



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA

“Inmovilización de *Rhizopus oryzae* ENHE”

T E S I S

Para obtener el grado de:
Maestro en Biotecnología

P R E S E N T A :
IBI. Héctor Hugo León Santiesteban

DIRECTORA:

Dra. Araceli Tomasini Campocosio

ASESORES:

Dra. Mónica Alicia Meraz Rodríguez

Dr. Kazimierz Wrobel Zasada

MEXICO, D.F.

Enero 2010

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de **Ingeniería Genética y Metabolismo Secundario** del Departamento de Biotecnología, perteneciente a la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Este trabajo fue financiado por el **CONACyT**, a través de la beca de maestría No. 12180

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados de **CONACyT**, y además cuenta con el apoyo del mismo consejo, con el número de registro **0471-0**”

Iztapalapa, D.F. a 28 de enero del 2010

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

“Inmovilización de *Rhizopus oryzae* ENHE”

Que presentó
Héctor Hugo León Santiesteban

Comité Tutorial:

Directora: Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Asesora: Dra. Mónica Alicia Meraz Rodríguez

Asesor: Dr. Kazimierz Wrobel Zasada

Jurado:

Presidente: Dr. Sergio Revah Moiseev

Secretaria: Dra. Mónica Alicia Meraz Rodríguez

Vocal: Dr. Kazimierz Wrobel Zasada

Vocal: Dr. Alejandro Coreño Alonso

**No basta saber, se debe también aplicar; no es
suficiente querer, se debe también hacer**

Johann Wolfgang von Goethe

Dedicatoria

No puedo cambiar la dirección del viento, pero sí ajustar mis velas para llegar siempre a mi destino (James Deam)

... gracias a Ustedes,

Mi Familia

A mis Padres:

Martha Alicia Santiesteban Meza y José Guillermo León Lara

Por haberme apoyado en esta gran aventura con su dedicación y amor, y por creer un poco más en mí.

A mis Abuelos:

Margarita Lara Machuca, Rosenda León Contreras y Ardelio León Contreras

Por impulsarme a seguir adelante, darme fuerza para nunca rendirme, y por confiar en mí como nadie en el mundo.

A mis Hermanos:

Ana Laura León Santiesteban y Guillermo León Santiesteban

Por el cariño que me tienen, y por alegrarme esas largas horas de frustración.

A mis Tíos:

Sofía, Hugo, Carlos, Silvia, José Luis y Patricia

Por su amor incondicional, que siempre me demuestran.

A mis Primos:

Tsou-San-Li (Susana), Osmar, Yael, Beto, Nadia, Paty y Pepe

Por su agradable y placentera compañía, que me distrajo de mis problemas y me llenó de alegrías.

Y a Jenny (La Cacha):

Por desvelarse conmigo en esas largas noche de estudio.

Agradecimientos

Cuando bebas agua, recuerda la fuente (Proverbio Chino)

A la Dra. Araceli Tomasini Campocosio por dirigir esta tesis y confiar en mí para sacar adelante este proyecto.

Al Dr. Kazimierz Wrobel Zasada por su gran apoyo, consejos, hospitalidad y amistad que me brindo en mi estancia en el Instituto de Investigaciones Científicas de la Universidad de Guanajuato.

A la Dra. Mónica Alicia Meraz Rodríguez por su disposición e invaluable aportaciones en la revisión de esta tesis.

Al Dr. Alejandro Coreño Alonso por su amistad y consejos para el mejoramiento de esta tesis.

Al Dr. Sergio Revah Moiseev por su detallada revisión de esta tesis y por sus invaluable aportaciones para mejorar la calidad de este documento.

A la M. en B. Alma Lilia Toledo Cervantes por todas aquellas horas de estudio e inolvidables momentos de alegría que pasamos juntos a lo largo de dos años.

A la M. en B. Arisai del Carmen Hernández Samano por su apoyo y amistad que me ha acompañado desde hace muchos años.

A la M. en C. Maura Téllez por su amistad y por todos esos momentos divertidos que pasamos compartiendo la mesa de trabajo.

A mis amigos del laboratorio: Tania, Sandra, Roxana, Jessica, Ara, Mariel, Jaime, Omar, Ana, Victoria, Karla, Cristian y Octavio, por su amistad.

Índice general

Índice de tablas.....	X
Índice de figuras.....	XI
Índice de gráficos.....	XII
Abreviaturas y acrónimos.....	XIII
Resumen.....	XVI
Abstract.....	XVII
1 Introducción.....	1
1.1 Pentaclorofenol (PCF).....	1
1.2 Características Físicas y Químicas del PCF.....	2
1.3 Usos del PCF.....	3
1.4 Fuentes de contaminación de PCF, liberación al medio ambiente y exposición a los seres humanos.....	4
1.5 Toxicidad del PCF.....	6
1.5.1 Efectos en la salud humana.....	6
1.5.2 Interpretación bioquímica de la toxicidad del PCF.....	6
1.6 Soportes sintéticos.....	8
1.6.1 Espuma de poliuretano (PUF).....	8
1.6.2 Fibra de poliamida.....	9
1.6.3 Principales propiedades y usos de los soportes sintéticos.....	9
1.7 Adsorción.....	10
1.8 Cinética de adsorción.....	12
1.8.1 Cinética de adsorción de Pseudo-primer orden.....	12
1.8.2 Cinética de adsorción de Pseudo-segundo orden.....	13
1.9 Isotermas de adsorción.....	15
1.9.1 Isoterma de Freundlich.....	15
1.9.2 Isoterma de Langmuir.....	16
1.10 Inmovilización de microorganismos con fines de biorremediación.....	18
2 Antecedentes.....	21
3 Justificación.....	22
4 Hipótesis.....	23
5 Objetivos.....	23
5.1 Objetivo general.....	23

5.2	Objetivos particulares.....	23
6	Materiales y métodos.....	24
6.1	Soportes sintéticos.....	24
6.2	Cinéticas de adsorción de PCF en PUF y fibra de nylon.....	24
6.3	Isotermas de adsorción de PCF en PUF y fibra de nylon.....	25
6.4	Microorganismo.....	26
6.5	Propagación y conservación de <i>R. oryzae</i> ENHE.....	26
6.6	Concentración de esporas de <i>R. oryzae</i> ENHE.....	26
6.7	Medios de cultivo.....	26
6.7.1	Medio Merlin-Norkrans (M-N).....	26
6.7.2	Medio de cultivo empleado para la inmovilización de <i>R. oryzae</i> ENHE.....	27
6.8	Condiciones de cultivo para la inmovilización de <i>R. oryzae</i> ENHE.....	27
6.8.1	Crecimiento en cultivo sumergido.....	27
6.8.2	Crecimiento en los soportes de inmovilización.....	27
6.9	Observaciones morfológicas del crecimiento de <i>R. oryzae</i> ENHE inmovilizado en PUF y fibra de nylon.....	27
6.10	Efecto de la concentración de PCF sobre el crecimiento de <i>R. oryzae</i> ENHE en fibra de nylon.....	28
6.11	Remoción de PCF en cultivo sumergido con <i>R. oryzae</i> ENHE inmovilizado en fibra de nylon saturada con PCF.....	29
6.12	Técnicas analíticas.....	29
6.12.1	Retención de agua de los soportes sintéticos.....	29
6.12.2	Estimación de Biomasa.....	30
6.12.2.1	Determinación de crecimiento por el método de glucosamina.....	30
6.12.3	Curvas patrón de glucosamina.....	31
6.12.3.1	Curva patrón de glucosamina comercial.....	31
6.12.3.2	Curva patrón de glucosamina de la pared celular del micelio de <i>R. oryzae</i> ENHE....	32
6.12.3.3	Cinética de crecimiento de <i>R. oryzae</i> ENHE en cultivo sumergido.....	32
6.12.4	Extracción de PCF.....	32
6.12.4.1	Extracto directo.....	32
6.12.4.2	Extracto de biomasa.....	32
6.12.5	Cuantificación de PCF residual.....	33
7	Resultados.....	34
7.1	Retención de agua de los soportes sintéticos.....	34
7.2	Adsorción del PCF en PUF y fibra de nylon.....	34

7.2.1	Cinética de adsorción de PCF en PUF y fibra de nylon.....	34
7.2.1.1	Cinética de adsorción de PCF en PUF.....	35
7.2.1.2	Cinética de adsorción de PCF en fibra de nylon.....	36
7.2.2	Isotermas de adsorción de PCF en PUF y fibra de nylon.....	38
7.2.2.1	Isoterma de adsorción de PCF en PUF.....	40
7.2.2.2	Isoterma de adsorción de PCF en fibra de nylon.....	41
7.3	Observaciones morfológicas del crecimiento de <i>R. oryzae</i> ENHE inmovilizado en PUF y fibra de nylon.....	43
7.3.1	Crecimiento de <i>R. oryzae</i> ENHE en PUF.....	44
7.3.2	Crecimiento de <i>R. oryzae</i> ENHE en fibra de nylon.....	45
7.4	Estimación de Biomasa.....	46
7.4.1	Efecto de la concentración de PCF sobre el crecimiento de <i>R. oryzae</i> ENHE en fibra de nylon.....	47
7.5	Remoción de PCF en cultivos sumergidos con <i>R. oryzae</i> ENHE inmovilizado en fibra de nylon saturada con PCF.....	48
8	Discusión.....	50
9	Conclusiones.....	56
10	Referencias.....	57

Anexos

Anexo A	Curva de calibración de PCF cuantificada por HPLC.....	62
Anexo B	Regresión lineal de la cinética de adsorción de pseudo-primer orden de PCF en PUF y fibra de nylon.....	62
Anexo C	Gráficos de las expresiones linearizadas de las isotermas de Freundlich y Langmuir (tipo I y II) para la adsorción de PCF en PUF y su análisis estadístico de regresión lineal.....	63
Anexo D	Gráficos de las expresiones linearizadas de las isotermas de Freundlich y Langmuir (tipo I y II) para la adsorción de PCF en fibra nylon y su análisis estadístico de regresión lineal.....	66
Anexo E	Cinética de crecimiento de <i>R. oryzae</i> ENHE en cultivo sumergido.....	69
Anexo F	Curva patrón de glucosamina de la pared celular del micelio de <i>R. oryzae</i> ENHE.....	71

Índice de tablas

Tabla 1.1	Propiedades Físicas y Químicas del PCF.....	2
Tabla 1.2	Usos oficiales del PCF según la CICOPLAFEST.....	4
Tabla 1.3	Formas linearizadas de la ecuación de la isoterma de Langmuir.....	18
Tabla 6.1	Diluciones realizadas en la cinética de adsorción de PCF en fibra de nylon..	25
Tabla 6.2	Diluciones realizadas en la isoterma de adsorción de PCF en PUF.....	26
Tabla 6.3	Soportes sintéticos y concentraciones de PCF utilizadas para la observación morfológicas de <i>R. oryzae</i> ENHE inmovilizado	28
Tabla 6.4	Concentraciones finales de glucosamina comercial SIGMA.....	31
Tabla 7.1	Retención de agua del PUF y fibra de nylon.....	34
Tabla 7.2	Representaciones matemáticas de la velocidad de adsorción de Lagergren y Ho, así como, sus formas linearizadas.....	34
Tabla 7.3	Parámetros cinéticos y estadísticos de la linearización del modelo de pseudo-segundo orden en la adsorción de PCF en PUF.....	36
Tabla 7.4	Parámetros cinéticos y estadísticos de las linearizaciones de los modelos de pseudo-primero y segundo orden en la adsorción de PCF en fibra de nylon....	38
Tabla 7.5	Representaciones matemáticas de las isotermas de adsorción de Freundlich y Langmuir, así como, sus formas linearizadas.....	39
Tabla 7.6	Parámetros calculados utilizando los modelos de isotermas de adsorción de PCF en PUF.....	40
Tabla 7.7	Parámetros calculados utilizando los modelos de isotermas de adsorción de PCF en fibra de nylon.....	42
Tabla 8	Resumen de los resultados obtenidos en las cinéticas de remoción de PCF con <i>R. oryzae</i> ENHE inmóvil en fibra de nylon saturada con PCF.....	54

