



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIAS ALIMENTARIAS

**INMOVILIZACIÓN DE MEDIADORES REDOX EN CARBÓN
ACTIVADO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
INGENIERO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTA:

Karla Maria Ceballos Valenzuela

CD. OBREGÓN SONORA

MAYO DE 2005

RESUMEN

Un tóxico es cualquier sustancia química capaz de causar daño, debilitar o matar a cualquier organismo vivo. Los colorantes azo son un claro ejemplo, los cuales son perjudiciales para la vida acuática y mutagénicos para el hombre. Más de 7×10^5 toneladas de estos colorantes son producidas anualmente alrededor del mundo, aplicándose entre un 60 y 70% en la industria textil.

Debido al gran impacto ecológico de este tipo de contaminantes en el ambiente, surge la necesidad de plantear y experimentar un sistema de tratamiento de aguas residuales a nivel laboratorio, que utiliza mediadores redox inmovilizados, como es el caso de la riboflavina y el compuesto 2,6-disulfonato de antraquinona (AQDS) en carbón activado para la reducción de estos contaminantes.

Para realizar el proceso de inmovilización de estos mediadores redox en carbón activado, se llevó a cabo primeramente la elaboración de una isoterma de adsorción de éste carbón, continuando con un tratamiento para reducir el colorante azul directo 71. Los resultados indican que hubo una adecuada inmovilización de los mediadores redox en el carbón activado, debido a que la reducción de los colorantes se presentó, convirtiéndose estos al reducirse el

enlace azo (-N=N) de su estructura química a aminas aromáticas. Se comprueba además que el carbón activado también presenta un papel catalítico en la conversión de este colorante. De los mediadores redox empleados (AQDS y riboflavina) en esta investigación, el modelo AQDS presenta mayor afinidad hacia el carbón activado, por lo que pueden utilizarse en el tratamiento de aguas residuales que contengan compuestos recalcitrantes como son los colorantes azo, mediante la técnica de inmovilización.

La inmovilización de mediadores redox es una alternativa que puede ser empleada en el tratamiento de aguas residuales, ya que éstos pueden ser reutilizados, sin la necesidad de agregarlos continuamente a los reactores anaerobios.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	i
ÍNDICE	iii
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
I. INTRODUCCIÓN	
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del problema.....	2
1.3. Justificación.....	3
1.4. Objetivo.....	5
1.5. Limitaciones.....	5
II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	
2.1 Métodos de inmovilización.....	6
2.1.1 Por retención física.....	6
2.1.2 Por unión química.....	7
2.2 Matrices utilizadas para la inmovilización de moléculas.....	8
2.2.1 Carbón activado.....	8
2.3 Tipos de mediadores redox.....	10
2.3.1	
Antraquinona.....	11
2.3.2 Riboflavina.....	13
2.4 Inmovilización de mediadores redox.....	16

III. MÉTODO

3.1 Materiales.....	19
3.2 Metodología.....	20
3.2.1 Preparación de soluciones	20
3.2.2 Elaboración de la una curva de calibración.....	20
3.2.3 Elaboración del isoterma de adsorción en carbón activado.....	21
3.2.4 Reducción del colorante azul directo 71 (AD71), mediante.....	21
mediadores redox inmovilizados	

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Inmovilización de AQDS en carbón activado.....	23
4.2 Reducción del colorante Azul Directo 71.....	26

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....28

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1 Valores requeridos para realizar un isoterma de adsorción de AQDS en carbón activado.....	25

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Técnicas de inmovilización.....	8
2 Mecanismo de reducción de colorantes azo a través del..... compuesto modelo AQDS (2,6-disulfonato de antraquinona).	12
3 Estructura de la riboflavina.....	15
4 Reducción de colorantes azo por la riboflavina.....	16
5 Curva de calibración de AQDS ($\lambda=340$).....	20
6 Adsorción de 2,6-disulfonato de antraquinona (AQDS), en carbón activado.....	24
7 Isoterma de adsorción de AQDS en carbón activado, modelo de Freundlich.....	25
8 Reducción del colorante azo AD71 (medido a una longitud de onda de 579 nm), por un lodo anaerobio en ausencia y presencia de AQDS inmovilizado en carbón activado.....	27

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Se considera como contaminante, al exceso de materia o energía (calor) que causa daño a los humanos, animales, plantas y bienes, o bien que perturbe negativamente las actividades que normalmente se desarrollaron cerca o dentro del agua.

Un tóxico es cualquier sustancia química capaz de causar daño, debilitar o matar a cualquier organismo vivo. Los efectos que produce son en función del tipo de sustancia, concentración y metabolismo. En general, son teratogénicas

(que producen anomalías en plantas y animales), mutagénicas, cancerígenas o venenosas. Una característica relevante es que son acumuladas, y su efecto se manifiesta solo después de un cierto periodo de exposición (Jiménez, 2002).

Los colorantes azo son compuestos sintéticos ampliamente utilizados en la industria textil, alimentaria y para la elaboración de cosméticos. Más de 7×10^5 toneladas de éstos son producidas anualmente en todo el mundo (Cervantes *et al*, 2001). La industria textil aplica en sus procesos de manufactura entre un 60 y 70% de colorantes azo. La descarga de estos colorantes al medio ambiente ocasiona un riesgo hacia la vida acuática, por ser altamente tóxicos y tener un efecto cancerígeno en el hombre (Van der Zee *et al*, 2002).

Debido al gran impacto ecológico de este tipo de contaminantes tóxicos, surge la necesidad de plantear y experimentar un sistema de tratamiento de aguas residuales a nivel laboratorio, que utiliza mediadores redox inmovilizados como la riboflavina y el compuesto 2,6-disulfonato de antraquinona, para la reducción de estos contaminantes.

Con base a los resultados generados en esta investigación se evaluará la posibilidad de inmovilizar los mediadores anteriormente mencionados, utilizando carbón activado como soporte. Además, se determinará cual es el

más apto para ser utilizado en el tratamiento de contaminantes prioritarios y proponer su posible uso a nivel industrial.

Este proyecto va encaminado a contribuir al desarrollo sustentable de este país, ya que se buscan alternativas de tratamiento para los contaminantes que producen las industrias y de esta forma poder disponer de esta agua y volverla a utilizar de acuerdo a las normas estipuladas, ya sea para el riego agrícola, áreas verdes o parques, entre otras actividades.

1.2 Planteamiento del problema

El agua representa uno de los recursos más indispensables para la vida humana. Además de formar parte esencial de la vida, pues constituye la mayor parte de los organismos vivos, es utilizada en casi toda clase de actividades humanas, por ejemplo, es vital para la agricultura, procesos industriales, generación de energía eléctrica, asimilación de desechos, entre otras actividades (Enkerlin et al, 1997).

Durante muchos años el agua se ha empleado como vehículo para eliminar toda clase de desechos y no se tenía suficiente conocimiento sobre el impacto que estos contaminantes podrían tener sobre el ecosistema y la salud humana, así como del hecho de que el agua puede ser reutilizada. Existen diferentes

formas de tratamiento de aguas contaminadas y uno de estos son los procesos redox, los cuales son empleados cuando el contaminante cambia sus propiedades tóxicas al invertir su estado de oxidación (Enkerlin et al, 1997).

Múltiples contaminantes son muy recalcitrantes bajo condiciones anaeróbicas como es el caso de los colorantes azo, compuestos polihalogenados, nitroaromáticos, entre otros. Los mediadores redox aceleran la conversión de dichos contaminantes, pero se requiere adicionarlos a los sistemas de tratamiento de manera continua lo cual aumenta los costos del tratamiento.

La inmovilización de mediadores redox permite un mejor tratamiento de los contaminantes, pero se desconocen los mecanismos adecuados para llevarla a cabo.

