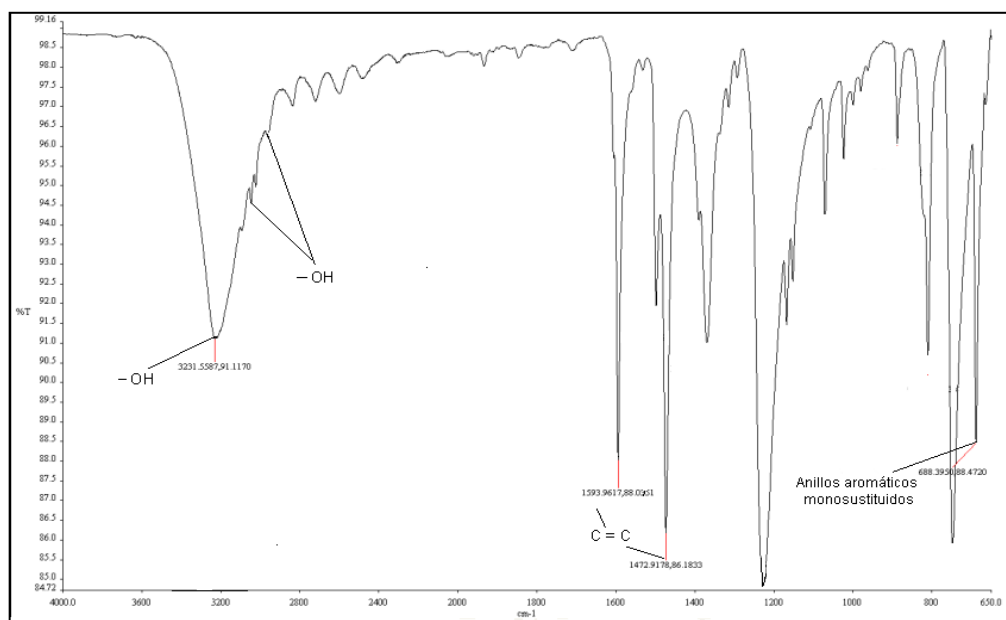


Figura 65. Espectro de FTIR del contaminante fenol.

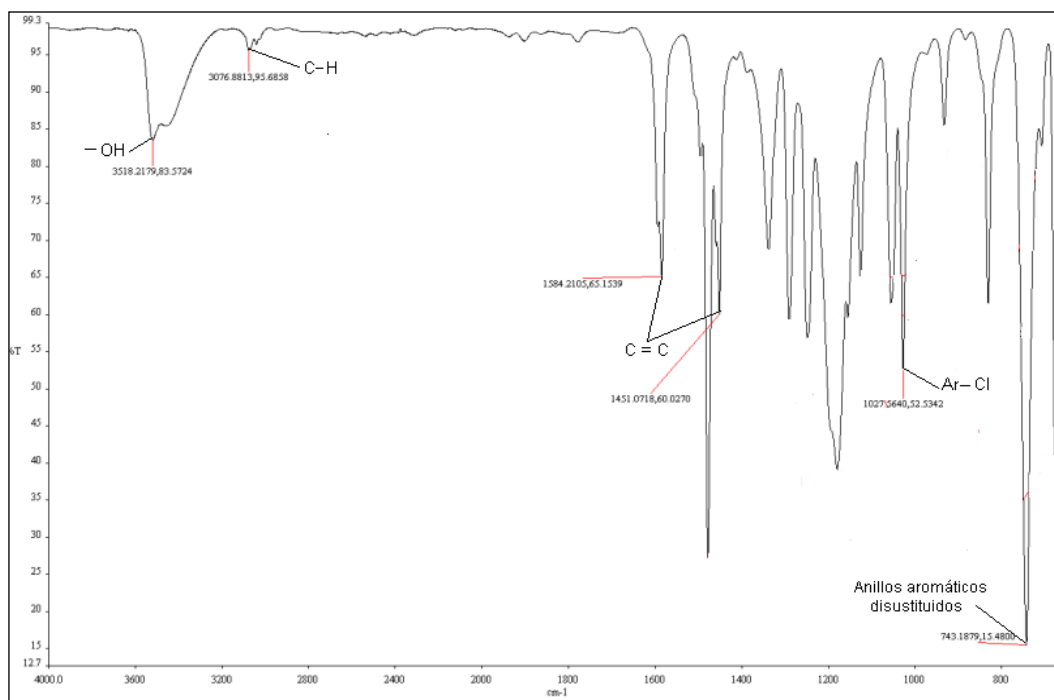


Figura 66. .Espectro de FTIR del contaminante 2-clorofenol.