Índice de figuras

Figura 1.1	Molécula del PCF.....	1
Figura 1.2	Principales sub-productos del PCF.....	2
Figura 1.3	Mecanismo de reacción del desacoplamiento de la forforilación oxidativa con PCF.....	7
Figura 1.4	Mecanismo de reacción para la formación de espuma de poliuretano (PUF).....	8
Figura 1.5	Prepolímero para la síntesis de PUF a partir de toluendiisocianato, donde el grupo “B” puede ser algún poliéter o poliéster.....	8
Figura 1.6	Síntesis de nylon-6 y -6,6.....	9
Figura 1.7	Efecto de la temperatura sobre la cantidad adsorbida por adsorción simultánea física y química activada.....	11
Figura 7.1	Imágenes de <i>R. oryzae</i> ENHE inmovilizado en PUF (saturado con PCF y sin PCF) a través del tiempo. Fotografías tomadas en un microscopio de contraste de fases con un objetivo de 10x.....	44
Figura 7.2	Imágenes de <i>R. oryzae</i> ENHE inmovilizado en fibra de nylon (saturada con PCF y sin PCF) a través del tiempo. Fotografías tomadas en un microscopio de contraste de fases con un objetivo de 10x.....	45

Índice de gráficos

Gráfico 1.1	Distribución del PCF en los principales alimentos consumidos por los seres humanos.....	5
Gráfico 7.1	Efecto del tiempo de contacto sobre la adsorción de PCF en PUF, T=30°C; pH=5.3.....	35
Gráfico 7.2	Linearización del modelo cinético de pseudo-segundo orden en la adsorción de PCF en PUF.....	36
Gráfico 7.3	Efecto del tiempo de contacto sobre la adsorción de PCF en fibra de nylon, T=30±1°C; pH=5.3.....	37
Gráfico 7.4	Linearización del modelo cinético de pseudo-segundo orden en la adsorción de PCF en fibra de nylon.....	37
Gráfico 7.5	Capacidad de adsorción de PCF en PUF; T=30°C; pH=5.3.....	41
Gráfico 7.6	Capacidad de adsorción de PCF en nylon; T=30°C; pH=5.3.....	43
Gráfico 7.7	Cinéticas de crecimiento de <i>R. oryzae</i> ENHE en fibra de nylon con diferentes concentraciones de PCF.....	47
Gráfico 7.8	Cinéticas de remoción de PCF en cultivo sumergido con <i>R.oryzae</i> ENHE inmovilizado en fibra de nylon saturada con PCF.....	48

Abreviaturas y acrónimos

PAPS	3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato
4-CF	4-clorofenol
Abs.	Absorbancia
PDA	Agar Dextrosa y Papa
H ₂ O _d	Agua destilada
PVA	Alcohol polivinílico
q_e	Capacidad de adsorción en el equilibrio
q_t	Capacidad de adsorción en un tiempo t
$q_{t, cal}$	Capacidad de adsorción en un tiempo t obtenida a partir de un modelo cinético
$q_{t, exp}$	Capacidad de adsorción en un tiempo t obtenida experimentalmente
q_m	Capacidad de adsorción máxima en el equilibrio
R^2	Coefficiente de correlación
C_e	Concentración de adsorbato en el equilibrio
C_0	Concentración de PCF inicial (mg L ⁻¹)
[]	Concentración molar (mol L ⁻¹)
M	Concentración molar (mol L ⁻¹)
N	Concentración normal (número de equivalentes de soluto L ⁻¹)
k_a	Constante de adsorción de Langmuir
k_1	Constante de adsorción de pseudo-primer orden (min ⁻¹)
k_2	Constante de adsorción de pseudo-segundo orden (g mg ⁻¹ min ⁻¹)
$1/K$	Constante de disociación
K_a	Constante de disociación de un ácido
K_F	Constante de Freundlich
$\Delta q(\%)$	Desviación estándar normalizada
Desv. típ	Desviación típica ó Desviación estándar
$1/n$	Factor de heterogeneidad
R_L	Factor de separación
$n-1$	Grado de libertad
°C	Grados Celsius
g	Gramos
h	Horas
kPa	Kilo pascal

LiP	Lignina peroxidasa
L	Litros
pH	Logaritmo negativo de la concentración de H ⁺
pKa	Logaritmo negativo de la constante de disociación de un ácido
<i>m</i>	Masa del adsorbente
M-N	Medio Merlin-Norkrans
M-N 2X	Medio Merlin-Norkrans doblemente concentrado
μg	Microgramos
μm	Micrómetro
mg L ⁻¹	Miligramos por litro
mg m ⁻³	Miligramos por metro cubico
mL	Mililitros
mm de Hg	Milímetros de mercurio
min	Minutos
nm	Nanómetros
<i>q</i>	Número de moles de adsorbato unidos por mol de adsorbente
ppm	Partes por millón
PDBA	p-dimetilamino benzaldehído
PCF	Pentaclorofenol
<i>SH</i>	Peso de soporte húmedo
<i>SS</i>	Peso de soporte seco
<i>M_A</i>	Peso molar del adsorbato
<i>M_B</i>	Peso molar del adsorbente
PUF	Polyuretane Foam (espuma de poliuretano)
%	Porcentaje
% <i>R_A</i>	Porcentaje de retención de agua
RBC	Reactor de biodiscos
<i>Q_m</i>	Relación de (<i>M_A</i> / <i>M_B</i>) <i>n</i>
<i>Q</i>	Relación de (<i>M_A</i> / <i>M_B</i>) <i>q</i>
v/v	Relación volumen/volumen
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
sig.	Significancia
<i>α</i>	Significancia

<i>n</i>	Sitios de adsorción idénticos
<i>h</i>	Velocidad de adsorción ($\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$)
<i>V</i>	Volumen de solución (L)

Acrónimos

HPLC	High Performande Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta resolución)
U.S. EPA	United States Environmental Protection Agency (Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos de Norte América)
CICOPLAFEST	Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias tóxicas

Resumen

La finalidad de esta investigación fue inmovilizar al zigomiceto *Rhizopus oryzae* ENHE en un soporte sintético para estudiar la remoción de pentaclorofenol (PCF) en cultivos sumergidos. Se probaron dos soportes sintéticos: espuma de poliuretano (PUF), y fibra de nylon. Debido a que los dos soportes sintéticos retienen por si solos PCF, fue necesario caracterizar la sorción de PCF con el fin de cuantificar correctamente el PCF removido por el hongo. Los resultados cinéticos experimentales mostraron que la sorción de PCF en PUF y en fibra de nylon se ajusta al modelo cinético de pseudo-segundo orden. En el PUF el PCF alcanzó un equilibrio de sorción en aproximadamente 2 h, mientras que la fibra de nylon alcanzó el equilibrio de sorción en aproximadamente 5 días. Después de determinar cuánto tiempo toma alcanzar el equilibrio de sorción de PCF en los dos soportes sintéticos, se determinó la mayor concentración de PCF que puede ser sorbida por los dos soportes sintéticos (saturación de PCF), mediante isotermas de sorción. Los resultados experimentales de isotermas de sorción de PCF en el PUF y en la fibra de nylon se ajustaron a la isoterma de Langmuir mediante la linearización tipo II. A partir de la isoterma de Langmuir se encontró que el PUF mostró una capacidad de sorción máxima de PCF de 268.6 mg PCF g⁻¹ PUF, mientras que la fibra de nylon mostró una capacidad de sorción máxima de PCF de 3.0 mg PCF g⁻¹ nylon.

Con base en observaciones al microscopio del crecimiento de *R. oryzae* ENHE, se encontró que bajo condiciones de saturación con PCF, *R. oryzae* ENHE creció poco en el PUF debido a la alta concentración de PCF sorbido en comparación con el cultivo con PUF sin PCF. Mientras que el crecimiento de *R. oryzae* ENHE en la fibra de nylon saturada con PCF y fibra de nylon sin PCF fue muy similar. Por lo que, se eligió a la fibra de nylon saturada con PCF como soporte para la inmovilización de *R. oryzae* ENHE. El máximo crecimiento de *R. oryzae* ENHE en la fibra de nylon saturada con PCF se observó a las 36 h de cultivo y fue de 18.6 mg biomasa seca g⁻¹ nylon. *R. oryzae* ENHE inmóvil en fibra de nylon saturada con PCF logró remover, de cultivos sumergidos con medio de cultivo Merlin-Norkrans, el 87% de 12.5 mg PCF L⁻¹ en 24 h y 92% de 25 mg PCF L⁻¹ en 72 h.

Abstract

The objective of this investigation was immobilized at *Rhizopus oryzae* ENHE in a synthetic support to remove PCP. It was tested two synthetic supports: polyurethane foam (PUF) and nylon fiber (nylon wed). Both synthetic supports retain PCP by themselves, and then it was necessary to characterize the sorption of PCP in order to quantifier the PCP removed by the fungus. The kinetic results showed that the sorption of PCP in PUF and nylon fiber is fit to the pseudo second order model. The sorption of PCP in PUF reached the equilibrium time in approximate 2 h, while the nylon fiber reached the equilibrium time in approximate 5 days. After determining the equilibrium's time of PCP in the both synthetic supports, it was determined the biggest concentration of PCF that it can be sorbed by both synthetic supports (saturation of PCP), through the sorption isotherm. The results of sorption isotherms of PCP in PUF and nylon fiber are fit to the Langmuir isotherm through the linearization type II. The PUF showed a maximum adsorption ability of 268.6 mg PCP g⁻¹ PUF, while the nylon fiber showed a maximum adsorption ability of 3.0 mg PCP g⁻¹ nylon.

It was found that under conditions of saturation with PCF *R. oryzae* ENHE grew better into saturated nylon fiber with PCP than into PUF, because of the high PCP concentration sorbed by the PUF. Therefore, it was chosen the saturated nylon fiber with PCP as a support to immobilization of *R. oryzae* ENHE. The maximum growth of *R. oryzae* ENHE into saturated nylon fiber with PCP was observed at 36 h of cultivation, and it was 18.59 mg dry biomass g⁻¹ nylon. *R. oryzae* ENHE immobilized in saturated nylon fiber with PCP removed 87% of 12.5 mg PCP L⁻¹ at 24 h and 92% of 25 mg PCP L⁻¹ at 72 h.

1. Introducción

1.1 Pentaclorofenol (PCF)

El Pentaclorofenol (PCF) es un compuesto organoclorado de origen antropogénico que está constituido por un fenol que tiene sustituidos los átomos de hidrógenos del anillo aromático por cloros. Y contiene C (27.03%), Cl (66.59%), O (6%), y H (0.38%) (Figura 1.1).

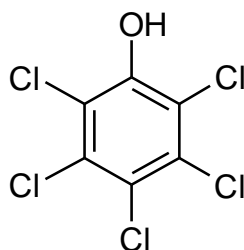


Figura 1.1 Molécula del PCF.

El PCF fue sintetizado por primera vez en 1841, sin embargo su producción a escala industrial empezó a partir de 1936 en los Estados Unidos de Norte América por Dow Chemical Company y Monsanto Chemical Company (Fisher, 1991). Existen dos procesos para la producción de PCF: 1) La cloración directa de la molécula de fenol descrita por Boehringer, y 2) La hidrólisis alcalina del hexaclorobenceno descrita por Dow. En Europa la producción de PCF se realiza por ambos métodos. Mientras que en los Estados Unidos de Norte América se realiza solo por el método de Boehringer (Williams, 1982).