1.3 Justificación

El agua puede contaminarse de diversas maneras, con sustancias químicas orgánicas e inorgánicas, alterando o modificando sus características originales. Desafortunadamente, es el mismo hombre quien ha abusado de las aguas del planeta, utilizándolas como vehículo de sus desechos, de tal forma que sus actividades han ido degradando paulatinamente el medio ambiente acuático (Novaro, 1998).

Metcalf y Eddy (1996) indican que si se permite la acumulación y estancamiento del agua residual, la descomposición de la materia orgánica que contiene puede conducir a la generación de grandes cantidades de compuestos malolientes. A este hecho cabe añadir la frecuente presencia en el agua residual bruta, de numerosos microorganismos patógenos y causantes de enfermedades, también suele contener nutrientes que pueden estimular el crecimiento de plantas acuáticas y pueden incluir también compuestos tóxicos. Es por todo ello que la evacuación inmediata y sin molestias del agua residual de sus fuentes de generación, seguida de su tratamiento y eliminación, es no solo deseable sino también necesaria en toda sociedad industrializada.

La aplicación de compuestos análogos a las sustancias húmicas, como es el caso de 2,6-disulfonato de antraquinona (AQDS) y el uso de riboflavina son una alternativa para disminuir la contaminación, ya que estas sustancias tienen la capacidad de estimular la biotransformación de contaminantes conteniendo grupos electrofílicos, como lo son los grupos azo a través del transporte de electrones entre una fuente externa de electrones y estos contaminantes (Cervantes, 2002).

La aplicación de mediadores redox en diferentes efluentes industriales demanda la dosificación continua de los mismos, pues éstos no son retenidos en el bioreactor debido a su solubilidad. Por lo tanto, este procedimiento resulta

costoso y consume mayor tiempo, por lo cual una alternativa sería inmovilizar estos mediadores redox, la cual tiene la ventaja de aumentar la estabilidad del compuesto inmovilizado y la posible reutilización del derivado, por lo que disminuyen los costos del proceso.

1.4 Objetivo

- Objetivo general:

Evaluar la capacidad del carbón activado para inmovilizar diferentes mediadores redox, verificando el adecuado proceso de inmovilización mediante la biodegradación reductiva de un compuesto modelo.

- Objetivos particulares:
 - Evaluar la capacidad de adsorción del carbón activado, respecto al AQDS y la riboflavina.
 - Identificar que mediador redox es atrapado en mayor cantidad en la matriz.
 - Evaluar que mediador redox inmovilizado en el carbón activado estimula la biodegradación reductiva de un compuesto modelo.

1.5 Limitaciones

El uso de mediadores redox en la transformación de contaminantes prioritarios y su inmovilización es un tema muy poco conocido y que tiene pocos años de haberse descubierto, por lo tanto existe escasa información bibliográfica, la cual es un factor limitante.

Los resultados que se obtengan en este experimento están dirigidas aquellas industrias generadoras de aguas residuales que contengan contaminantes difíciles de degradar.

II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1 Métodos de inmovilización.

En general los métodos de inmovilización se suelen clasificar en dos grandes categorías: Retención física y unión química. En el método de inmovilización por retención física las moléculas son retenidas en la red tridimensional de un polímero insoluble en agua o aprisionadas en el interior de microcápsulas delimitadas por una membrana semipermeable. La inmovilización por unión química es una técnica en la que la molécula debe ser fijada a un soporte, tan sólidamente como sea posible. Se deben considerar las características propias, tanto de la molécula que se va a fijar, como del soporte (Scriban, 1985).

2.1.1 Retención física.

Atrapamiento: Consiste en la retención física de la molécula en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión del compuesto a inmovilizar en una solución del monómero. Seguidamente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. El atrapamiento puede ser en geles o en fibras. Este proceso requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, así como la comprobación de que la naturaleza química del proceso no altere los grupos reactivos del compuesto inmovilizado (Arroyo, 1998).

2.1.2 Unión química.

Unión a soportes: Son los métodos de inmovilización más utilizados. La elección del soporte y del tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador. Este método puede ser por adsorción o unión covalente. Se han utilizado una gran variedad de materiales como soportes para la inmovilización, estos materiales difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente se encuentran en forma de cilindro, hojas, fibras y esferas (Arroyo, 1998).

En la Figura 1, se muestran de manera esquematizada las diferentes técnicas para la inmovilización de moléculas.

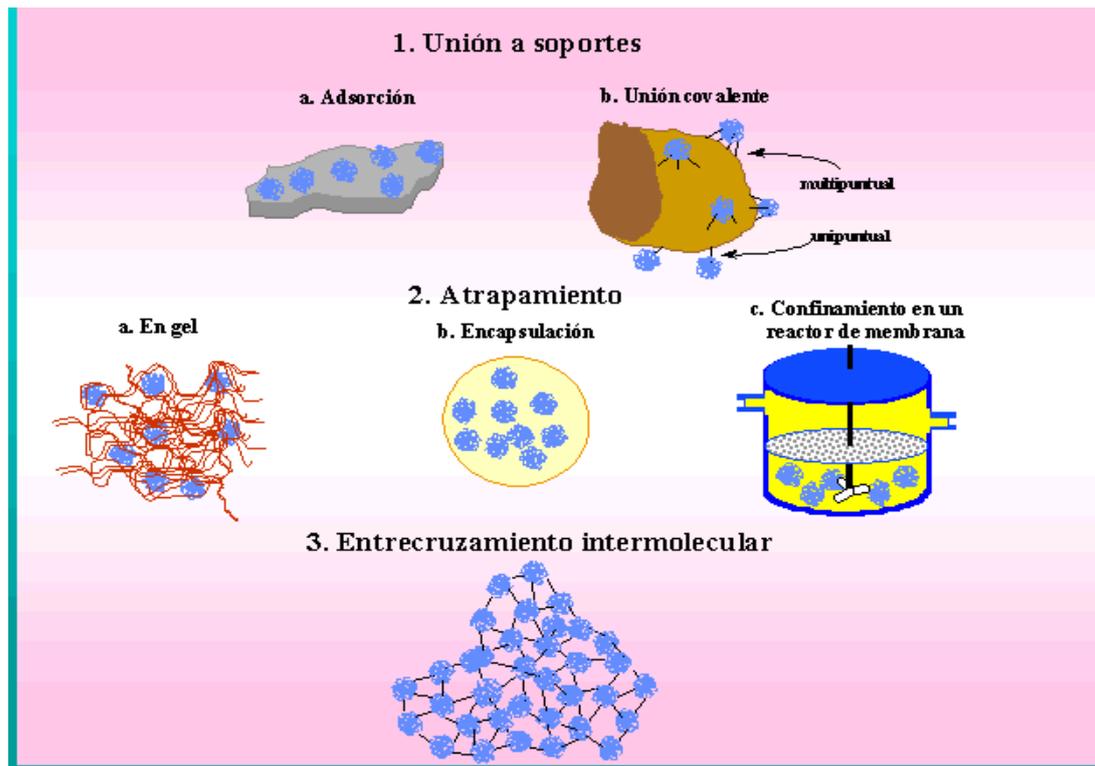


Figura 1. Técnicas de inmovilización, (<http://www.tecnicasdeinmovilizacion.com.htm>).

2.2 Matrices utilizadas para la inmovilización de moléculas.

Existen diferentes matrices que son utilizadas para la inmovilización de moléculas y su selección depende de las propiedades físicas y químicas tanto de la matriz como de la molécula a inmovilizar. En esta investigación se utilizará al carbón activado como matriz, del cual a continuación se describen algunas propiedades y características.

2.2.1 Carbón activado.

En los Estados Unidos, G.L. Spalding demostró en 1930 que el carbón activado se puede aplicar en forma satisfactoria y económica a un abastecimiento público de aguas (Gordon, 1971).