Anexo E

RMN ^1H y espectrometría de masas de la caracterización de los productos de oxidación del fenol, 2-clorofenol y colorantes textiles

Para los estudios de RMN ^1H de los productos de reacción del fenol y 2-clorofenol se utilizó metanol deuterado (CD_3OD) como disolvente, para todos los espectros se tomaron como referencia las señales de $-\text{OH}$ y $-\text{CH}_3$ del metanol, ajustando en el equipo sus señales correspondientes en 4.76 y 3.12 ppm (Figura 67 y 68).

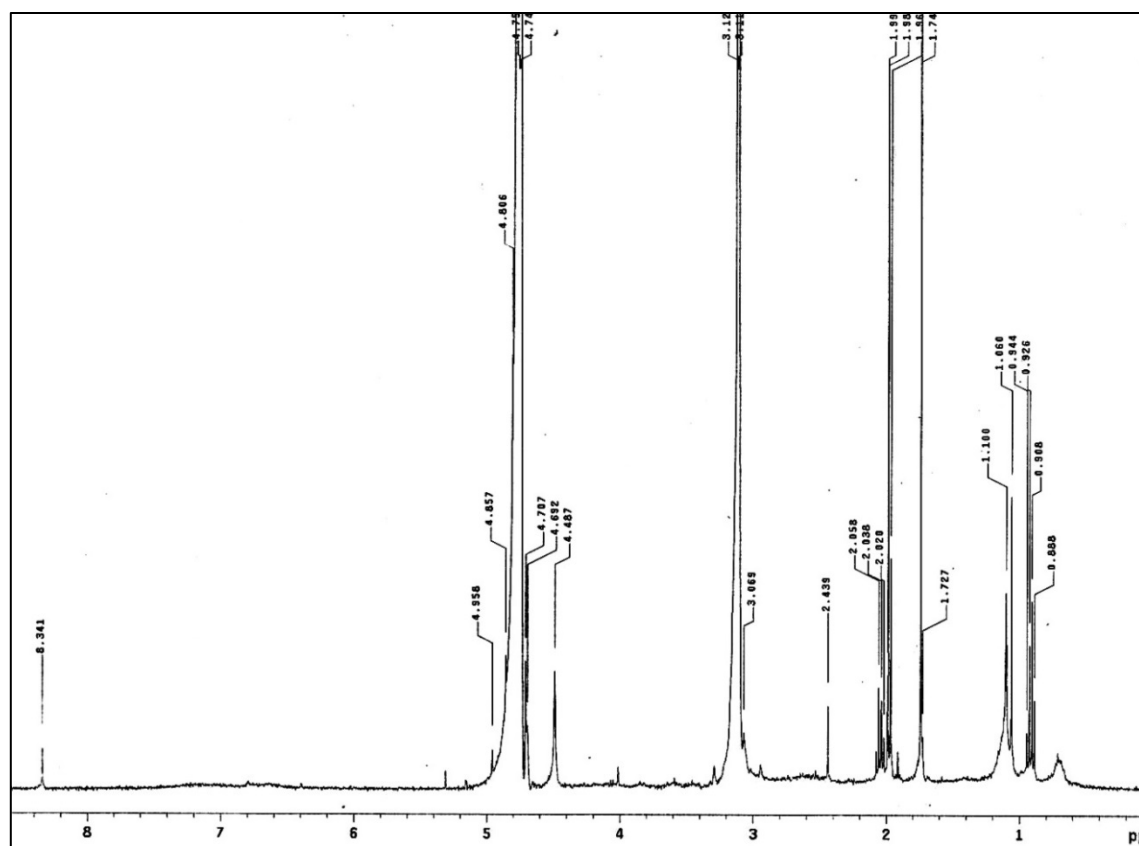


Figura 67. Productos de reacción del fenol con la CPOCh

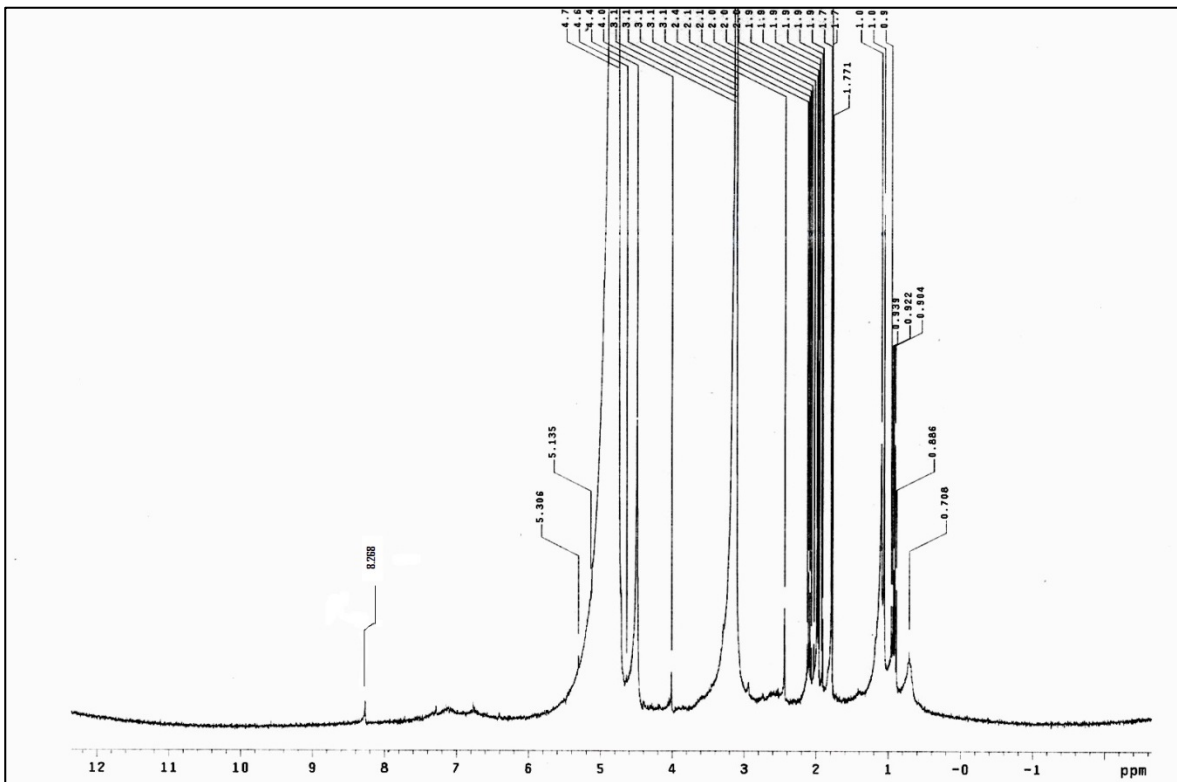


Figura 68. Productos de reacción del 2-clorofenol con la CPOCh

Analizando el espectro de RMN ^1H para los productos de reacción del fenol y 2-clorofenol en sus zonas características (figura 69 y 70) se observan señales en la región de 7.5 a 6.2 ppm que corresponden a hidrógenos aromáticos (Hesse et al., 1999), el comportamiento de ensanchamiento de señales es característico de compuestos poliméricos (Vicerrectorado de investigación-Universidad de Sevilla, 2014).