La cloración de fenol por el proceso de Boehringer ocurre en dos etapas. En la primera etapa el cloro es burbujeado a través del fenol a 100°C para producir tri- y tetraclorofenoles. En la segunda etapa la temperatura se incrementa gradualmente hasta llegar a 180°C, posteriormente la mezcla de reacción se mantiene a ésta temperatura para que se complete la cloración de los clorofenoles, y formen PCF. Sin embargo, la síntesis de PCF tiene solamente un rendimiento del 85-90%, por lo que existen sub-productos. Entre los más destacados se encuentra el Tetraclorofenol (4-8%), Triclorofenol (< 0.1%), moléculas cloradas complejas (2-6%), y compuestos cáusticos insolubles (1%) (Johnson y col., 1973). Las altas temperaturas en la síntesis de PCF favorecen la formación de moléculas clorada

complejas; entre las cuales destaca el hexaclorobenceno, algunas dioxinas y furanos, como se muestra en la figura 1.2 (Jensen y Renberg, 1972).

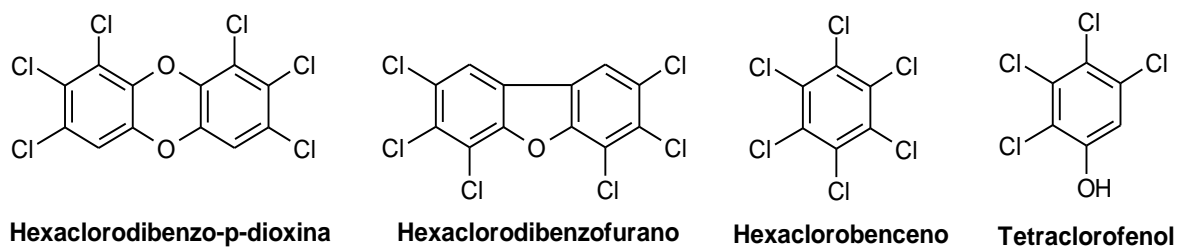


Figura 1.2 Principales sub-productos del PCF (Fisher, 1991)

1.2 Características Físicas y Químicas del PCF

Se puede encontrar al PCF de dos formas, como molécula neutra ó en forma de anión, como pentaclorofenolato. El PCF es un ácido débil, aunque la presencia de átomos de cloro lo hace más ácido que el mismo fenol. La sal sódica del PCF es relativamente soluble en agua, mientras que la molécula neutra solo es soluble en solventes orgánicos. La molécula del PCF es relativamente estable y no sufre descomposición a grandes periodos de elevada temperatura (menores de 310°C). Debido a que el PCF está constituido de una estructura fenólica, puede sufrir las reacciones químicas usuales de los fenoles. Sin embargo, la presencia de cinco átomos de cloro hace que el grupo hidroxilo sea menos reactivo en muchos casos. Puesto que todos los átomos de hidrógeno en la molécula del fenol han sido remplazados por átomos de cloro, las reacciones más comunes de los fenoles (acoplamiento ó sustitución) no pueden ocurrir. En presencia de metales pesados el PCF puede formar compuestos insolubles en agua que generalmente son altamente coloridos. El pentaclorofenolato de cobre, por ejemplo, es púrpura, con plata es dorado, y en presencia de una sal de mercurio es amarillo limón (Carswell y Nason, 1938). Algunas propiedades Físicas y Químicas del PCF se resumen en la tabla 1.1.

Tabla 1.1 Propiedades Físicas y Químicas del PCF (WHO, 1987; WBK & Associates Inc. 2004)

PROPIEDADES	VALOR
Peso molecular	266.64 g mol ⁻¹
Estado físico	Sólido cristalino monocíclico
	Grado técnico: gris oscuro-café
Punto de fusión	174°C
Punto de ebullición	310°C (descomposición)
Gravedad específica (líquido)	1.978 (a 22°C)
Gravedad específica (gas) (aire =1)	9.20

Presión de vapor	0.00011 mm de Hg (a 20°C)
Solubilidad en agua	Ligeramente soluble en agua 5 mg L ⁻¹ a 0°C 8 mg L ⁻¹ a 20°C (pH 8) 35 mg L ⁻¹ a 50°C
Solubilidad	Soluble en benceno, muy soluble en etanol, metanol y éter etílico
pKa	4.75
Constante de la ley de Henry	2.75x10 ⁻⁶ atm m ³ mol ⁻¹
Umbral de olor	0.857 mg L ⁻¹ a 30°C (en agua) 12 mg L ⁻¹ a 60°C (en agua)
Factor de conversión a vapor (a 25°C y 101.3 kPa)	1 mg m ⁻³ = 0.001 ppm

1.3 Usos del PCF

El uso más importante del PCF debido a su alta actividad citotóxica está en el campo de la preservación, principalmente como preservador de maderas, y como agente herbicida, bactericida, fungicida, alguicida, defoliante, germicida, y molluscicida (contra caracoles y vectores de esquistosomiasis) (Huff, 2001). Las maderas tratadas con PCF pueden ser utilizadas tanto con fines de construcción como con fines ornamentales (ventanas y marcos). Con fines de construcción las maderas son impregnadas con una solución de PCF al 5% en combustibles de petróleo en cilindros de alta presión, mientras que con fines ornamentales las maderas son simplemente sumergidas en la misma solución de PCF que las maderas de construcción. Estas maderas tratadas con PCF presentan algunos beneficios, por ejemplo: conservan su apariencia natural, son limpias y no se decoloran, emiten poco olor, y puede ser pintadas fácilmente como la madera no tratada. También son fácilmente manipulables y no exudan materiales que manchen la ropa (Carswell y Nason, 1938). En los Estados Unidos de Norte América y en otros países pertenecientes a la Comunidad Europea, el uso del PCF como agente biocida está prohibido desde 1988. Sin embargo, su uso está permitido en algunos casos, como preservador de maderas (U.S. EPA, 1990).

En México según el Catalogo oficial de Plaguicidas (CICOPLAFEST, 2004) el uso del PCF es restringido y solo se debe usar para las actividades mostradas en la tabla 1.2.

Tabla 1.2 Usos oficiales del PCF según la CICOPALFEST.

Na-PCF			PCF		
<i>Uso</i>	<i>Actividad</i>	<i>Toxicidad</i>	<i>Uso</i>	<i>Actividad</i>	<i>Toxicidad</i>
	Fungicida-bactericida	<i>I</i>	<i>Agrícola</i>	Tratamiento de maderas	<i>III</i>
	Fungicida-bactericida para preservación de maderas	<i>I</i>	<i>Industrial</i>	Para plantas formuladoras de plaguicidas	<i>III, II</i>
<i>Industrial</i>	Fungicida-bactericida en las área de adhesivos, curtiduría, papelería y textiles	<i>I</i>	<i>Urbano</i>	Fungicida-bactericida como preservación de maderas en el control de termitas, hongos y escarabajos	<i>III, II</i>
	Para plantas formuladoras de plaguicidas			Para uso exclusivo de aplicadores de plaguicidas: bactericida-fungicida urbano para tratamiento de madera	<i>III</i>
				Para uso exclusivo de aplicadores de plaguicidas en el control de hongos, termitas, polillas, escarabajos, abejas y hormigas de madera	<i>III</i>

Toxicidad Tipo I: Extremadamente tóxico; Tipo II: Altamente tóxico; Tipo III: Moderadamente tóxico.

Estos usos están restringidos, debe usarse equipo de protección y la aplicación debe hacerse por personal especializado.

1.4 Fuentes de contaminación de PCF, liberación al medio ambiente y exposición a los seres humanos

El PCF puede ser liberado al medio ambiente de varias formas. Puede volatilizarse a partir de madera tratada, aguas superficiales o descargas industriales. En el aire puede dispersarse y regresar nuevamente a tierra con la lluvia o con la nieve. Puede llegar a mantos acuíferos superficiales y subterráneos por lixiviación de los suelos, por erosión, a través de descargas residuales. En los cuerpos de agua puede depositarse y contaminar los sedimentos o puede ser consumido por los organismos encontrados en la cadena trófica. El PCF puede contaminar los suelos como resultado de uso de plaguicidas, el lavado de maderas tratadas, derrames industriales y los sitios de confinamiento de residuos peligrosos. Las plantas son capaces de sorber el PCF y almacenarlo en sus raíces, por lo que pueden ser consumidas por el ganado y así llegar hasta el ser humano a través de la cadena alimenticia (Fernández y col., 2004).

Se ha observado que las principales fuentes de exposición de PCF para los seres humanos son los lugares de trabajo, el hogar, el aire de interiores y exteriores, el agua potable, y la comida. La intoxicación con PCF se presenta por inhalación, ingestión de agua ó alimentos

contaminados, y por absorción a través de la piel; por medio de madera, aceite, combustible, y agua contaminada (Fisher, 1991). Horstman y col., (1989), realizaron estudios de absorción (penetración) de PCF y tetraclorofenol en cadáveres de seres humanos. Ellos encontraron que la absorción de estos organoclorados en la piel humana está en función de las formas aniónicas ó neutras de las moléculas de PCF y tetraclorofenol. Sus resultados mostraron que la piel humana absorbe el 62% y 63% del PCF y tetraclorofenol, respectivamente, cuando están disueltos en gasóleo, mientras que en solución acuosa la piel humana solo absorbe el 16% y 33% del PCF y tetraclorofenol, respectivamente. Estos resultados contrastaron con los reportados por EPA que había estimado que la piel humana solo podía absorber el 50% del PCF disuelto en gasóleo, y el 1% del PCF disuelto en solución acuosa.

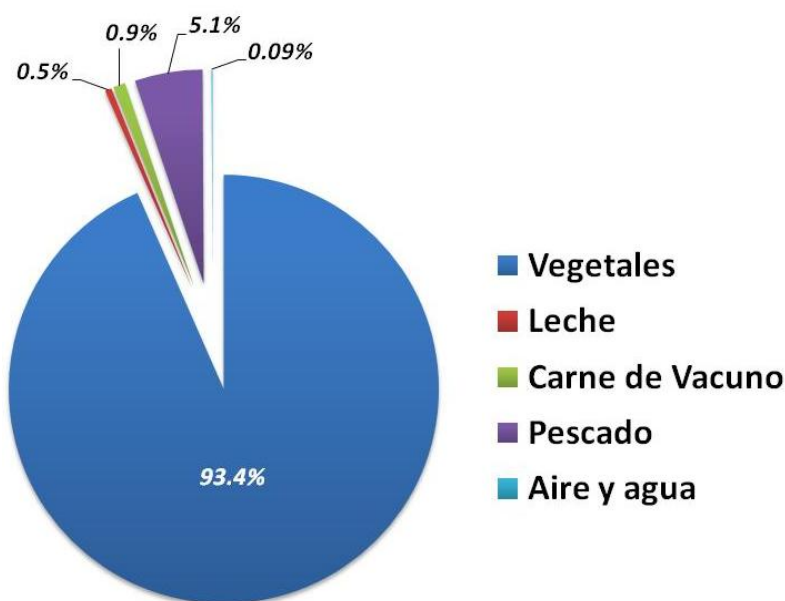


Gráfico 1.1 Distribución del PCF en los principales alimentos consumidos por los seres humanos (Fisher, 1991).

Se estima que el 96.5% del PCF en el ambiente se encuentra en suelos, 2.5% en agua, 1% en el aire, y menos del 1% en sedimentos suspendidos y organismos en sistemas acuáticos. Debido a esto, el 99.9% de la intoxicación humana con PCF se da por medio de la cadena alimenticia, principalmente con frutas, vegetales, y granos (gráfico 1.1). Se ha estimado que en la dieta diaria de un adulto en los Estados Unidos de Norte América, la concentración de PCF es tan grande como 6 µg (Yang y col., 2005).