Baker (1991) señala que es común utilizar carbón activado para adsorber el sabor y el olor de contaminantes químicos orgánicos. Existen factores económicos que favorecen su uso. Metcalf y Eddy (1996) indican que es posible utilizarlo en el tratamiento de compuestos tóxicos mediante la adsorción, como es el caso de compuestos orgánicos naturales y sintéticos, entre los que se encuentran los plaguicidas, metales pesados, amoníaco y algunos contaminantes prioritarios refractarios.

El proceso de elaboración de carbón activado se basa en la de un carbón a partir de materiales tales como la corteza de almendros, nogales o palmeras, otras maderas y carbón mineral. Este carbón se obtiene calentando el material del que se trate al rojo vivo para expulsar los hidrocarburos, pero sin aire suficiente para mantener la combustión. A continuación para activar al carbón, se expone la partícula a un gas oxidante a altas temperaturas. Este gas desarrolla una estructura porosa en el carbón natural favoreciendo la aparición de grandes superficies internas. Tras el proceso de activación, el carbón se puede separar o dividir en diferentes tamaños con diferentes capacidades de adsorción. Los dos tipos de clasificación son: carbón activado en polvo y granular (Metcalf y Eddy, 1996).

Debido a las propiedades de adsorción del carbón activado, éste puede utilizarse para la inmovilización de moléculas, quedando éstas atrapadas en dicho carbón. Metcalf y Eddy (1996) indican que el proceso de adsorción tiene lugar a tres etapas: macrotransporte, microtransporte y sorción. El macrotransporte engloba el movimiento por advección y difusión de la materia orgánica a través del líquido hasta alcanzar la interfase líquido-sólido; por su parte, el microtransporte hace referencia a la difusión del material orgánico a través del sistema de macroporos del carbón activado granular hasta alcanzar las zonas de adsorción que se hallan en los microporos y submicroporos de los

gránulos de carbón activado. La sorción es el mecanismo por el cual la materia orgánica se adhiere al carbón.

La capacidad teórica de adsorción de un determinado compuesto por medio del carbón activado se puede determinar calculando su isoterma de adsorción. La cantidad de adsorbato que pueda retener un adsorbente es función de las características y de la concentración del adsorbato y de la temperatura. En general, la cantidad de materia adsorbida se determina como función de la concentración a temperatura constante, y la función resultante se conoce con el nombre de isoterma de adsorción. Las fórmulas más frecuentemente empleadas en el tratamiento de aguas residuales son las desarrolladas por Freundlich (Metcalf y Eddy, 1996).

La isoterma de Freundlich, se deriva de consideraciones empíricas y estipula lo siguiente:

$$x/m = K.Ce^{1/n}$$

Donde x/m es la cantidad adsorbida por peso unitario de adsorbente (carbón), C_e , es la concentración de equilibrio del adsorbato en solución después de la adsorción y K y n son constantes empíricas. En general los valores de n son mayores a la unidad. Estas constantes se determinan representando gráficamente la relación entre (x/m) y C (Gordon, 1971).

Investigaciones recientes señalan que el carbón activado puede ser utilizado como catalizador para el tratamiento de contaminantes (Van der Zee et al, 2002), por lo cual su utilización para el tratamiento de efluentes tendrían grandes ventajas, pues funcionaría tanto como matriz para inmovilización del mediador redox a utilizar, así como una estructura catalítica para el tratamiento de aguas residuales.

Van der Zee et al (2002) señalan que microorganismos presentes en un lodo anaeróbico pueden transferir electrones de la oxidación de sustratos hacia los grupos del carbón activado, funcionando este como aceptor de electrones. La reducción de carbón activado (CA) funciona como un canal de electrones para la reducción de colorantes azo, por tanto, este puede funcionar como transportador de electrones.

2.3 Tipos de mediadores redox.

En los organismos, la utilización de la energía derivada de las reacciones químicas implica reacciones de oxidación-reducción (redox). Químicamente una oxidación se define como una *pérdida* de un electrón o varios electrones de una sustancia. A su vez, una reducción se define como la *ganancia* de un electrón o electrones por parte de una sustancia. En bioquímica, la química de las células, las oxidaciones y las reducciones implican frecuentemente la transferencia no sólo de electrones sino de átomos completos de hidrógeno. Un átomo de hidrógeno (H) consta de un protón y un electrón. Cuando pierde su electrón el átomo de hidrógeno se convierte en un protón o ión hidrógeno, H⁺ (Madigan et al, 2004).

Los mediadores redox son sustancias que son utilizadas por algunos microorganismos como fuente de electrones para la obtención de energía, los beneficios que aportan estas reacciones es el reciclaje de los grupos activos, al oxidarse y reducirse continuamente como un mecanismo natural y la intervención de éstos acoplado a la reducción de diferentes contaminantes (Van der Zee, 2001).

A continuación se describen algunos de los mediadores redox que pueden ser utilizados para el tratamiento de diferentes contaminantes presentes en el agua.

2.3.1 Antraquinona.

Madigan et al (2004) señalan que el humus es una mezcla compleja de materia orgánica. Procede parcialmente de los constituyentes de los microorganismos del suelo que han resistido la descomposición y, en parte, también del material resistente de las plantas. Es la fracción orgánica más abundante en la biosfera. Está compuesto de una estructura compleja en la que polímeros recalcitrantes prevalecen por décadas e incluso siglos (Cervantes, 2002).

Stevenson (1994) menciona que las sustancias húmicas son importantes en el medio ambiente y en geoquímica por las siguientes razones:

1. Pueden estar implicadas en la transportación y la posterior concentración de sustancias minerales en zonas pantanosas.
2. Sirven como acarreadores de xenobióticos orgánicos (como trazas de elementos) en el agua. Se sabe que las sustancias húmicas no son fisiológicamente dañinas, pero son estéticamente inaceptables porque imparten un color rojizo-oscuro en agua potable y lagos recreativos. Juegan un papel importante en la reducción de la toxicidad de ciertos metales pesados (Ej. Cu^{2+} y Al^{3+}) para organismos acuáticos, incluyendo peces.
3. Actúan como agentes oxidadores o reductores, dependiendo de las condiciones ambientales. Pueden tener efectos fotoquímicos en el agua, incluyendo la fotoalteración de xenobióticos. También reducen $\text{Hg}(\text{II})$ a Hg^0 volátil bajo condiciones a pH natural, por lo tanto proporcionan un sendero para la movilización de Hg en el medio ambiente.
4. La sorción de el suelo hacia gases orgánicos e inorgánicos es altamente influenciada por el humus

El modelo 2,6- disulfonato de antraquinona (AQDS), es un compuesto análogo del humus. Field y colaboradores (2000) comentan que este compuesto no

solamente pueden actuar como aceptor de electrones en la oxidación microbiana de muchos compuestos orgánicos, sino también pueden estimular la (bio) transformación de contaminantes conteniendo grupos electrofilicos, como los grupos azo y nitro, así como compuestos policlorados y metales radiactivos, a través del transporte de electrones entre una fuente externa de electrones y estos contaminantes (Figura 2).