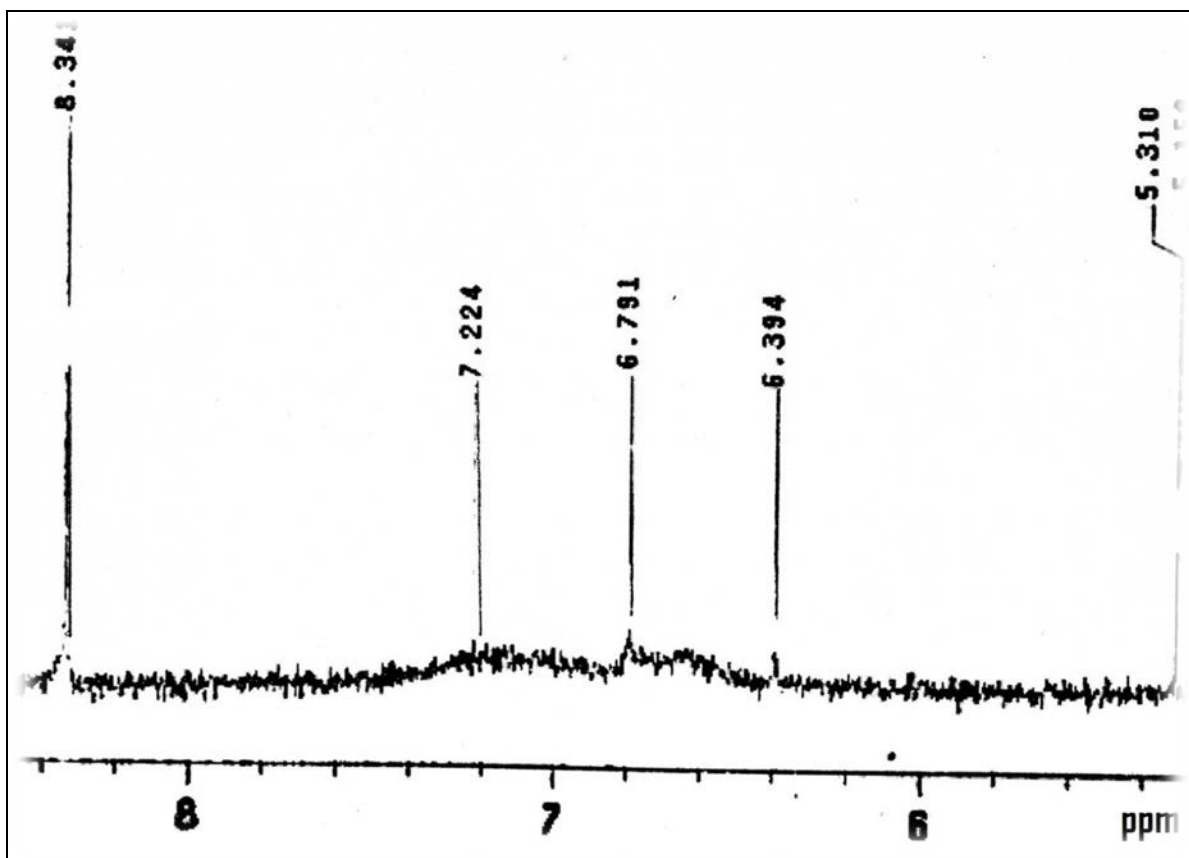


Figura 69. Espectroscopía de RMN ^1H de los productos de reacción del fenol.

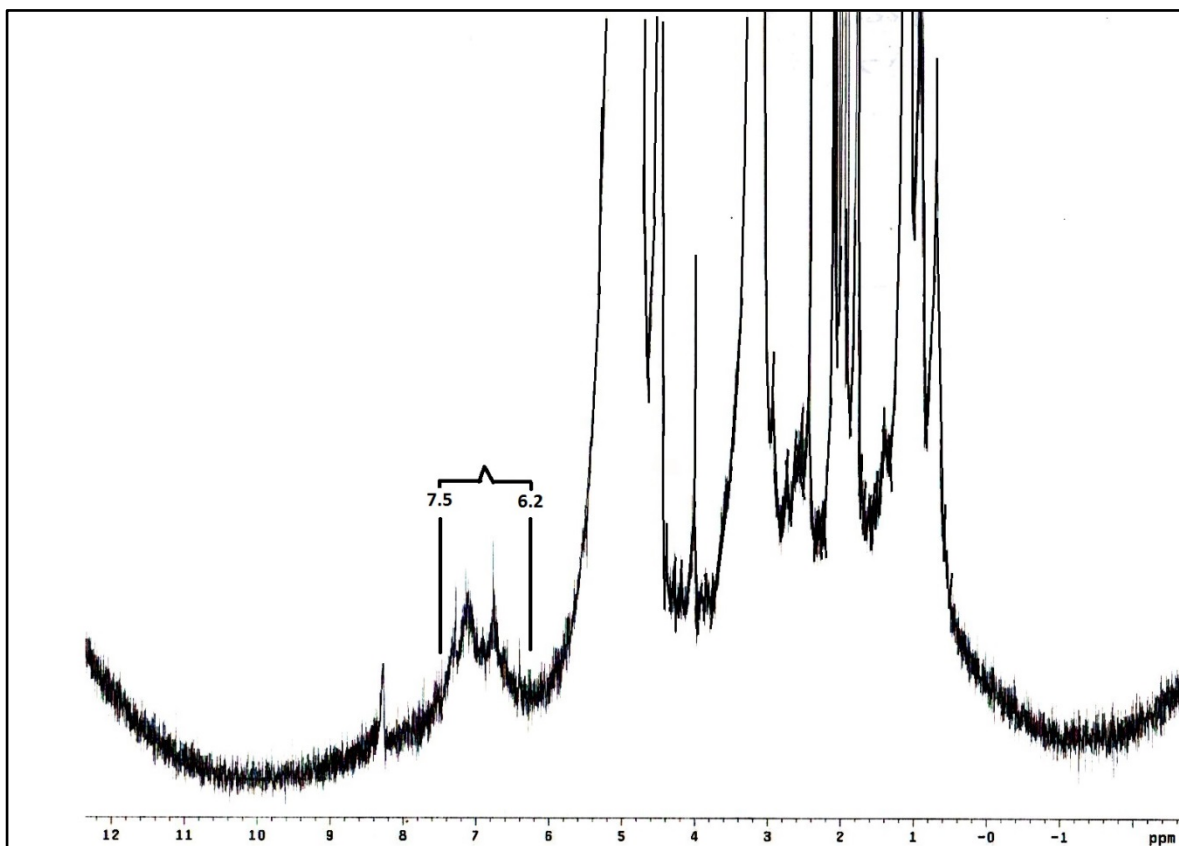


Figura 70. Espectroscopía de RMN ^1H de los productos de reacción del 2-clorofenol.

En el espectro de masas de los productos de reacción del fenol se identificó la presencia del ion molecular (M^+) correspondiente dímeros a un valor de m/z 185 (figura 71). El espectro obtenido presento un comportamiento espectral que corresponde a una muestra con impurezas, por lo que algunas señales presentan pérdidas de m/z no lógicas. A pesar de esto el espectro de masas es una herramienta valiosa porque presento un patrón espectral después de la reacción enzimática.