1.5 Toxicidad del PCF

1.5.1 Efectos en la salud humana

La población en general está expuesta al PCF mediante tres vías principales: 1) por ingestión de agua ó alimentos contaminados; 2) por contacto dérmico con el agua o suelo contaminado u objetos de madera tratados; y 3) por inhalación por vapores derivados de productos tratados (Fernández y col., 2004). La exposición prolongada de PCF puede causar conjuntivitis, sinusitis crónica, enfermedades crónicas del tracto respiratorio, enfermedades crónicas de la piel, e incremento en la temperatura. En personas expuestas ocasionalmente al PCF, como personas que viven en casas donde el PCF fue usado como preservador de madera, presentan un gran número de síntomas, que se clasifican desde “leves” hasta “severos”; entre los más frecuentes se encuentran mareos, dolor de cabeza, irritación de las vías respiratorias, dolores abdominales, desordenes neurológicos y enfermedades de la piel (Seiler, 1991). A nivel nacional e internacional el PCF está clasificado dentro del grupo B2, probable carcinógeno humano (insuficiente evidencia en animales) por EPA (CICOPLAFEST, 2004).

1.5.2 Interpretación bioquímica de la toxicidad del PCF

Como se mencionó anteriormente el incremento en la temperatura corporal, sed, transpiración, fatiga muscular, problemas de respiración y mareos, causados por la intoxicación del PCF, pueden ser explicados por la falta de producción de ATP y por una producción excesiva de calor. Se sabe que el principal efecto del PCF a nivel celular es el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Weinbach, 1954; Weinbach, 1957; Escher y col., 1996).

El PCF al ser una ácido débil, en fluidos fisiológicos está disociado en su forma aniónica. El pentaclorofenolato puede penetrar la membrana mitocondrial exterior y alcanzar el espacio intermembrana, donde se protona debido a la alta concentración de H^+ . La molécula neutra del PCF puede atravesar la membrana mitocondrial interna, donde es nuevamente disociado a pentaclorofenolato, debido a la diferencia de pH, que es de aproximadamente 0.6 unidades. El pentaclorofenolato formado, de nuevo atraviesa la membrana mitocondrial interna y se protona nuevamente, repitiendo el ciclo. Este

mecanismo permite el regreso de H^+ a la matriz mitocondrial impidiendo el paso de los H^+ a través de ATPasa, disminuyendo la síntesis de ATP (Boelsterli, 2007). Es por esto que el PCF es considerado como un protonoforo (transportador de protones). El desacoplamiento de la fosforilación oxidativa causado por el PCF se muestra en la figura 1.3.

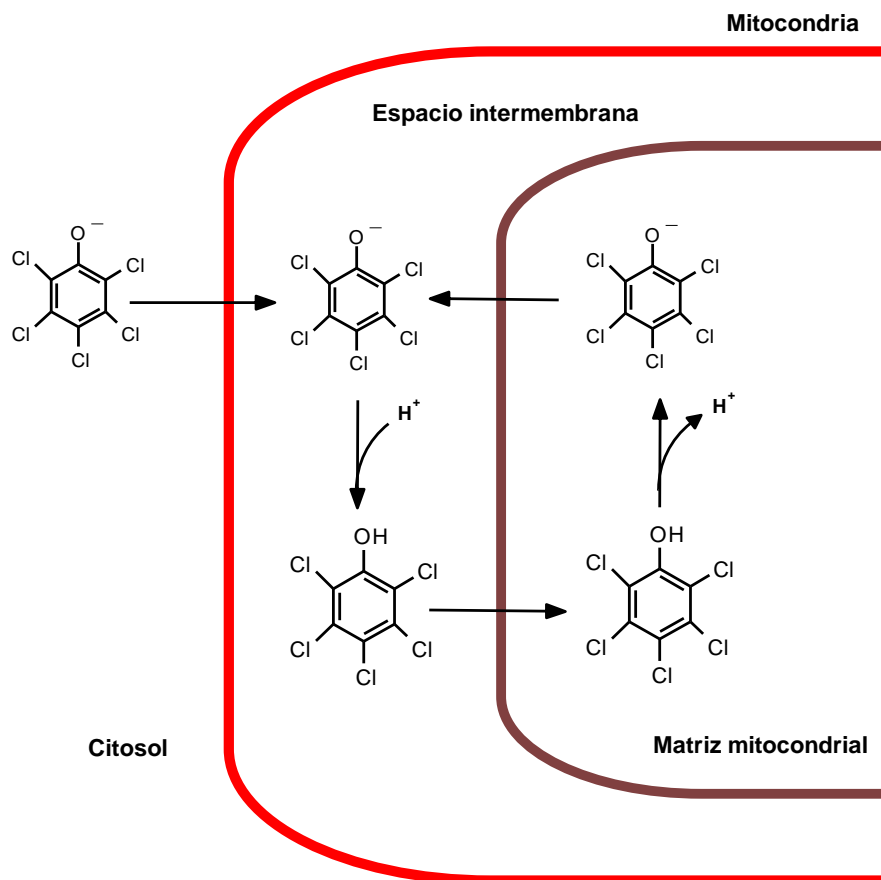


Figura 1.3 Mecanismo de reacción del desacoplamiento de la fosforilación oxidativa con PCF (Boelsterli, 2007).

Las consecuencias del desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (además de la producción insuficiente de ATP) son un incremento en la frecuencia respiratoria, y un incremento en la pérdida de energía en forma de calor. En otras palabras, bajo esas condiciones las mitocondrias se han convertido de un organelo productor de ATP a un organelo productor de energía en forma de calor (Boelsterli, 2007).

También se ha observado que el PCF puede inhibir a la sulfotransferasa, encargada de transferir un grupo fosfato del 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAPS) a un sustrato

xenobiótico, aumentando así su solubilidad en agua, para posteriormente eliminarlo a través de la orina (Boles y Klaassen, 2000).

1.6 Soportes sintéticos

1.6.1 Espuma de poliuretano (PUF)

La espuma de poliuretano (PUF) es un material plástico en el cual una porción de fase sólida se reemplaza por gas en forma de pequeñas burbujas (celdas de aire). Desde un punto de vista geométrico, si las burbujas ocupan un volumen más pequeño que el 76%, estas podrán ser esféricas, mientras que si ocupan un volumen más grande que el 76%, estas serán poliedros cuasi-esféricos. Los PUF se han creado con texturas suaves, flexibles y rígidas usando una variedad de poliésteres y poliéteres. Las reacciones más importantes para la preparación de espumas de uretanos son: 1) entre isocianatos y compuestos con grupos hidroxil; por ejemplo: Poliésteres (etilen glicol y ácido adípico) ó Polioliol poliéter, y 2) entre isocianatos y agua para liberar CO₂ (Lemos y col., 2007). La figura 1.4 muestra el mecanismo general de reacción para la formación de uretanos.

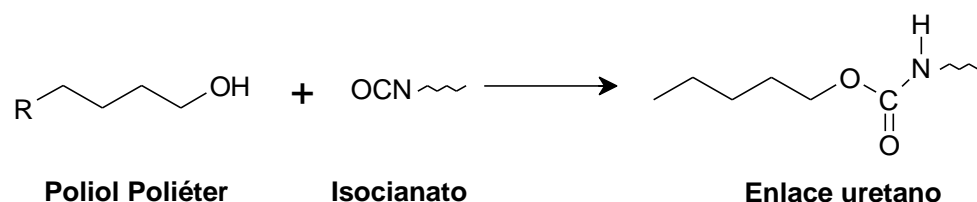


Figura 1.4 Mecanismo de reacción para la formación de espuma de poliuretano (PUF) (Elwell y Ryan, 1996).

Los isocianatos más ampliamente utilizados han sido: 2,4-toluendiisocianato, 4,4-bencendiisocianato, y 1,5-naftalendiisocianato. La figura 1.5 muestra la estructura general de un prepolímero para la síntesis de PUF a partir de toluendiisocianato (Billmeyer, 1984).

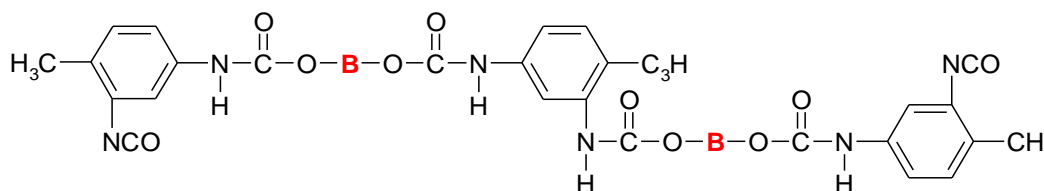


Figura 1.5 Prepolímero para la síntesis de PUF a partir de toluendiisocianato, donde el grupo “B” puede ser algún poliéter o poliéster (Billmeyer, 1984).

1.6.2 Fibra de poliamida

El término “nylon” es aceptado como equivalente genérico para englobar a las poliamidas sintéticas, estas se caracterizan por tener un enlace amida. Entre las poliamidas más utilizadas comercialmente se encuentran el nylon-6 y el nylon-6,6. Históricamente la producción dominante de nylon-6,6 se ha realizado por los Estados Unidos de Norte América, mientras que la mayor producción de nylon-6 por países europeos (Carraher, 2007). El mecanismo de reacción para la síntesis de nylon-6 y -6,6 se muestra en la figura 1.6.

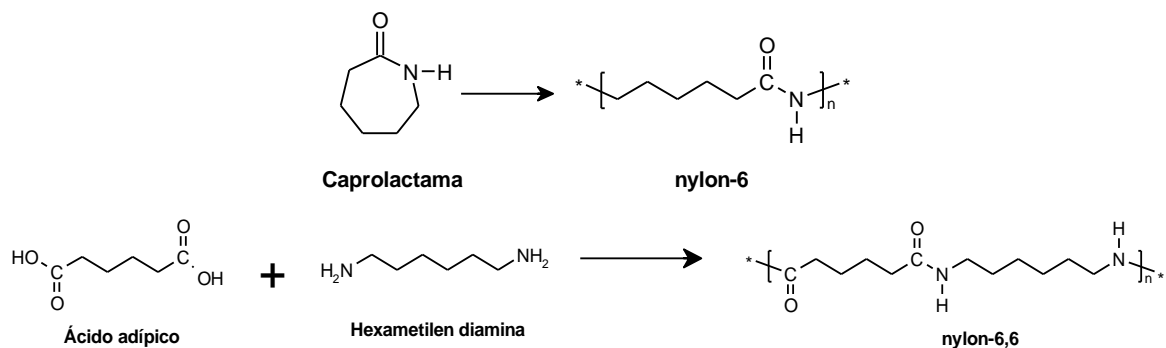


Figura 1.6 Síntesis de nylon-6 y -6,6 (Carraher, 2007; Rudin, 1987)

La polimerización del Caprolactama se realiza agregando agua para abrir el anillo, y calentando a altas temperaturas, para formar el polímero lineal. Al igual que la síntesis de nylon-6, la síntesis de nylon-6,6 se realiza sin catalizador, puesto que el ácido adípico autocataliza la reacción a altas temperaturas (270-280°C) en presencia de ácido acético (Billmeyer, 1984).

1.6.3 Principales propiedades y usos de los soportes sintéticos

Polímero	Propiedades	Usos	Referencia
Poliamida (Nylon)	Fuerza, elasticidad y resistencia a la abrasión, dureza; resistencia favorable a solventes; solo el fenol, cresol y ácido fórmico pueden disolverlo a temperatura ambiente. Y resistencia a la humedad.	Fibras: Alrededor del 60% de la producción de nylon se destina a productos relacionados con el hogar (sogas, bandas, paños abrasivos, hilos y mangueras). Un 20% se usa en prendas de vestir, y solo un 10% se utiliza para cuerdas de neumáticos.	Carraher, 2007; Billmeyer, 1984
Espuma de poliuretano (PUF)	Fuerza por unidad de peso, rebote y alta fuerza de impacto.	Almohadas y cojines.	Carraher, 2007

1.7 Adsorción

La adsorción se define como la concentración preferencial de una especie en la interface entre dos fases: gas-sólido ó líquido-sólido (Hill, 1977). Es posible dividir el fenómeno de adsorción en dos principales clases: la adsorción física y la adsorción química.