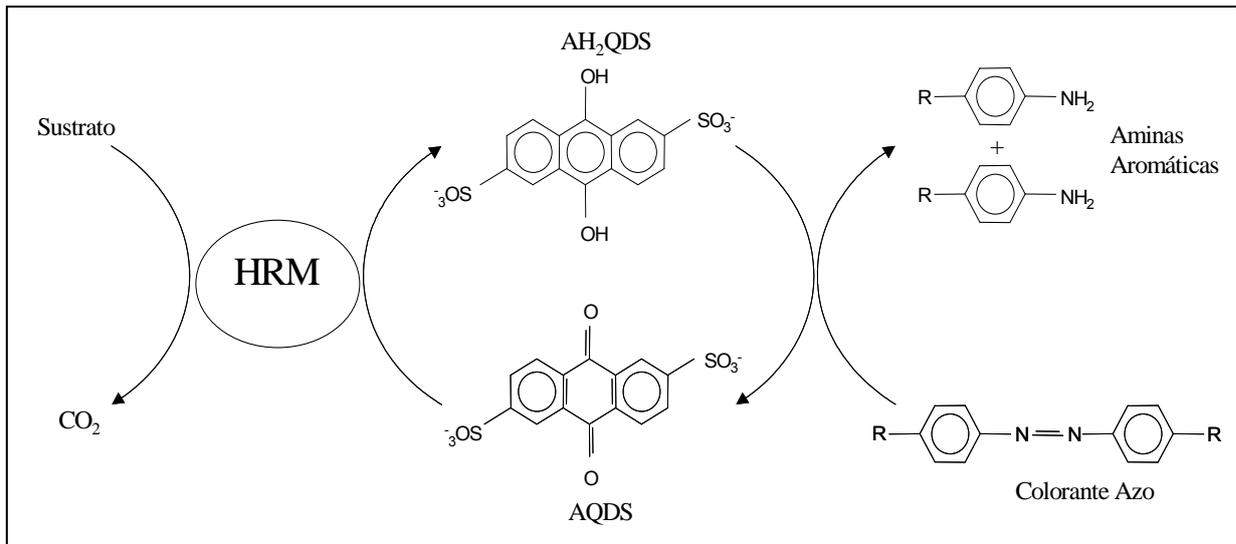


Figura 2. Mecanismo de reducción de colorantes azo a través del compuesto modelo AQDS (2,6-disulfonato de antraquinona). Los microorganismos reductores del humus (HRM) reducen las quinonas en el humus y las hidroquinonas formadas transfieren los electrones al grupo azo para reducirlo a aminas aromáticas.

Cervantes et al (2001) comentan que la adición de AQDS, a niveles por debajo del estequiométrico, a incubaciones de un lado granular aumenta hasta 7 veces la velocidad de conversión de tetra-cloruro de carbono y además, permite una mayor producción de cloruro a partir de este contaminante. Lo anterior indica que las quinonas contribuyen a aumentar no solamente la velocidad de conversión de compuestos clorados, sino también, el grado de mineralización.

Otro tipo de contaminantes que pueden ser convertidos aceleradamente por medio del humus o compuestos análogos (quinonas) son los colorantes tipos azo. Debido a que el enlace $-N=N-$ es muy electrofílico se requiere de condiciones reductoras para poder convertir este tipo de colorantes a sus correspondientes aminas aromáticas. La reducción del enlace azo ocurre muy lentamente en muchos tipos de colorantes azo por lo que se requiere de la aplicación de sustancias húmicas, como acarreadores de electrones, para acelerar el proceso decolorante. La reducción de varios colorantes azo a sus aminas aromáticas es acelerada por medio de la adición de diferentes quinonas a cultivos bacterianos de *Sphingomonas sp.* BN6, usando glucosa como fuente de electrones (Kudlich et al, 1997).

A partir de este descubrimiento, se ha probado la eficiencia de diferentes quinonas en la decoloración de diferentes colorantes azo en reactores de tratamiento de aguas residuales. Los estudios muestran que es posible lograr un proceso decolorante eficiente aún cuando se opera a tiempos de residencia hidráulicos de 2 horas. Estos resultados tienen importantes implicaciones en el tratamiento de aguas residuales de la industria textil (Cervantes et al, 2001).

Los compuestos aromáticos que contienen uno o más grupos $-nitro$ (nitroaromáticos) son otro grupo de contaminantes que requieren de condiciones reductoras para poder ser convertidos. Como en los casos anteriores, la aplicación de diferentes sustancias húmicas a sistemas de conversión a permitido aumentar hasta 500 veces la velocidad de reducción del grupo $-nitro$ al correspondiente grupo $-amino$ (Dunnivant et al, 1990; Schwarzenbach et al, 1990).

En todos estos casos en los que se ha demostrado el papel catalítico del humus, no fue necesario adicionar las sustancias húmicas en abundancia ya que durante el transporte de electrones, las quinonas son recicladas infinitas veces (Figura 2).

2.3.2 Riboflavina.

La riboflavina o vitamina B₂, está formada por un anillo heterocíclico de isoaloxazina combinado con una molécula del azúcar-alcohol ribitol, derivado de la ribosa. Normalmente se encuentra fosforilada integrando el dinucleótido de flavina y adenina (FAD), o como mononucleótido (FMN); ambos funcionan como coenzimas del grupo de enzimas llamadas flavoproteínas que regulan los procesos de transferencia de hidrógenos en reacciones de oxidorreducción de aminoácidos y de otros compuestos. La riboflavina es sintetizada por todas las plantas y muchos microorganismos, pero no por los animales superiores (Lehninger, 1978).

En sistemas modelo de soluciones ácidas o neutras, la riboflavina pierde su cadena de ribitol y se transforma en lumicromo, sustancia que tiene fluorescencia azul, mientras que a pH alcalino se fotooxida a lumiflavina; ambas flavinas carecen de actividad biológica (Badui, 1999).

En la Figura 3 se muestra la estructura química de la riboflavina, así como sus derivados FAD (flavín-adenín-dinucleótido) Y FMN (flavín-mononucleótido).

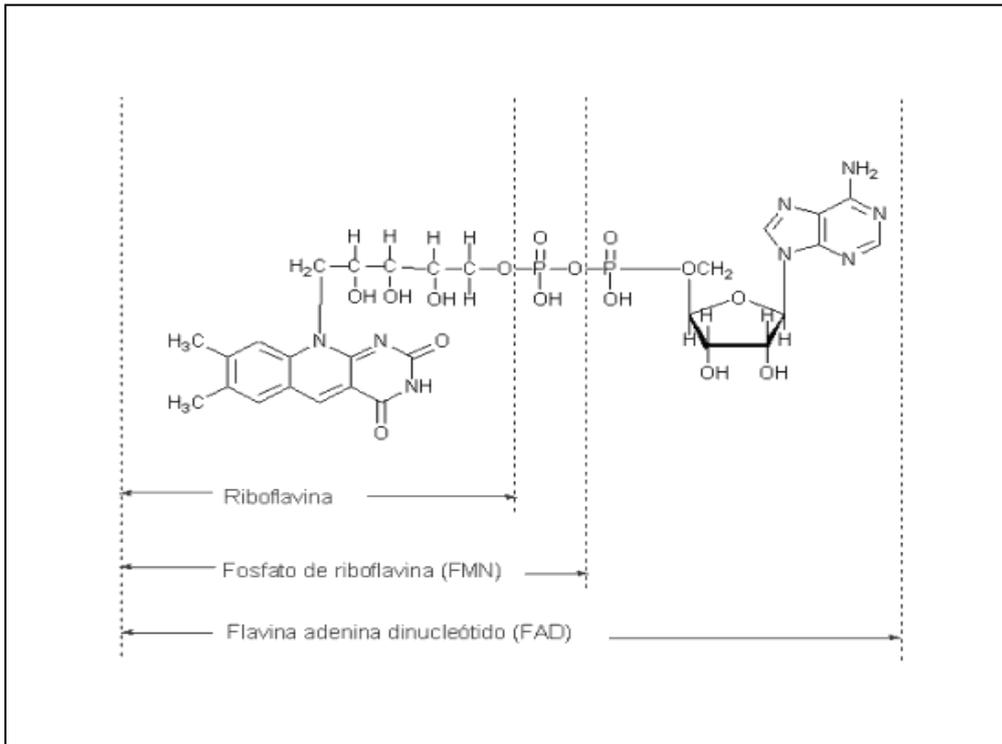


Figura 3. Estructura de la riboflavina (Montgomery, 1991).