Con respecto a los productos de reacción a partir del 2-clorofenol se encontró una señal en m/z a 254 (figura 72) correspondiente a un ion molecular (M^+), de dímero con 2 átomos de cloro por lo que se espera teóricamente 3 señales, la denominada A que corresponde al ion molecular con un peso molecular de 254 m/z y con una abundancia relativa de 100%, la segunda A+2 con un valor de m/z de 256 y con una abundancia relativa de 64%, finalmente la tercera señal m/z de 258 con una abundancia relativa del 10% (McLafferty y Turecek; 1993)

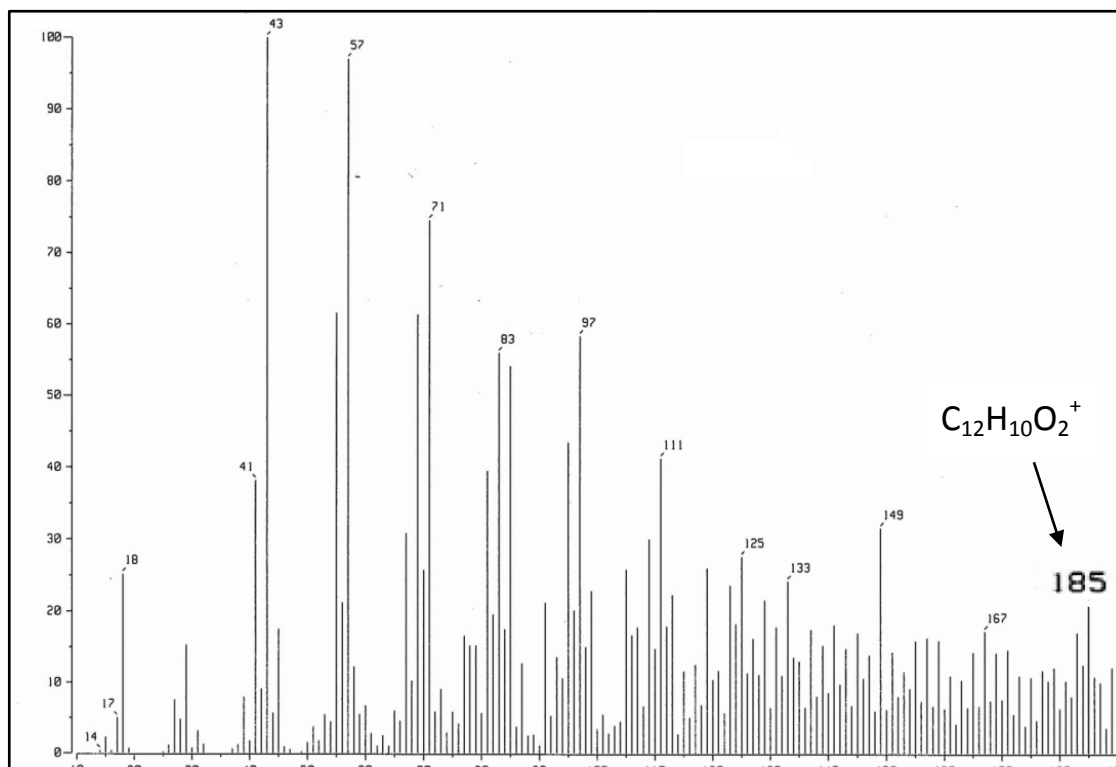


Figura 71. Espectro de masas de los productos de reacción del fenol. Donde se observa el pico del ion molecular a una señal m/z: 185