La adsorción física (físisorción) es poco específica y en algunas ocasiones es similar al proceso de condensación. Las fuerzas de atracción de las moléculas del fluido a la superficie sólida son relativamente débiles, y la entalpía que se desprende durante el proceso de adsorción exotérmica es del mismo orden de magnitud que la entalpía de condensación. El equilibrio entre la superficie sólida (adsorbente) y las moléculas del adsorbato (especie adsorbida) se alcanza rápidamente y es fácilmente reversible (Smith, 1981). La adsorción física surge de fuerzas intermoleculares que involucran dipolos permanentes, dipolos inducidos e interacciones cuadrípulo (implican fuerzas de van der Waals ó fuerzas de valencias secundarias) (Hill, 1977)

La adsorción química (quimisorción) es muy específica e involucra interacciones químicas con transferencia de electrones del adsorbente y el adsorbato. De acuerdo con el trabajo pionero de adsorción realizado por Langmuir (1916), las moléculas adsorbidas se mantienen en la superficie del adsorbente por fuerzas de valencias del mismo tipo a las encontradas en los átomos formando moléculas. Puesto que en la adsorción química se lleva a cabo una reacción química entre la superficie del adsorbente y el adsorbato, se requiere cierta especificidad. La adsorción química solo se puede realizar si el adsorbato es capaz de realizar enlaces químicos con el adsorbente y formar una mono-capa (Smith, 1981).

El principal criterio para diferenciar a la adsorción física de la química es la magnitud del cambio de la entalpía que acompaña al proceso de adsorción. La energía involucrada cuando ocurre un proceso de adsorción física es de 2 a 6 kcal mol⁻¹. Para la adsorción física la entalpía de adsorción a menudo se encuentra entre el calor de vaporización y el calor de sublimación. Por el contrario, los cambios de entalpía que acompañan a la adsorción química son significativamente más grandes que los encontrados en la adsorción física y en

algunos casos pueden exceder $100 \text{ kcal mol}^{-1}$. Sin embargo, los cambios de entalpía más a menudo reportados se encuentran entre 10 y 50 kcal mol^{-1} (Hill, 1977).

Un segundo criterio que es frecuentemente utilizado para diferenciar empíricamente la adsorción química de la física es la velocidad a la cual ocurre el proceso de adsorción, en particular, la dependencia de la temperatura sobre la velocidad. Para la adsorción física de un gas sobre una superficie sólida, el equilibrio se alcanza muy rápidamente y es reversible. La adsorción física se realiza tan rápidamente que la velocidad de adsorción observada es limitada por la velocidad a la cual las moléculas se pueden transportar a la superficie de adsorción. La adsorción química puede ocurrir a velocidades comparables a la adsorción física, o en algunos casos a velocidades mucho más lentas, dependiendo principalmente de la temperatura. Muchos tipos de adsorción química se caracterizan por una energía de activación finita y por lo tanto apreciable por encima de determinadas temperaturas mínimas. A este tipo de adsorción se le conoce como *adsorción química activada*. Sin embargo en algunos sistemas la adsorción química puede ocurrir muy rápidamente, incluso a bajas temperaturas y tener energías de activación cercanas a cero. A este tipo de adsorción se le conoce como *adsorción química no activada* (Hill, 1977).

Un tercer criterio empírico para diferenciar la adsorción química de la física se basa en el efecto de la temperatura sobre la cantidad de materia adsorbida (figura 1.7).

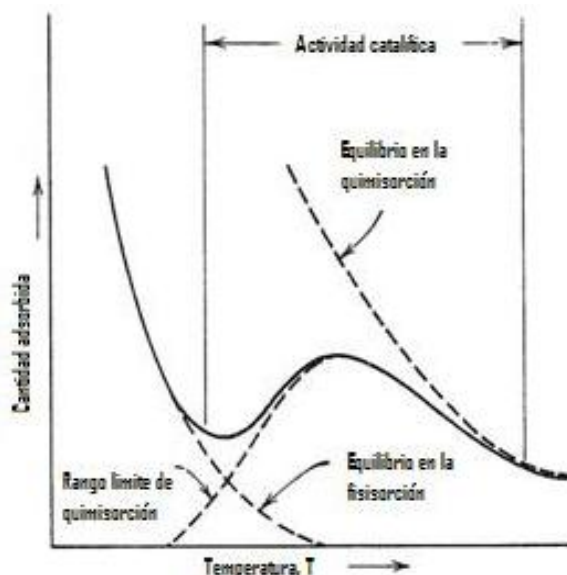


Figura 1.7 Efecto de la temperatura sobre la cantidad adsorbida por adsorción simultánea física y química activada (Hill, 1977).

En la figura 1.7 se observa que a bajas temperaturas, el proceso dominante es la adsorción física y la cantidad de adsorción química es insignificante. La cantidad de materia adsorbida físicamente disminuye con el incremento de la temperatura. Dentro de la escala de tiempo normal de un experimento de adsorción la cantidad de material adsorbido vía adsorción química incrementará con la temperatura en un intervalo de temperaturas bajas. Consecuentemente su contribución al total llegará a ser más significativa a medida que la temperatura sube, y eventualmente alcanzará un punto en el cual la disminución en la adsorción física con un incremento en la temperatura se compensa por el incremento en cantidad de materia que puede ser adsorbida por adsorción química. A más altas temperaturas la velocidad de desorción del estado de adsorción química empieza a ser importante, y la curva llegará a un máximo local y luego disminuirá. A temperaturas altas se puede alcanzar el equilibrio con respecto al proceso de adsorción química, pero si hay un exceso de temperatura se perderá el equilibrio y se desorberá poco a poco la materia adsorbida químicamente (Hill, 1977).

1.8 Cinética de adsorción

1.8.1 Cinética de adsorción de Pseudo-primer orden

La ecuación de velocidad de adsorción de pseudo-primer orden fue originalmente diseñada por Lagergren en 1898 para sistemas de adsorción líquido-sólido. Lagergren estudió la adsorción de ácido oxálico y malónico en carbón vegetal. La expresión de velocidad de adsorción resultante de estos estudios generalmente se expresa de la siguiente manera (Ho and Mckay, 1998):

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_e - q_t) \quad (1)$$

Donde q_e y q_t (mg g^{-1}) son las capacidades de adsorción en el equilibrio, y en un tiempo t , respectivamente (mg g^{-1}) y k_1 es la constante de adsorción de pseudo-primer orden (min^{-1}). Si se integra la ecuación 1 con las condiciones frontera: $t = 0$ para $q_t = 0$ y $q_t = q_e$ para $t = \infty$, se obtiene la ley de velocidad integrada para una reacción de adsorción de pseudo-primer orden, la cual llega a ser:

$$\log\left(\frac{q_e}{q_e - q_t}\right) = k_1 t \quad (2)$$

De la ecuación 2 se obtiene la forma lineal:

$$\log(q_e - q_t) = \log(q_e) - \frac{k_1}{2.303} t \quad (3)$$

A partir de la ecuación 3 se pueden encontrar las constantes cinéticas k_1 y q_e . La ecuación 3 aplicada a los resultados experimentales generalmente difiere de una ecuación de primer orden verdadero, en dos formas:

- 1) El parámetro $k_1(q_e - q_t)$ no representa el número de sitios disponibles para la adsorción.
- 2) El parámetro $\log(q_e)$ es un parámetro ajustable y a menudo se encuentra que no es igual a la intercepción de una gráfica $\log(q_e - q_t)$ contra t , mientras que un $\log(q_e)$ de primer orden verdadero debería ser igual a la intercepción de una gráfica $\log(q_e - q_t)$ contra t .

1.8.2 Cinética de adsorción de Pseudo-segundo orden

En 1995, Ho presentó la expresión de velocidad de adsorción de pseudo-segundo orden, la cual demuestra como la velocidad de adsorción depende de la capacidad de adsorción en el equilibrio y no de la concentración del adsorbato (Ho, 2004). Ho estudió la adsorción de Cu^{2+} en turba y encontró que la adsorción era debida principalmente a grupos funcionales polares (como aldehídos, cetonas, ácidos y grupos fenólicos). La reacción turba- Cu^{2+} puede ser representada de dos formas (Ho, 2006):



y



Donde P^- y HP son los sitios polares donde se lleva a cabo la adsorción. Teniendo en cuenta lo anterior las expresiones de velocidad se pueden escribir como:

$$\frac{d(P)_t}{dt} = k_2[(P)_0 - (P)_t]^2 \quad (6)$$

ó

$$\frac{d(HP)_t}{dt} = k_2[(HP)_0 - (HP)_t]^2 \quad (7)$$

Donde $(P)_t$ y $(HP)_t$ son el número de sitios activos ocupados en la turba en un tiempo t , y $(P)_0$ y $(HP)_0$ son el número de sitios disponibles en el equilibrio en la turba. Las ecuaciones de velocidad de adsorción pueden ser re-escritas de la siguiente manera:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2 \quad (8)$$

En la ecuación 8 la fuerza impulsora $(q_e - q_t)$ es proporcional a la fracción de sitios disponibles, q_e es la cantidad de materia adsorbida en el equilibrio (mg g^{-1}), q_t es la cantidad de materia adsorbida en un tiempo t (mg g^{-1}) y k_2 es la constante de velocidad de adsorción de pseudo-segundo orden ($\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$).

Separando las variables de la ecuación 8 se obtiene:

$$\frac{dq_t}{(q_e - q_t)^2} = k_2 dt \quad (9)$$

E integrando la ecuación 9 con las condiciones frontera $t=0$ para $t=t$ y $q_t=0$ para $q_t=q_t$, se obtiene:

$$q_t = \frac{q_e^2 k_2 t}{1 + q_e k_2 t} \quad (10)$$

Donde la ecuación 10 es la ley de velocidad integrada para una reacción de adsorción de pseudo-segundo orden. La ecuación en su forma lineal:

$$q_t = \frac{t}{\frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e}} \quad (11)$$

$$\frac{1}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad (12)$$

y

$$h = k_2 q_e^2 \quad (13)$$

Donde h es la velocidad de adsorción inicial ($\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$) cuando q_t/t se aproxima a 0. Las constantes del modelo de adsorción de pseudo-segundo orden se pueden encontrar graficando t/q_t contra t .

1.9 Isotermas de adsorción

La cantidad de material adsorbido en un sistema depende de la temperatura y la presión o la concentración del adsorbato. Si la temperatura se mantiene constante durante el experimento, el grado de adsorción puede estudiarse como función de la presión o la concentración y generar así lo que se conoce como la isoterma de adsorción.

1.9.1 Isoterma de Freundlich

La expresión de la isoterma de Freundlich es una ecuación exponencial que asume que cuando la concentración de adsorbato incrementa también lo hace la concentración de adsorbato en la superficie del adsorbente (Allen y col., 2004; Freundlich, 1906):

$$q_e = K_F C_e^{1/n} \quad (14)$$

En la ecuación 14, K_F y $1/n$ son las constantes de Freundlich. Donde K_F es un indicador de la capacidad del adsorbente y $1/n$ es una medida de la heterogeneidad de la superficie de adsorción (esta constante toma valores entre 0 y 1). Se tiene una mayor heterogeneidad superficial si el valor de $1/n$ se acerca a 0 (Ahmaruzzaman y col., 2005), si $1/n < 1$ la adsorción es favorable y si $1/n > 1$ la adsorción es desfavorable. Teóricamente la expresión de Freundlich nos indica que una cantidad infinita de adsorción puede ocurrir (Freundlich, 1906). Para determinar los parámetros K_F y $1/n$, se utiliza la forma lineal de la ecuación de Freundlich:

$$\log(q_e) = \log(K_F) + \frac{1}{n} \log(C_e) \quad (15)$$

1.9.2 Isoterma de Langmuir

En 1916 Langmuir desarrolló un modelo simple para predecir la adsorción de un gas sobre una superficie como función de la presión del fluido. Sin embargo, este modelo es aplicable tanto a la interfase sólido-líquido como a la interface sólido-gas, y se basa en las siguientes hipótesis (Doménech y Peral, 2006):

1. La superficie del sólido contiene un número determinado de sitios de adsorción (lugares de la superficie del adsorbente donde se acomodan moléculas de adsorbato). En el equilibrio, una determinada fracción de sitios están ocupados (θ), mientras que el resto, $1-\theta$, permanecen vacíos. En el equilibrio la velocidad de adsorción y la velocidad de desorción son iguales.
2. Las moléculas del adsorbato adsorbidas forman una mono-capa en la superficie.
3. La entalpía de adsorción, consecuencia directa de la fuerza de las interacciones adsorbato-adsorbente, no depende de la fracción de superficie recubierta. Esto significa que todos los sitios de adsorción son equivalentes, es decir, que la superficie es uniforme.
4. No se establecen interacciones entre moléculas vecinas. Los sitios de adsorción están suficientemente alejados entre sí, de manera que las moléculas de adsorbato contiguas no ejercen ninguna influencia.