Field et al (2003) señalan que los colorantes azo son contaminantes prioritarios que son generados en la industria textil, los cuales son considerados tóxicos y cancerígenos. Varios estudios indican que el principal factor limitante para la reducción de los colorantes azo por lodos anaeróbicos, es la transferencia de electrones, pues ésta se lleva a cabo muy lentamente. A fin de acelerar la reducción de estos colorantes, la adición de mediadores redox puede ser considerada. Además de las quinonas, las flavinas son cofactores enzimáticos implicados también en la reducción de colorantes azo. El FAD y FMN son productos químicos con un alto costo, lo cual presenta una desventaja para ser utilizados en el tratamiento de efluentes; sin embargo la riboflavina es una vitamina factible la cual puede ser introducida en dichas

aguas, a bajas concentraciones para estimular la reducción de los colorantes azo durante el tratamiento anaeróbico.

En la Figura 4, se muestra la reducción de un colorante azo por la riboflavina.

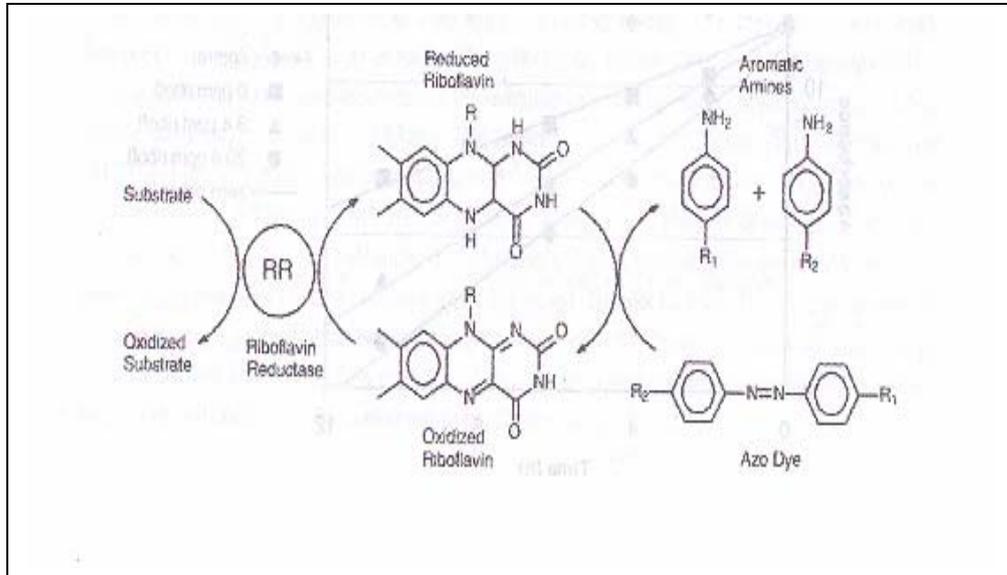


Figura 4. Reducción de colorantes azo por la riboflavina. La riboflavina oxidada, es reducida con la participación de la enzima riboflavina reductasa. La riboflavina reducida reacciona químicamente con el colorante azo, convirtiéndolo en aminas aromáticas (Field y Brady, 2003).

2.4 Inmovilización de mediadores redox

La inmovilización ha sido satisfactoria en la investigación de la estructura, actividad catalítica y otras propiedades de proteínas, ácidos nucleicos y otras macromoléculas, pero en el caso de las sustancias húmicas existen muy pocas publicaciones (Klavins et al 1997).

Han surgido pocas investigaciones referentes a la inmovilización de humus o análogos de éste, y las que se han llevado a cabo se enfocan a estudios de sorción. Prado et al (2002) describen la utilización de sílica gel modificado con 3-aminopropiltrimetoxisilano como una matriz para la inmovilización de ácidos húmicos, con el fin de discutir la capacidad de sorción de este compuesto hacia iones metálicos pesados y contaminantes orgánicos como plaguicidas.

Armon et al (2000) señalan que las matrices sol-gel han sido exitosamente usadas para atrapar varios tipos de biomoléculas, como son las enzimas, células, anticuerpos y otras proteínas. Una solución que contiene la molécula deseada es introducida en una mezcla de polimerización. Cuando la polimerización se completa, la molécula atrapada es enredada en la red del polímero orgánico.

Objetivos semejantes buscaron Klavins y Apsite (1997) al inmovilizar sustancias húmicas en poliacrilamida, copolímeros de estireno-divinilbenzeno, celulosa y epoxipropilsilica, comparando la matriz más adecuada para este fin. Sin embargo, estas investigaciones no se dirigen al estudio de un tratamiento para aguas residuales en la que la sustancia inmovilizada reaccione con el contaminante presente en dicha agua, y ocasione la reducción de éste y por lo tanto la disminución de la contaminación y del impacto ambiental.

La silicagel y la celulosa son matrices que se han utilizado para inmovilizar sustancias húmicas, Klavins y Apsite (1997) indican que los grupos funcionales predominantes en las sustancias húmicas son los grupos hidroxilos, los cuales reaccionan con los grupos epóxidos que adquiere la celulosa y la silicagel al ser preparadas con diferentes reactivos. Esta reacción no es beneficiosa para el tratamiento de efluentes industriales, debido a que los grupos hidroxilos son la parte catalítica del humus (antraquinona) y por lo tanto son los grupos que van a reaccionar con el contaminante para reducirlo. Si estos grupos quedan

enlazados con la matriz no es posible que surja la reacción deseada, por esta razón las matrices antes mencionadas no fueron seleccionadas en esta investigación.

En el caso de la riboflavina, Pereira et al (2003) señalan que ésta ha sido inmovilizada usando como soportes zeolitas, fosfato zirconio y sílica modificado con metales óxidos (Ti, Zr, Nb, V) en contacto con electrodos químicamente modificados para el uso en electroanálisis y desarrollo de sensores y biosensores.

Jímenez (2002) indica que la poliacrilamida es un polímero neurotóxico que afecta las células germinales y da lugar a un deterioro de la función reproductora, además es un carcinógeno genotóxico. La elección de esta matriz fue descartada, pues el objetivo en el tratamiento de aguas residuales, es disminuir los contaminantes presentes en ésta, no aumentarlo.

En el caso de la utilización de carbón activado como matriz para la inmovilización de mediadores redox, no existe bibliografía que describa su aplicación, por tal razón se ve la necesidad de experimentar la aplicación de una nueva matriz, dirigida al tratamiento de aguas residuales para comprobar su viabilidad y que su aplicación no repercuta en gran medida en los costos.

III. MÉTODO

El trabajo experimental se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto Tecnológico de Sonora, *campus* Centro, en el laboratorio de codesarrollo durante el periodo Diciembre 2004-Febrero-2005.

3.1 Materiales

Espectrofotómetro, Centrifuga, agitador magnético, baño María con agitación, autoclave, cámara de gases N_2/CO_2 , 60 frascos, 60 tapones de goma, selladora, 5 Vasos de precipitados, 2 matraces volumétricos de 50 ml, 2 micropipetas (100 μ L y 5000 μ L), 1 probeta de 50 ml, 1 espátula, 2 matraces erlenmeyer de 1000 ml, 18 tubos de ensaye, 1 gradilla, jeringas estériles de 1 y 3 ml, carbón activado, 2,6-disulfonato de antraquinona (AQDS), riboflavina, azul directo 71 0.3 mM (AD71), $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$, ácido ascórbico,

NH_4Cl , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, bicarbonato de sodio, elementos traza, glucosa, lodo anaerobio.

3.2 Metodología

Para realizar la inmovilización de mediadores redox en carbón activado se llevaron a cabo las siguientes etapas:

3.2.1 Preparación de soluciones

Se preparó una solución de fosfatos, 10.86 g/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 5.38 g/l de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. 50 ml de dicha solución y 50 mg de carbón activado fueron incorporadas a 36 botellas de 100 ml, (18 para cada tratamiento).