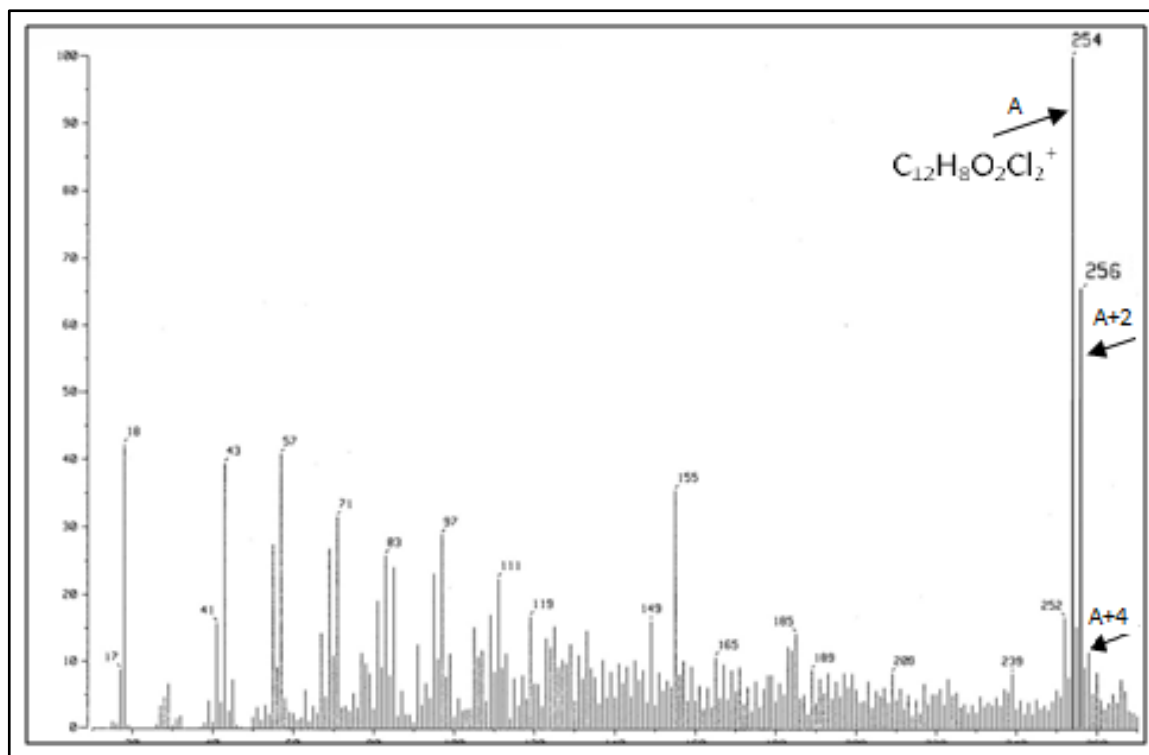


Figura 72. Espectro de masas de los productos de reacción del 2-clorofenol donde se observa el pico del ion molecular a una señal m/z de 254.

El espectro de RMN H de los productos de reacción del colorante negro directo 22 (figura 73) no presenta señales intensas, sin embargo se observa en 7.03 ppm una señal centrada que puede ser asociada a los hidrógenos de naftoquinona (Hesse et al., 1999) y un conjunto de señales en el intervalo de 7.5 a 8 ppm, asociados a hidrógenos aromáticos. La señal de los hidrógenos de la acetona deuterada ($\text{CD}_3\text{CO CD}_3$), utilizada como disolvente se tomó como referencia ajustándola en el equipo en 2.04 ppm.

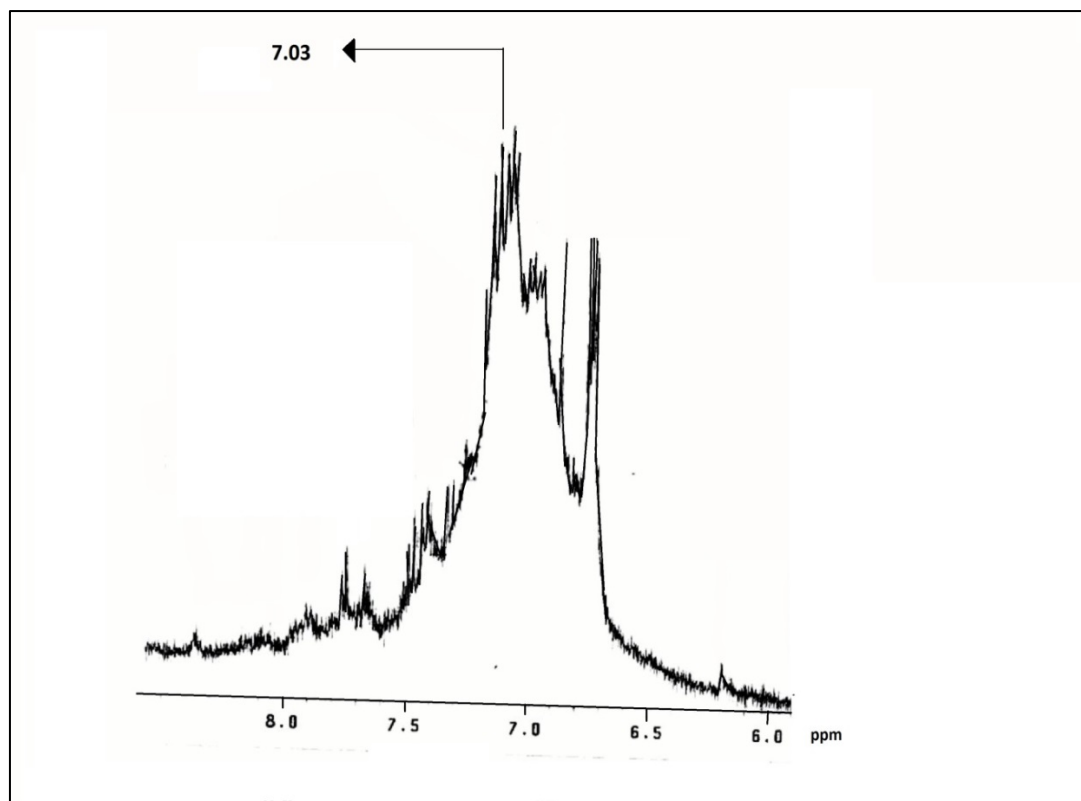


Figura 73. Espectro de RMN ^1H de los productos de reacción del colorante negro directo 22.