Para entender el modelo de Langmuir se propone el siguiente esquema dinámico que representa la adsorción (Liu, 2006):



Donde A representa al adsorbato, B representa al adsorbente sólido y AB representan al complejo adsorbente-adsorbato. Para la ecuación 16 la constante de equilibrio se puede expresar como:

$$K = \frac{[AB]}{[A][B]} \quad (17)$$

De acuerdo con la definición de constante de equilibrio $[AB]$, $[A]$ y $[B]$ son las concentraciones molares de los respectivos componentes. El número de moles de adsorbato unidos por mol de adsorbente (q) se puede escribir como:

$$q = \frac{[AB]}{[B]+[AB]} \quad (18)$$

Sustituyendo la ecuación 17 en la ecuación 18 se tiene:

$$q = \frac{K[A]}{1+K[A]} \quad (19)$$

$$\text{Y una constante de disociación} = 1/K \quad (20)$$

Si el adsorbente tiene n sitios de unión idénticos, la isoterma de adsorción se puede considerar como la suma de cada uno de los sitios de unión:

$$q = n \frac{K[A]}{1+K[A]} \quad (21)$$

La ecuación 21 muestra que la capacidad de adsorción máxima teórica es $n \text{ mol mol}^{-1}$. Multiplicando ambos lados de la ecuación 21 por el cociente del peso molar del adsorbato (M_A) y el peso molar del adsorbente (M_B) se obtiene:

$$\frac{M_A}{M_B} q = n \frac{M_A}{M_B} \frac{K[A]}{1+K[A]} \quad (22)$$

El término $(M_A/M_B)q$ se considera Q y el término $n(M_A/M_B)$ se considera Q_m por lo que la ecuación 22 se reacomoda como:

$$Q = \frac{Q_m K[A]}{1 + K[A]} \quad (23)$$

Donde Q ($\text{g A g}^{-1} \text{ B}$) es la capacidad de adsorción, Q_m ($\text{g A g}^{-1} \text{ B}$) es la capacidad de adsorción máxima y K es la constante de equilibrio de adsorción (L mol^{-1}). A la ecuación 23 se le conoce como la isoterma de Langmuir. Se debe enfatizar que la $[A]$ en la ecuación 23 es la concentración molar del adsorbato A en el equilibrio.

En la práctica es frecuente expresar las concentraciones del adsorbato en el equilibrio con unidades de concentración diferentes a las molares, por ejemplo: mg L^{-1} o $\mu\text{g L}^{-1}$, entre otras. En estos casos la nomenclatura de la isoterma y las unidades de la constante de adsorción de Langmuir cambian, como se muestra en la ecuación 24.

$$q_e = \frac{q_m k_a C_e}{1 + k_a C_e} \quad (24)$$

En la ecuación 24, q_e (mg g^{-1} o $\mu\text{g g}^{-1}$) representa a la capacidad de adsorción en el equilibrio, q_m representa a la capacidad de adsorción máxima, K_a representa la constante de adsorción de Langmuir (L mg^{-1} o $\text{L } \mu\text{g}^{-1}$) y C_e representan a la concentración del adsorbato en el equilibrio (mg L^{-1} o $\mu\text{g L}^{-1}$). En este estudio la nomenclatura utilizada en adelante es la correspondiente a la ecuación 24.

Las constantes de la isoterma de Langmuir, q_m y k_a se evalúan a través de la linearización de la ecuación 24, como se puede observar en la tabla 1.3.

Tabla 1.3 Formas linearizadas de la ecuación de la isoterma de Langmuir.

Linearización	Forma linearizada	Referencias
Tipo 1	$\frac{1}{q_e} = \left(\frac{1}{K_a q_m}\right) \frac{1}{C_e} + \frac{1}{q_m}$	Langmuir, 1916 (25)
Tipo 2	$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_m} C_e + \frac{1}{K_a q_m}$	Ahmaruzzaman y col., 2005; Ho, 2004 (26)

1.10 Inmovilización de microorganismos con fines de biorremediación

La inmovilización de microorganismo con fines de biorremediación puede traer ciertas ventajas sobre las células libres, como por ejemplo: mayor estabilidad, menor influencias

de factores ambientales externos, una separación de biomasa mucho más rápida y sencilla (Jiang y col., 2006), mayores tiempos de retención de biomasa, manipulación de la tasa de crecimiento, protección contra altas concentraciones de compuestos recalcitrantes que son tóxicos para las células libres, y la facilidad de uso en procesos continuos (Fang y col., 2004). Para la inmovilización de los microorganismos se han utilizado una gran variedad de soportes, tanto naturales como sintéticos. De los principales soportes naturales destacan las carrageninas, el quitosán y muchas variedades de alginatos, por sus bajos costos y su capacidad para ser biodegradados (Liouni y col., 2008). No obstante, también se han utilizado desechos, como las virutas de madera (Lu y col., 2009). Dentro de los soportes sintéticos destaca la espuma de poliuretano (PUF) (Šušla y Svobodová, 2008), el poliestireno (Ürek y Pazarlioğlu, 2005), y en menor grado el alcohol polivinílico (Fang y col., 2004), entre otros. Estos soportes sintéticos se han utilizado en gran medida debido a su alta capacidad de reutilización, en comparación con los soportes naturales.

Fang y col., (2004) inmovilizaron a *Penicillium funiculosum* Thom y a *Sphingomonas sanguinis* en perlas de alcohol polivinílico (PVA) para la degradación del colorante azo 4BS. Estos autores encontraron que el consorcio inmóvil degradó prácticamente todo el colorante, y además lo mineralizó. También, pudieron reutilizar la biomasa inmovilizada en 30 ciclos, sin perder la capacidad de degradación. Zouari y col., (2002) inmovilizaron a *P. chrysosporium* en espuma de poliuretano (PUF) y discos de poliestireno para la degradación de 4-clorofenol (4-CF). Estos autores mostraron que la biomasa de *P. chrysosporium* inmóvil en PUF pudo degradar completamente 100 mg 4-CF L⁻¹ en dos ciclos de alimentación, que duraron 4 y 6 días, mientras que solo pudo degradar el 90% de 100 mg 4-CF L⁻¹ en el último ciclo de alimentación a los 12 días. La degradación de 4-CF con biomasa de *P. chrysosporium* inmóvil en discos de poliestireno se realizó en un reactor de biodiscos (RBC) en tres ciclos de alimentación. En el primer ciclo hubo una degradación completa de 100 mg 4-CF L⁻¹ en dos días, mientras que en el segundo y tercer ciclo se degradó 80% de 200 mg 4-CF L⁻¹ en solo un día. Jiang y col., (2006) inmovilizaron a *P. chrysosporium* en perlas de alginato para la degradación de PCF en un suelo enriquecido con composta en un biorreactor. Estos autores mostraron que la velocidad de degradación de PCF con *P. chrysosporium* inmovilizado fue mayor en comparación a la degradación

con *P. chrysosporium* sin inmovilizar, ya que, *P. chrysosporium* inmovilizado degradó el 50% de PCF presente (100 mg Kg^{-1} suelo) en 9 días, mientras que células libres de *P. chrysosporium* degradaron la misma cantidad de PCF pero en 16 días. A los 12 días el reactor con *P. chrysosporium* inmóvil había degradado el 71.56% del PCF inicial. Sin embargo, al final de la degradación (60 días) ambos reactores (con el hongo inmóvil y sin inmovilizar) alcanzaron una degradación del 90% del PCF inicial.

2 Antecedentes

R. oryzae es un hongo filamentoso ampliamente utilizado como productor de ácido láctico, fumárico, málico, acético, y propionico (Huang y col., 2005; Oda y col., 2003; Park y col., 2004), así como productor de etanol (Taherzadeh y col., 2003; Oda y col., 2003). También se ha utilizado como productor de lipasas extracelulares para producir biodiesel (metil éster) a partir de aceites vegetales y etanol (Ban y col., 2001; Kaieda y col., 1999). Sin embargo pocos estudios se han dirigido a utilizar este hongo para la remoción de compuestos xenobióticos. De los pocos trabajos reportados con fines de remoción utilizando a *R. oryzae*, se encuentra lo realizado por León-Santiesteban y col., (2008). Ellos aislaron un hongo filamentoso de un aserradero en Puebla, que estaba contaminado con clorofenoles y lo identificaron por técnicas de biología molecular (100% de identidad en 604 nucleótidos) como *R. oryzae* ENHE. Estos autores también estudiaron la capacidad de *R. oryzae* ENHE para crecer y remover PCF en cultivos sumergidos con medio de cultivo Merlin-Norkrans, utilizando como única fuente de carbono, 10 g glucosa L⁻¹. En cultivo sumergido *R. oryzae* ENHE pudo remover en promedio el 90% de 12.5 mg PCF L⁻¹ en 48 h. Esto posiblemente debido a actividades enzimáticas extracelulares de LiP y tirosinasa.

3 Justificación

La remoción de compuestos aromáticos clorados, especialmente el PCF tiene un gran interés, puesto que, aun existen muchos países con suelos y mantos acuíferos, contaminados por este xenobiótico. Está documentado que el PCF a nivel celular puede desacoplar la fosforilación oxidativa (Escher y col., 1996), y provocar la muerte en algunos peces a concentraciones menores de 10 mg L^{-1} (Peer y col., 1983). Debido a esto, se han utilizado a los microorganismos para su eliminación; principalmente a los hongos pertenecientes a los basidiomicetos, ya que, presentan actividades enzimáticas extracelulares altamente inespecíficas. En los procesos de remoción de PCF se ha utilizado tanto biomasa fúngica libre, como biomasa fúngica inmovilizada, siendo esta ultima la que mejores rendimiento de remoción ha presentado. Debido principalmente a que en estos sistemas se puede tener un mejor control sobre la producción de biomasa, mayor protección de la biomasa contra el estrés producido por el agente tóxico, y la posibilidad de reutilizar la biomasa inmóvil en varios ciclos de remoción.

La remoción de PCF con hongos filamentosos diferentes a los basidiomicetos, como: *A. rouxii* (Marcial, 2005; Marcial y col., 2006), y *R. oryzae* ENHE (León-Santiesteban y col., 2008) es un campo de estudio reciente e interesante que se va expandiendo cada vez más, debido a que lo zigomicetos presentan: 1) velocidades de crecimiento mayores a los basidiomicetos, 2) sistemas enzimáticos extracelulares e intracelulares diferentes involucrados en la remoción, y 3) posiblemente metabolismo de degradación diferente a los basidiomicetos. Anteriormente se estudió la remoción de PCF con células libres de *R. oryzae* ENHE en cultivo sumergido y se encontró que el hongo podía remover PCF. Sin embargo, a concentraciones superiores de $12.5 \text{ mg PCF L}^{-1}$ se veía una fuerte inhibición del crecimiento del hongo, y por lo tanto una disminución en la remoción, por lo que es importante realizar los estudios de remoción de PCF en cultivo sumergido con biomasa de *R. oryzae* ENHE inmóvil en un soporte sintético y compararlos con la remoción obtenida con células libres.