Se prepararon además soluciones de AQDS y riboflavina, cuyas concentraciones corresponden en mg/l a 0, 25, 50, 75, 100 y 150. Estas concentraciones por separado fueron adicionadas a los frascos que previamente se les agregó la solución de fosfatos y carbón activado. Se llevaron a cabo dos tratamientos, uno con riboflavina y otro con AQDS. Para asegurar la confiabilidad de los resultados de la experimentación, el análisis se realizó por triplicado. Las botellas con los respectivos tratamientos, fueron selladas y llevadas a un sistema de agitación (170 rpm), durante 24 horas a una temperatura de 30°C.

3.2.2 Elaboración de una curva de calibración

Se realizó una curva de calibración de los mediadores redox, para obtener la ecuación de la recta y de esta forma aplicarla en la realización del isoterma de adsorción (Figura 5).

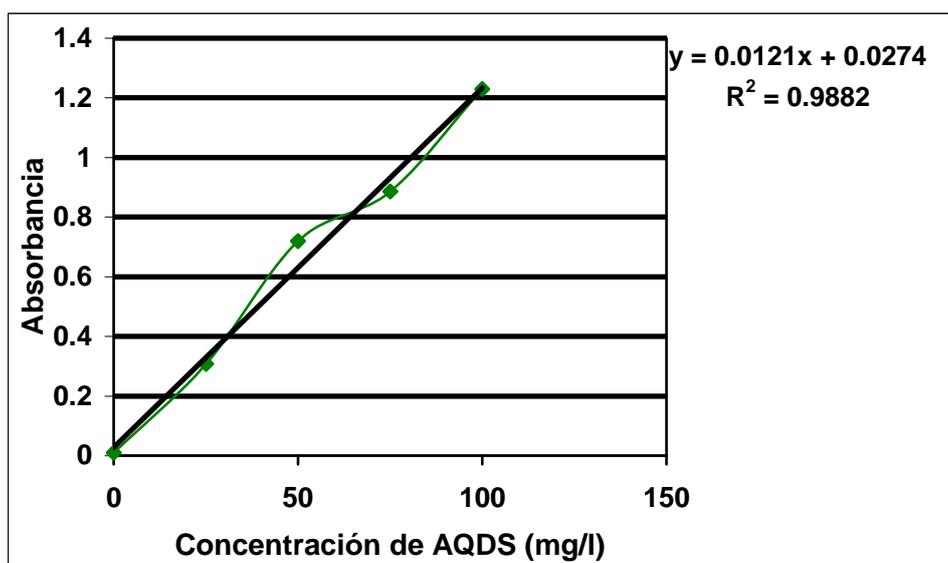


Figura 5. Curva de calibración de AQDS ($\lambda=340$)

3.2.3 Elaboración del isoterma de adsorción en carbón activado

Para comprobar que la retención del mediador redox se estaba llevando a cabo, se elaboró un gráfico o isoterma de adsorción.

A un tiempo transcurrido de 12 horas, mediante la utilización de una jeringa, se obtuvo 1 ml de muestra de cada tratamiento y de cada concentración. A dichas muestras se realizó un análisis espectrofotométrico, midiendo sus absorbancias. Para el caso del AQDS se empleó una longitud de onda de 340 nm y para la riboflavina 376 nm. El procedimiento del análisis espectrofotométrico se realizó de la misma manera a las 24 horas.

La elaboración del isoterma se realizó, graficando en ordenadas la capacidad de adsorción del carbón, es decir los mg de mediador inmovilizado por cada gramo de carbón activado (mg/g) y en las abscisas la concentración final en equilibrio (mg/l). Con la realización de este isoterma se eligió la concentración óptima de mediador redox a utilizar para la inmovilización.

3.2.4 Reducción del colorante azul directo 71 (AD71), mediante mediadores redox inmovilizados

Se prepararon cinco tratamientos para la degradación del colorante, 1) con lodo, 2) con carbón activado (CA) y lodo, 3) con carbón activado, lodo y riboflavina, 4) con carbón activado, lodo y AQDS y 5) con una mezcla de ambos mediadores, con carbón activado y lodo. Para una mejor confiabilidad de los resultados, el análisis se realizó por triplicado, utilizando un total de 15 botellas.

Se agregaron 50 ml de una solución de fosfatos a los frascos con los mediadores redox, con la finalidad de que el proceso de inmovilización se llevara a cabo. Las botellas fueron preincubadas en baño maría a 30°C y en agitación por 24 h para favorecer la inmovilización de los mediadores redox.

Transcurridas las 24 horas, se abrieron las botellas y se decantó la solución de fosfatos, haciendo un lavado al complejo inmovilizado.

Previamente se preparó un medio basal compuesto por una concentración en mg/l de NH_4Cl (280), K_2HPO_4 (250), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (100), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10), bicarbonato (5000) y 1 ml/l de elementos traza. Se adicionaron 50 ml de este medio a 15 botellas y el complejo inmovilizado (CA-mediador redox) y 1 g SSV/l (0.845 g). Las botellas fueron rápidamente selladas y llevadas a la cámara de gases para flujarlas con una mezcla de N_2/CO_2 en un transcurso de 3 minutos, para crear un ambiente anaerobio. Se agregaron las cantidades en equilibrio de AQDS y riboflavina según el tratamiento y como sustrato 1g DQO/l de glucosa, lo cual equivale a 106.7 g de glucosa/l.

Ya transcurridas las 24 horas se agregaron a las 15 botellas 1 g de DQO/l de glucosa y posteriormente el colorante AD71 (.3 mM) mediante el uso de una jeringa.

Se preparó además un control estéril, conteniendo carbón activado, riboflavina y AQDS. Este control se realizó en condiciones asépticas, esterilizando mediante el empleo de un filtro estéril el colorante, la glucosa y los mediadores redox.

A las 4 horas de haber adicionado el colorante se tomó 1 ml de muestra de cada tratamiento y éstas fueron analizadas mediante la utilización de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 579 nm.

El análisis se realizó cada 4 horas en un periodo de 2 días.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo experimental se presentan a continuación.

4.1 Inmovilización de AQDS en carbón activado

Para verificar que el proceso de inmovilización estaba aconteciendo, se analizó la cantidad de mediador presente en la solución (fosfatos) expuesta al carbón activado. Sugiriendo que entre menor cantidad de mediador se encuentre presente en dicha solución, mayor cantidad de éste es retenido en el carbón. Las medidas de las concentraciones presentes en dicha solución se realizaron

en un espectrofotómetro, mediante la lectura de su absorbancia. Los resultados de estas lecturas se muestran en la Figura 6.

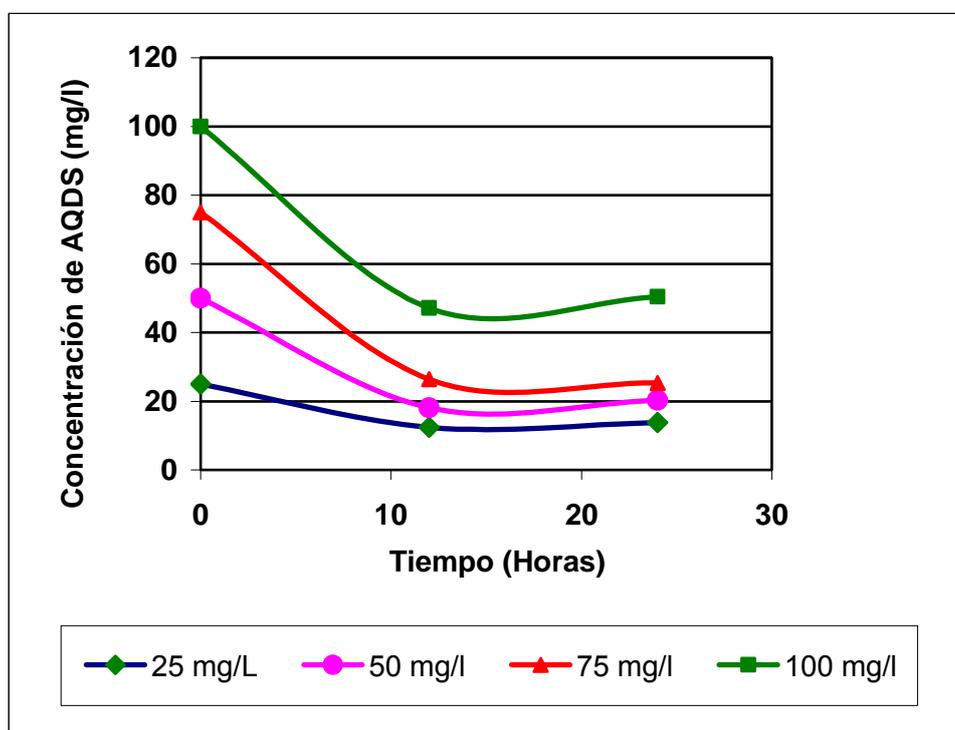


Figura 6. Adsorción de 2,6-disulfonato de antraquinona (AQDS), en carbón activado.