El espectro de RMN ^1H de los productos de oxidación del colorante azul solofenil BF se muestra en la figura 74 y presenta una señal ancha entre 7.5 y 6.5 ppm y cuya ampliación (figura 75) muestra una señal ancha centrada en 6.82 ppm que corresponde a hidrógenos de quinonas ($\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2$). El espectro fue ajustado tomando como referencia las señales del $-\text{OH}$ y $-\text{CH}_3$ del metanol deuterado (CD_3OD), utilizado como disolvente y ajustando en el equipo sus señales en 4.75 y 3.12 ppm.

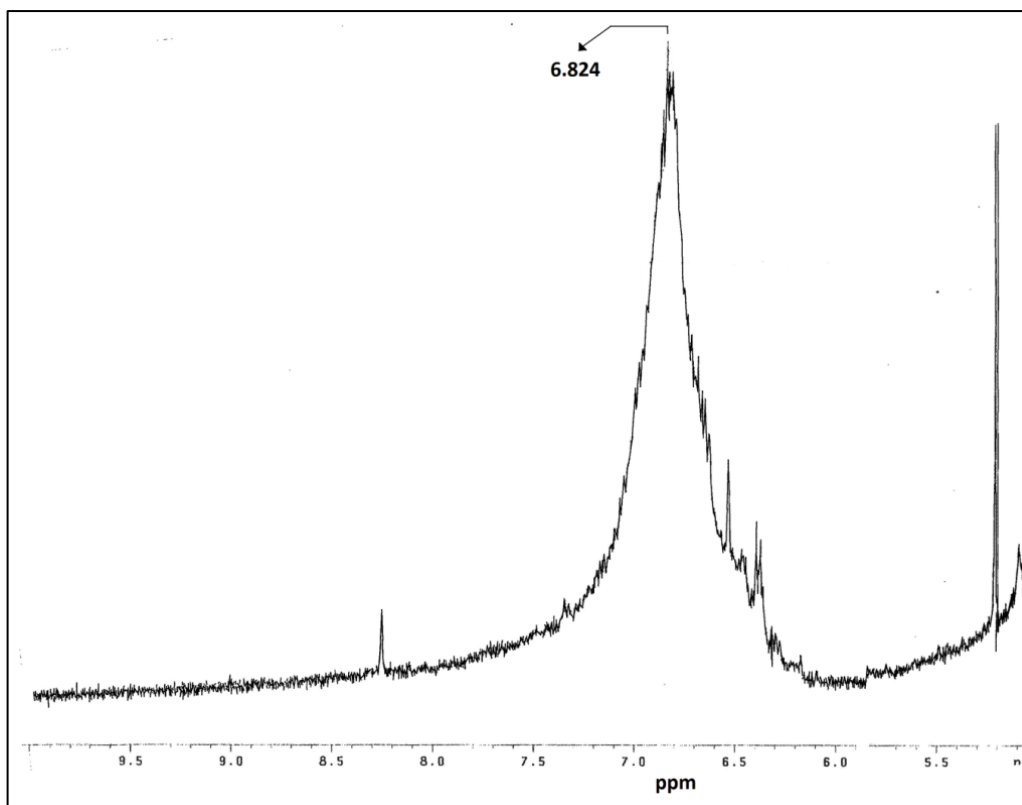


Figura 74. Espectro de RMN ^1H de los productos de reacción del colorante azul solofenil BF, usando acetona deuterada como disolvente.