4 Hipótesis

El zigomiceto *R. oryzae* ENHE puede crecer e inmovilizarse en un soporte sintético en presencia de PCF, y el estrés y confinamiento causado por la inmovilización mejora la capacidad para remover PCF.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

- ✓ Inmovilizar a *R. oryzae* ENHE en un soporte sintético para ser usado en la remoción de PCF.

5.2 Objetivos particulares

- ✓ Caracterizar la remoción abiótica del PCF por los soportes sintéticos.
- ✓ Determinar la capacidad de *R. oryzae* ENHE para crecer en los soportes sintéticos.
- ✓ Seleccionar el soporte adecuado para inmovilizar a *R. oryzae* ENHE.
- ✓ Determinar la capacidad de *R. oryzae* ENHE inmovilizado, en el soporte seleccionado, para remover PCF en cultivos sumergidos.

6 Materiales y métodos

6.1 Soportes sintéticos

Se utilizaron dos soportes sintéticos: Espuma de poliuretano (PUF) y fibra de nylon (100%). Los soportes se cortaron de forma cúbica con un tamaño aproximado de 1 cm, y se lavaron dos veces con NaOH al 40% (w/v) y HCl al 10% (v/v). Posteriormente se enjuagaron con H₂O hasta alcanzar un pH neutro. Una vez limpios los soportes se secaron a 60°C por 24 h.

6.2 Cinéticas de adsorción de PCF en PUF y fibra de nylon

Para realizar las cinéticas de adsorción de PCF se pesó una masa fija de PUF y de fibra de nylon, la cual fue de 0.3 g y de 3.03 g respectivamente. El soporte se colocó en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Los PUF contenían 50 mL de medio Merlin-Norkrans (M-N) con 50 mg PCF L⁻¹ y las fibras de nylon 100 mL del mismo medio con 200 mg PCF L⁻¹. Las unidades experimentales (matraces con PUF ó fibra de nylon, medio y PCF) se mantuvieron en agitación a 200 rpm y a una temperatura de 30 ± 1°C, por periodos de tiempos variables, de 0-480 min para el PUF y de 0-7200 min para la fibra de nylon. Terminada la incubación, los soportes se exprimieron para retirar el medio con PCF que se encontraba en exceso, se tomaron 2 mL de cada unidad experimental, se centrifugaron a 1400 rpm por 30 min y posteriormente se filtraron con membranas con un tamaño de poro de 0.22 µm. Después de filtradas las muestras se diluyeron con agua milliQ; 1:5 veces para la muestras de PUF y para las muestras de fibra de nylon como se muestra en la tabla 6.1. El PCF presente en el medio, no adsorbido, se cuantificó por HPLC para cada uno de los tiempos de muestreo. A partir de esas concentraciones de PCF y considerando las concentraciones iniciales de PCF se calcularon las capacidades de adsorción de PCF en los soportes en el tiempo t (q_t). Finalmente las q_t se graficaron contra el tiempo de muestreo para obtener los perfiles cinéticos de adsorción de PCF en PUF y en fibra de nylon. Cada una de las cinéticas de adsorción de PCF se realizó por duplicado.

Tabla 6.1 Diluciones realizadas en la cinética de adsorción de PCF en fibra de nylon.

Tiempo de muestreo (min)	Dilución
0	(1:20)
30	(1:20)
60	(1:20)
180	(1:20)
360	(1:20)
540	(1:20)
1440	(1:10)
2880	(1:10)
4320	(1:10)
7200	(1:10)

6.3 Isotermas de adsorción de PCF en PUF y fibra de nylon

Para la construcción de las isotermas de adsorción de PCF en PUF y en fibra de nylon se pesaron diferentes masas, las cuales fueron de 0.05-1 g para el PUF y de 0.04-4.15 g para la fibra de nylon. Cada una de las masas se colocó en matraces Erlenmeyer de 250 mL, el PUF contenía 50 mL de medio Merlin-Norkrans (M-N) con 250 mg PCF L⁻¹, y la fibra contenía 100 mL del mismo medio con 200 mg PCF L⁻¹. Las unidades experimentales (matraces con PUF ó fibra de nylon, medio y PCF) se mantuvieron en agitación a 200 rpm y a una temperatura de 30 ± 1°C por un periodo de 5 días. Después del periodo de incubación los soportes fueron exprimidos y se tomaron 2 mL de cada unidad experimental, se centrifugaron a 1400 rpm por 30 min y se filtraron con membranas con un tamaño de poro de 0.22 µm. Una vez filtradas las muestras se diluyeron con agua milliQ; 1:10 veces para las muestras de fibra de nylon, y como se muestra en la tabla 6.2 para las muestras de PUF. Se cuantificó el PCF presente en el medio, no adsorbido, por HPLC obteniendo así las concentraciones de PCF en el equilibrio (C_e) para cada una de las masas de los soportes. A partir de las C_e y considerando las concentraciones iniciales de PCF se calcularon las capacidades de adsorción de PCF en el equilibrio (q_e). Las q_e se graficaron contra las C_e para obtener las isotermas de adsorción de PCF en los soportes. Cada una de las isotermas de adsorción de PCF se realizó por duplicado.

Tabla 6.2 Diluciones realizadas en la isoterma de adsorción de PCF en PUF.

Masa de PUF (g)	Dilución
0.05	(1:4)
0.1	(1:5)
0.15	(1:5)
0.25	(1:5)
0.3	(1:10)
0.4	(1:10)
0.5	(1:10)
1	(1:10)

6.4 Microorganismo

Se utilizó como microorganismo modelo para la inmovilización a *Rhizopus oryzae* ENHE.

6.5 Propagación y conservación de *R. oryzae* ENHE

La propagación de *R. oryzae* ENHE se realizó en PDA (Agar Dextrosa y Papa) 39 g L⁻¹ a una temperatura de incubación de 30 ± 1°C hasta su esporulación (4-5 días). Para la conservación se colocó esporas con glicerol al 40% (v/v) a -20°C.

6.6 Concentración de esporas de *R. oryzae* ENHE

Las esporas asexuales de *R. oryzae* ENHE se concentraron en una solución estéril de Tween 80 al 1 % (v/v) en agua por medio de agitación y se realizó un conteo por medio de la cámara de Neubauer.

6.7 Medios de cultivo

6.7.1 Medio Merlin-Norkrans (M-N)

La composición del medio M-N (León-Santiesteban y col., 2008) para un litro fue: 10 g de glucosa, 2 g de extracto de Malta, 1 g de extracto de levadura, 0.5 g de KH₂PO₄, 0.15 g de MgSO₄•7H₂O y 0.5 g de (NH₄)₂HPO₄. Se adicionó al medio una solución amortiguadora de citratos pH 5.5-5.8. Para un litro de medio fue necesario 500 mL de agua y 500 mL del amortiguador de citratos (relación 50:50).

Amortiguador de citratos pH 5.5-5.8

Solución A: Ácido cítrico monohidratado 0.1 M

Solución B: Citrato de sodio 0.1 M

Para alcanzar un pH 5.3-5.8 se adicionaron 137 mL de la solución A, 363 mL de la solución B y se aforó a 500 mL con H₂O.

6.7.2 Medio de cultivo empleado para la inmovilización de *R. oryzae* ENHE

Se utilizó el medio M-N doblemente concentrado (2X). Todos los componentes del medio se utilizaron al doble de la concentración original, excepto la fuente de carbono (glucosa) que se utilizó con una concentración de 25 g L⁻¹.

6.8 Condiciones de cultivo para la inmovilización de *R. oryzae* ENHE

6.8.1 Crecimiento en cultivo sumergido

Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 mL de medio M-N, los cuales fueron inoculados con 1x10⁶ esporas mL⁻¹. Los matraces ya inoculados se mantuvieron en incubación a 30 ± 1°C con una velocidad de agitación de 200 rpm.

6.8.2 Crecimiento en los soportes de inmovilización

Se utilizó medio M-N 2X el cual fue inoculado con 1x10⁷ esporas mL⁻¹. La retención de agua utilizada para el crecimiento fue de 85% y 55% para el PUF y la fibra de nylon, respectivamente. Los cubos fueron empapados con el medio inoculado y 6 g de este medio sólido fueron colocados en matraces Erlenmeyer de 250 mL, y se recubrieron con papel aluminio y parafilm (Miranda, 2008). Los soportes ya inoculados se mantuvieron en incubación a 30 ± 1°C.

6.9 Observaciones morfológicas del crecimiento de *R. oryzae* ENHE inmovilizado en PUF y fibra de nylon

Las observaciones morfológicas del crecimiento de *R. oryzae* ENHE inmóvil en PUF y fibra de nylon se realizaron cada 24 h hasta las 72 h con un microscopio de contraste de fases con un aumento de 10x. Se utilizó PUF y fibra de nylon saturados con PCF, así como PUF y fibra de nylon sin PCF como control. Se consideraron saturados los soportes con PCF cuando el PCF adsorbido por el PUF y la fibra de nylon alcanzó las concentraciones de PCF relacionadas con las capacidades máximas de adsorción de PCF del PUF y de la fibra de nylon (q_m) obtenidas a partir de las isothermas de sorción de PCF. La tabla 6.3

muestra las concentraciones de PCF utilizadas para observar morfológicamente el crecimiento de *R. oryzae* ENHE, así como, la retención de agua utilizada para su crecimiento. Se utilizó un tamaño de inóculo de 1×10^7 esporas mL^{-1} en medio M-N 2X.

Tabla 6.3 Soportes sintéticos y concentraciones de PCF utilizadas para la observación morfológicas de *R. oryzae* ENHE inmovilizado.

Soporte sintético	Retención de agua	Capacidad de adsorción máxima de PCF (saturación)	Masa del soporte sintético
<i>PUF</i>	85 %	338.2 mg PCF g^{-1} PUF	0.3 g
<i>Fibra de nylon</i>	55 %	3.0 mg PCF g^{-1} nylon	2.21 g

6.10 Efecto de la concentración de PCF sobre el crecimiento de *R. oryzae* ENHE en fibra de nylon

El efecto del PCF sobre el crecimiento de *R. oryzae* ENHE se estudió en fibra de nylon, ya que, fue el soporte que menor capacidad máxima de adsorción de PCF (3.0 mg PCF g^{-1} nylon) presentó y además fue el soporte que aparentemente presentó las mejores condiciones físicas para el crecimiento de *R. oryzae* ENHE (Ej. mayor espacio interno y menor pérdida de humedad).

Se utilizaron tres tratamientos y un control. El primer tratamiento consistió en fibra de nylon sin saturar (sin PCF adsorbido) a la cual se le adicionó medio de cultivo inóculo con esporas de *R. oryzae* ENHE más 7 mg PCF L^{-1} . El segundo tratamiento consistió en fibra de nylon saturada con PCF (3.0 mg PCF g^{-1} nylon) a la cual se le adicionó medio de cultivo inóculo con esporas de *R. oryzae* ENHE. El tercer tratamiento también con fibra de nylon saturada con PCF se le adicionó medio de cultivo inóculo con esporas de *R. oryzae* ENHE más 14 mg PCF L^{-1} . Y finalmente un cultivo control con fibra de nylon sin saturar, es decir sin PCF, a la cual se le adicionó medio de cultivo inóculo con esporas de *R. oryzae* ENHE. En todos los tratamientos el crecimiento de *R. oryzae* ENHE se realizó con una retención de agua del 55%, y un tamaño de inóculo de 1×10^7 esporas mL^{-1} en medio M-N 2X. Para cada una de las cinéticas de crecimiento se tomaron muestras de 2.5 g de fibra de nylon (con micelio inmovilizado) cada 12 h hasta las 48 h de cultivo. Las fibras de nylon con el micelio inmovilizado se secaron por 48 h a 60°C , para posteriormente cuantificar la glucosamina de la pared celular de *R. oryzae* ENHE. Todas las cinéticas de crecimiento se realizaron por triplicado.