Como puede observarse en la Figura 6, la adsorción de AQDS en carbón activado aumentó cuando se incrementó la concentración del catalizador, pues las concentraciones utilizadas inicialmente disminuyeron de acuerdo el paso del tiempo y a partir de las 12 horas la adsorción se mantuvo constante.

Para conocer la capacidad de adsorción del carbón activado hacia estos mediadores redox y su afinidad, se elaboró una isoterma de adsorción del modelo propuesto por Freundlich, y para poder realizarlo fue necesario obtener una serie de datos que se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Valores requeridos para realizar un isoterma de adsorción de AQDS en carbón activado

Co (mg/l)	Ce (mg/l)	x (mg)	m (g)	x/m (mg/g)
25	8.47	16.53	.05	330.60
50	15.83	34.17	.05	683.40
75	23.85	51.15	.05	1023
100	32.198	67.80	.05	1356

Co: Concentración inicial; Ce: concentración en equilibrio;

x: Co-Ce (cantidad adsorbida); m; gramos de carbón activado;

x/m: mg de AQDS inmovilizado por gramo de carbón activado.

Metcalf y Eddy (1996) mencionan que la isoterma de Freundlich es una de las formulaciones más empleadas para describir las características del carbón activado empleado en el tratamiento de aguas residuales y se deriva a partir de consideraciones empíricas de la siguiente manera:

$$x/m = K \cdot C_e^{1/n}$$

Van der Zee (2002) señala que este tipo de isotermas muestran la afinidad del carbón activado para adsorber ciertas sustancias. La isoterma de adsorción de AQDS en carbón activado se puede observar en la figura 7, en la que se muestra una amplia afinidad de dicho mediador redox hacia el carbón.

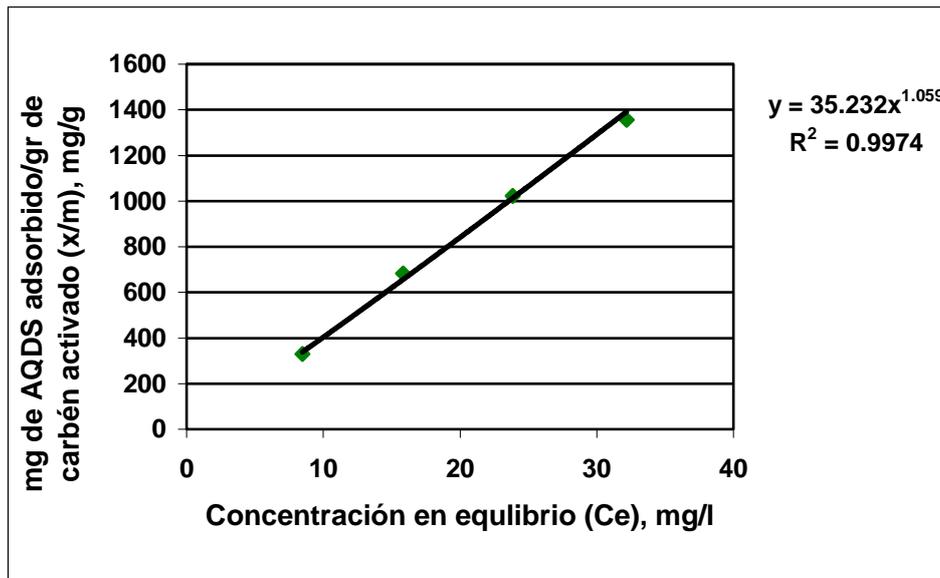


Figura 7. Isoterma de adsorción de AQDS en carbón activado, modelo de Freundlich.

En la Figura 7, se presenta que la mayor cantidad de AQDS adsorbida fue de 1356 mg/g de carbón activado, esta cantidad fue elegida para los estudios posteriores con el tratamiento del colorante.

Los resultados de la adsorción de riboflavina, resultaron negativos debido a que presentó muy poca afinidad hacia el carbón activado, repercutiendo notablemente en el proceso de inmovilización, por lo tanto los resultados obtenidos en éste experimento no son presentados.

Con los resultados anteriormente presentados, se denota que la inmovilización de mediadores redox se llevó a cabo, utilizando AQDS, pues presentó mayor afinidad hacia el carbón que la riboflavina; sin embargo, el paso siguiente fue comprobar un eficaz acomodamiento de los grupos reactivos de ésta molécula que permitiera la reducción de los contaminantes.

4.2 Reducción del colorante AD71

Para comprobar la eficiencia de la inmovilización, se trabajó con un compuesto modelo (azul directo 71), que en presencia de un consorcio de microorganismos anaerobios y del mediador inmovilizado en el carbón activo permitiera la biodegradación reductiva de este colorante. Los resultados de esta experimentación se muestran en la figura 8, en un modelo de primer orden (\ln absorbancia medida/absorbancia en tiempo inicial), para estimar el índice de reducción del colorante.

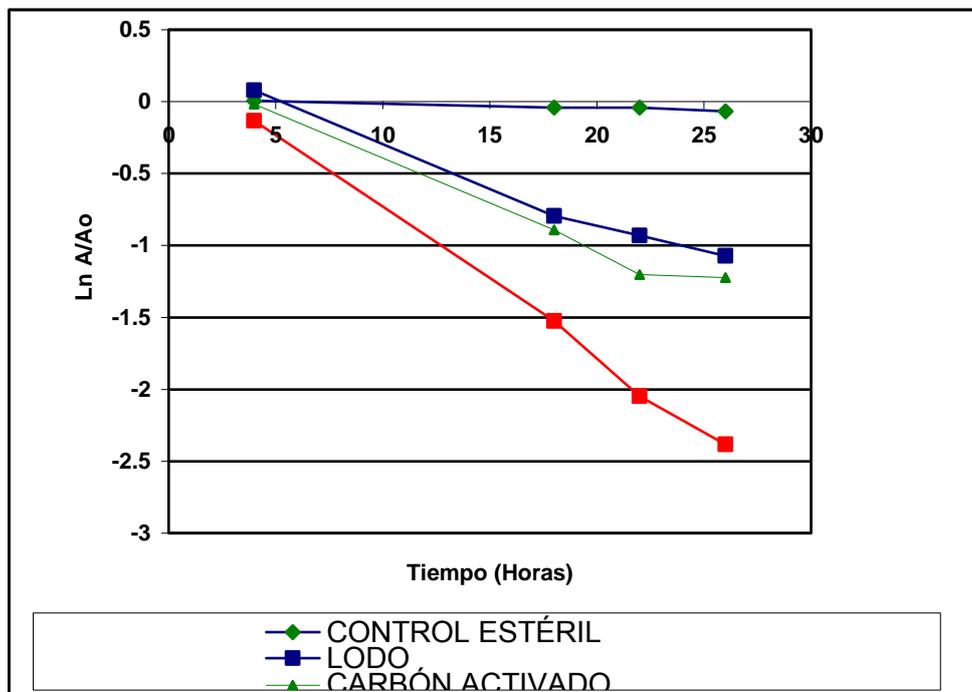


Figura 8. Reducción del colorante azo AD71 (medido a una longitud de onda de 579 nm), por un lodo anaerobio en ausencia y presencia de AQDS inmovilizado en carbón activado. El control estéril no contiene lodo.