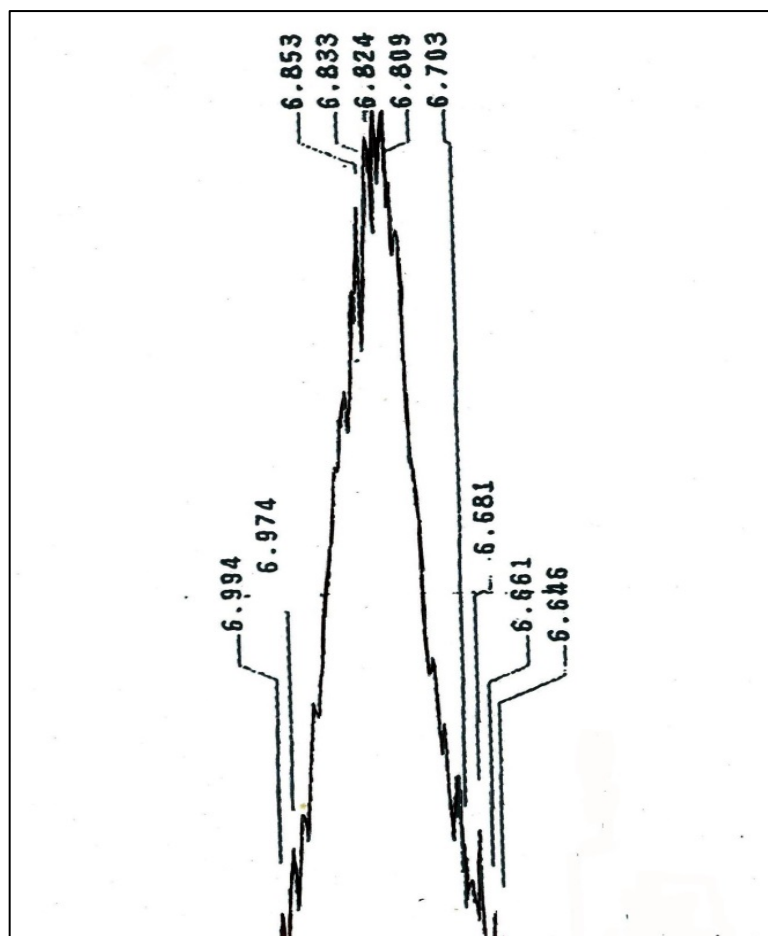


Figura 75. Ampliación de la zona característica del espectro de RMN ¹H de los productos de reacción del colorante azul solofenil BF.

ANEXO F

Agua residual textil

En las tablas 51 y 52 se presentan los valores de absorbancia obtenidos a partir de la espectroscopía UV/vis de los experimentos realizados por triplicado, para las muestras de teñido y total del agua residual textil antes y después de su tratamiento con el CPOCh, respectivamente, así como sus valores promedio y el porcentaje de remoción logrado.

Tabla 51. Valores de absorbancia ($\lambda=470$ nm) de la muestra de teñido del agua residual textil y el porcentaje de remoción logrado.		
No. de repetición	A_i	A_f
1	0.8740	0.0589
2	0.8854	0.0622
3	0.8790	0.0560
Promedio	0.8794	0.0590
Porcentaje de remoción:	93.2	

Tabla 52. Valores de absorbancia ($\lambda=470$ nm) de la muestra total del agua residual textil y el porcentaje de remoción logrado.		
No. de repetición	A_i	A_f
1	0.9273	0.1934
2	0.9343	0.1206
3	0.9302	0.1506
Promedio	0.9306	0.1548
Porcentaje de remoción:	83.35	

ANEXO G

Curva de calibración para el colorante negro directo 22

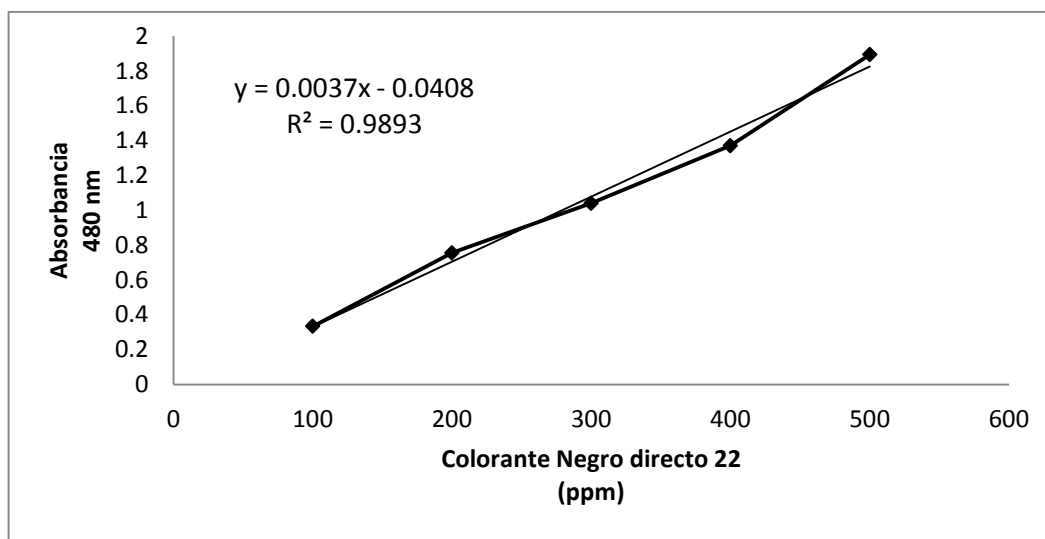


Figura 76. Grafica de la curva de calibración para el colorante negro directo 22.