La Figura 8 muestra que la reducción del colorante es acelerada cuando se incluye el AQDS, previamente inmovilizado en carbón activado, en el medio de cultivo. Por lo tanto, los resultados sugieren que los grupos quinona quedaron disponibles, después de la inmovilización, para llevar a cabo la reacción catalítica. Los resultados originados en esta figura indican también, que los datos obtenidos en el control estéril permanecieron constantes, lo cual confirma la ausencia de algún mecanismo abiótico que intervenga en la reducción del colorante. En el caso del tratamiento con lodo, sin la participación de AQDS como mediador redox, la reducción del tinte se llevó a cabo, pero en niveles por debajo de los que se obtuvieron en la presencia de éste. Por otra parte, cuando se incluyó solamente carbón activado (sin AQDS) en el medio de cultivo con lodo, se observó un ligero aumento en la velocidad de decoloración. Lo anterior puede ser explicado por los resultados publicados por van der Zee *et al.* (2002) quienes encontraron que el carbón activado tiene también propiedades catalíticas redox, lo cual puede acelerar reacciones de óxido-reducción.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La inmovilización de mediadores redox es una alternativa que puede ser empleada en el tratamiento de aguas residuales, ya que éstos pueden ser reutilizados, sin la necesidad de agregarlos continuamente a los reactores anaerobios.

Los resultados obtenidos presentarán en gran medida un beneficio importante en la aplicación y en el diseño de biorreactores para el tratamiento de aguas residuales conteniendo contaminantes electrofílicos, como son los colorantes azo, y posiblemente aplicarse en otro tipo de compuestos como los nitroaromáticos, compuestos polihalogenados, metales, entre otros.

De los mediadores redox empleados (AQDS y riboflavina) en esta investigación, el modelo AQDS presenta mayor afinidad hacia el carbón activado, por lo que pueden utilizarse en el tratamiento de aguas residuales que contengan compuestos recalcitrantes como son los colorantes azo, mediante la técnica de inmovilización, presentándose la ventaja de poder ser reutilizado. Además el carbón activado presenta una propiedad bifuncional, pues sirve como matriz para el proceso de inmovilización, así como jugar un papel catalítico en la reducción de contaminantes prioritarios.

Sin duda los colorantes con grupos azo presentan un gran impacto ecológico, por lo que con este tratamiento se podrá reducir dicho colorante a aminas aromáticas (decoloración), más sin embargo resulta indispensable continuar con un tratamiento aerobio para la mineralización de estas aminas y de este forma colaborar en gran medida en la disminución de la contaminación.

Se recomienda dar seguimiento a esta investigación, debido a que solo estos experimentos realizados demuestran la inmovilización, sin embargo es importante continuar con el diseño de un biorreactor anaerobio que implemente esta técnica, para poder ser utilizado a nivel industrial, cumplir con las normas oficiales mexicanas y contribuir al desarrollo sustentable.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Armon R., Zolkov Ch., Laor Y (2000). Entrapment of Humic Acid in a Sol-gel Matrix, A New Tool for Sorption Studies. **Journal Sol-Gel Science and Technology** **19**: 95-100

Arroyo Miguel (1998). Inmovilización de enzimas: Fundamentos, métodos y aplicaciones. **Ars Pharmaceutica** **39:2**; 23-39.

Badui Salvador (1999). Química de los alimentos. Editorial Longman. México.

Baker R. (1992). Chromatographic Evaluation of Carbon. **Journal American Water Works** **56**: 92-98.

Cervantes Francisco (2002). Quinonas como aceptores de electrones y mediadores redox en la biotransformación de contaminantes prioritarios. Tesis doctoral. Wageningen

Cervantes, F. J., Dijkma, W., Duong-Dac, T., Ivanova, A., Lettinga, G. and Field, J. A. (2001) Anaerobic mineralization of toluene by enriched sediments with quinones and humus as terminal electron acceptors. **Appl. Environ. Microbiol.** **67**: 4471-4478.

Cervantes, Van der Zee, Lettinga y Field (2001). Enhanced decolourisation of acid orange 7 in a continuous UASB reactor with quinones as redox mediators. **Water Science and Technology.****44**:123-128

Dunnivant, F., Schwarzenbach R. and Macalady D. (1992) Reduction of substituted nitrobenzenes in aqueous solutions containing natural organic matter. **Environ. Sci. Technol.** **26**:2133-2142.

Enkerlin Ernesto et al., (1997). Ciencia ambiental y desarrollo sostenible. Editorial Internacional Thomson. México.

Field Jim y Brady J. (2003). Riboflavin as a mediator accelerating the reduction of the azo dye Mordant Yellow 10 by anaerobic granular sludge. **Water Science and Technology** **48:6**; 187-193.

Field, J. A., Cervantes, F. J., van der Zee, F. P. and Lettinga, G. (2000) Role of quinones in the biodegradation of priority pollutants. **water Sci. Technol.** **42**: 215-222.

Gordon, Maskew, Geyer, Alexander (1971). Purificación de aguas y tratamiento y remoción de aguas residuales. Editorial Limusa. México.

Jiménez Blanca (2002). La contaminación ambiental. Editorial Limusa. México D.F.

Klavins Maris y Apsite Elga (1997). Immobilization of Humic Substances. **Polish Society of Humic Substances, Grunwaldzka** **53**:50-357

Kudlich, M., Keck, A., Klein, J. and Stolz, A. (1997) Localization of the enzyme system involved in anaerobic reduction of azo dyes by *Sphingomonas* sp. Strain BN6 and effect of artificial redox mediators on the rate of azo dye reduction. **Appl. Environ. Microbiol.** **63**:3691-3694.

Lehninger Albert (1978). Bioquímica, las bases moleculares de la estructura y función celular. Editorial ediciones Omega. España.

Madigan Michael, Martinko y Parker (2004). Biología de los microorganismos. Editorial Pearson Prentice Hall. Madrid, España.

Metcalf y Eddy (1996). Ingeniería aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización. Volumen 2. editorial McGRALL-HILL. México.

Montgomery, Conway, Spector (1991). Bioquímica, casos y texto. Editorial Mosby-year Book wolfe publishing. España.

Novaro Octavio (1998). Contaminación. Editorial el Colegio Nacional. México.

Prado A., Sales J., Airoidi C. (2002). The increased Stability Associated with Humic Acid Anchored Onto Silica Gel. **Journal of Thermal Analysis Calorimetry 70**: 191-197.

Pereira A., De Santos A., Kubota L, (2003). Electrochemical behaviour of riboflavin immobilized on different matrices. **Journal of colloid and interface Science 265**:351-358

Schwarzenbach, R., Stierli, R., Lanz, K. and Zeyer, J. (1990) Quinone and iron porphyrin mediated reduction of nitroaromatic compounds in homogeneous aqueous solution. **Environ. Sci. Technol. 24**:1566-1574.

Scriban René (1985). Biotecnología. Editorial Manual Moderno. México D.F.

Stevenson F.J. (1994). Humus Chemistry. Génesis, Composition, Reactions. Segunda edición. Editorial Wiley. Nueva York.

Van der Zee, Bisschops, Lettinga y Field (2002). Activated carbon as redox mediator and electron acceptor during the anaerobic biotransformation of azo dyes. **Submitted**. 83-95

<http://www.tecnicasdeinmovilizacion.com.htm>