6.11 Remoción de PCF en cultivo sumergido con *R. oryzae* ENHE inmovilizado en fibra de nylon saturada con PCF

Se utilizaron dos concentraciones iniciales de PCF, las cuales fueron: 12.5 y 25 mg L⁻¹. Debido a que la fibra de nylon (2.5 g) por si sola adsorbe PCF fue necesario saturarla con PCF (3.0 mg PCF g⁻¹ nylon) antes de inocularla con esporas. La inmovilización de *R. oryzae* ENHE se realizó de igual forma a lo descrito en las secciones 6.9 y 6.10. Una vez inmovilizado *R. oryzae* ENHE en las fibras de nylon saturadas con PCF, éstas se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 100 mL de medio M-N y la concentración inicial de PCF. Las cinéticas de remoción de PCF se realizaron por triplicado y se mantuvieron a 200 rpm y a una temperatura de 30 ± 1°C por 96 h. Para seguir la remoción del PCF inicial por la biomasa inmóvil de *R. oryzae* ENHE en fibra de nylon saturada con PCF se tomaron muestras tanto del medio de cultivo (extracto Directo) como de la biomasa inmóvil (extracto de Biomasa) cada 24 h para la cuantificación del PCF residual por HPLC. Se consideró como PCF residual, al PCF que no fue removido por *R. oryzae* ENHE inmóvil en fibra de nylon saturada con PCF. La suma del PCF en estos dos extractos se consideró como el PCF residual.

6.12 Técnicas analíticas

6.12.1 Retención de agua de los soportes sintéticos

La retención de agua se determinó por diferencia de pesos entre los soportes húmedos y los soportes secos. Y se expresó en términos de porcentaje. Se pesó 0.15 g PUF, y 1.3 g de fibra de nylon. Después de pesados los soportes se humedecieron en agua destilada aproximadamente 30 s. Posteriormente se colocaron en columnas de vidrio de 18 cm de longitud por 2.5 cm de diámetro, y se permitió que el exceso de agua que contenían los soportes se escurriera de ellos por gravedad por 5 min, quedando solamente la cantidad de agua que fue retenida por los soportes. El porcentaje de retención de agua del PUF y fibra de nylon se calculó de la siguiente forma:

$$\left(\frac{SH-SS}{SH}\right) * 100 = \%R_A \quad (27)$$

Donde SH es el peso del soporte húmedo (g), SS es el peso del soporte seco (g) y $\%R_A$ es el porcentaje de retención de agua por capacidad.

6.12.2 Estimación de Biomasa

6.12.2.1 Determinación de crecimiento por el método de glucosamina

La pared celular de los hongos contiene quitina. La quitina es un polisacárido resistente pero flexible, que contiene nitrógeno y que consta de residuos de N-acetil glucosamina. La cuantificación de la N-acetil glucosamina, por lo tanto, se puede utilizar como una medida indirecta del crecimiento de los hongos. Esta técnica se basa en la hidrólisis ácida de la quitina de la pared celular del hongo para liberar la N-acetil glucosamina. Ya liberada la N-acetil glucosamina se le hace reaccionar con acetilacetona para formar un compuesto pirrólico. Este compuesto pirrólico a su vez se hace reaccionar con p-dimetilamino benzaldehído (PDBA) para formar un compuesto de color rojo con una absorbancia máxima de 530 nm.

La metodología para la determinación de glucosamina de la pared celular de *R. oryzae* ENHE fue de acuerdo a lo descrito por Tomaselli y col., 2001; Marcial y col., 2006. El procedimiento experimental para la determinación de glucosamina fue el siguiente:

- 1) Se tomó una muestra de 2.5 g de nylon con micelio de *R.oryzae* ENHE inmóvil seco (el soporte con el micelio se secó previamente a 60°C durante 48 h)
- 2) La biomasa seca inmóvil se incubó a 30°C con 5 mL de H₂SO₄ al 72% (v/v) y se agitó a 200 rpm por 30 min.
- 3) Posteriormente se diluyó con 54 mL de H₂O.
- 4) La mezcla anterior se hidrolizó en un autoclave por 1 h a 121°C (1.1 atmosferas).
- 5) La mezcla hidrolizada se filtró al vacío con papel filtro del número 44.
- 6) La mezcla hidrolizada filtrada se neutralizó (pH 7) con NaOH al 10 M y 0.5 M.
- 7) La mezcla neutralizada se centrifugó a 1400 rpm por 30 min.

- 8) De la mezcla neutralizada centrifugada se tomó 2 mL; que se hicieron reaccionar con 1 mL de reactivo A¹.
- 9) Posteriormente se agregó 1 mL de agua destilada y la mezcla se mantuvo en un baño de agua caliente (en ebullición) por 15 min.
- 10) Después del baño de agua caliente la mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo.
- 11) A la mezcla de reacción fría se le agregaron 4 mL de etanol, 1 mL de reactivo B² y finalmente 1 mL de etanol (todas las soluciones se agregaron en ese orden).
- 12) La mezcla resultante se agitó en 30 s en vortex y se mantuvo en la oscuridad por 1 h.
- 13) Terminado el tiempo de reposo se leyó la absorbancia a 530 nm.

El tratamiento control (blanco) consistió en 2.5 g de fibra de nylon seca (a 60°C durante 48 h) sin inoculo de *R. oryzae* ENHE a la cual se le aplicó la metodología antes descrita.

6.12.3 Curvas patrón de glucosamina

6.12.3.1 Curva patrón de glucosamina comercial

Se realizó una curva patrón de glucosamina comercial SIGMA (por duplicado) para posteriormente determinar la glucosamina de la pared celular de *R. oryzae* ENHE. Para la construcción de la curva patrón se utilizó una solución stock de 1 mg glucosamina mL⁻¹. Las concentraciones finales de glucosamina para la curva se muestran en la tabla 6.4.

Tabla 6.4 Concentraciones finales de glucosamina comercial SIGMA.

Tubo	Volumen de solución stock de glucosamina (mL)	Volumen de H ₂ O _d (mL)	[glucosamina] _{final} (mg mL ⁻¹)
0	0	5	0
1	0.1	4.9	0.02
2	0.2	4.8	0.04
3	0.3	4.7	0.06
4	0.4	4.6	0.08
5	0.5	4.5	0.1

La metodología para realizar la curva patrón fue exactamente igual que de descrita en el apartado anterior, sin embargo, en este caso se partió del punto ocho de la metodología antes descrita.

¹ Solución A: 1 mL de Acetilacetona disuelto en 50 mL de Carbonato de sodio (Na₂CO₃) 0.5 N.

² Solución B: 0.8 g de p-Dimetilamino benzaldehído (PDBA) disuelto en 30 mL de HCl 12 N y 30 mL de etanol.

6.12.3.2 Curva patrón de glucosamina de la pared celular del micelio de *R. oryzae* ENHE

Para poder determinar la cantidad de biomasa de *R. oryzae* ENHE inmovilizada en fibra de nylon en términos de glucosamina fue necesario realizar una segunda curva patrón (por triplicado). Esta curva patrón se realizó variando la cantidad de biomasa de *R. oryzae* ENHE (mg) en función de la cantidad de glucosamina (μg) presente en ella. Las masas de micelio seco de *R. oryzae* ENHE utilizadas para realizar esta curva patrón fueron: 10, 25, 50, 75, 100, 150 mg.

6.12.3.3 Cinética de crecimiento de *R. oryzae* ENHE en cultivo sumergido

Antes de poder construir la curva patrón de glucosamina de la pared celular del micelio de *R. oryzae* ENHE fue necesario estudiar el comportamiento de la glucosamina de *R. oryzae* ENHE en función del tiempo, por lo que, se realizó una cinética de crecimiento de *R. oryzae* ENHE en cultivo sumergido (por triplicado). La cinética de crecimiento duró 144 h y se tomaron muestras cada 24 h. La biomasa de cada matraz fue recuperada por filtración y lavada con H_2O , posteriormente se secó a 60°C por 48 h. Una vez seca se tomó 100 mg de biomasa para realizar la cuantificación de glucosamina.

6.12.4 Extracción de PCF

6.12.4.1 Extracto directo

El extracto directo se consideró como el medio de cultivo libre de biomasa que contenía PCF sin degradar. Para obtener este extracto, el medio de cultivo con PCF se filtró al vacío con papel filtro del número 44, y posteriormente se le ajustó el pH a 7.0.

El tratamiento control (blanco) para el extracto directo consistió en medio M-N sin PCF y sin inóculo de *R. oryzae* ENHE. Los tratamientos control, al igual que los extractos directos con PCF, se filtraron al vacío, y se les ajustó el pH a 7.0.

6.12.4.2 Extracto de biomasa

Se utilizó un extracto de biomasa para cuantificar el PCF sorbido, no degradado, por la biomasa de *R. oryzae* ENHE inmovilizada en fibra de nylon saturada con PCF. Para obtener el extracto de biomasa se separó la biomasa inmóvil del medio de cultivo, se lavó con H_2O

y se re-suspendió en 50 mL de solución de carbonatos pH 10.5. Posteriormente se sonicó en un Sonicador Branson Ultrasonics 1210 durante 30 min. Terminado el tiempo de sonicación la solución se filtró al vacío con papel filtro del número 44, y se le ajustó el pH a 7.0.

En el extracto de biomasa el tratamiento control (blanco) consistió solamente en 50 mL de solución de carbonatos pH 10.5, sonicada y filtrada al vacío, a la cual se le ajustó el pH a 7.0.

Solución de carbonatos pH 10.5

Solución I: Carbonato de sodio anhidro 0.2 M

Solución II: Bicarbonato de sodio 0.2 M

Para alcanzar un pH 10.5 se adicionaron 42.5 mL de la solución I, 7.5 mL de la solución II y se aforó a 200 mL con H₂O.

6.12.5 Cuantificación de PCF residual

La cuantificación de PCF se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En donde cada una de las muestras inyectadas en el HPLC fueron filtradas con membranas con un tamaño de poro de 0.22 μm . Para la calibración, se utilizaron una serie de soluciones de PCF (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 mg L⁻¹) diluyendo una solución stock de PCF con metanol grado reactivo (Anexo A). Se utilizó una columna de fase inversa, $\mu\text{Bondapak}^{\text{TM}}$ C-18, con tamaño de partícula de 10 μm y un tamaño de poro de 125 Å, un diámetro interno de 3.9 mm, y una longitud de 300 mm. El volumen de inyección fue de 20 μL que se eluyeron en la columna por medio de una elución isocrática con una velocidad de flujo de 1.5 ml min⁻¹ con la fase móvil; la cual estaba constituida de una solución de 1% de ácido acético en agua milliQ y una solución de 1% de ácido acético en acetronitrilo, en una relación de 75:25 v/v. El PCF fue detectado por un detector UV 996 WATERS, a 240 nm. Los resultados obtenidos fueron analizados por computadora empleando el paquete Millennium-WATERS, el cual considero la aérea del pico como el modo de medición.

7 Resultados

7.1 Retención de agua de los soportes sintéticos

La retención de agua por los soportes ensayados se expresó en términos de porcentaje. La tabla 7.1 resume los resultados experimentales obtenidos.

Tabla 7.1 Retención de agua del PUF y fibra de nylon.

Soportes	Peso del soporte (g)	Porcentaje de retención de agua promedio (% R_A)	Desv. típ.	Intervalo de confianza 95%	
				Inferior	Superior
PUF	0.15	86.1	1.00	83.65%	88.62%
F. nylon	1.3	53.1	1.18	50.17%	56.03%

Se puede observar que el PUF es el soporte con la mayor capacidad de retención de agua de los dos soportes probados, con un porcentaje de retención de agua promedio de 86.1%, seguido por la fibra de nylon con 53.1%. Se tiene una confianza del 95% de que la capacidad de retención de agua del PUF se encuentra entre el 86.65% y 88.62%, mientras que la capacidad de retención de agua de la fibra de nylon se encuentra entre el 50.17% y 56.03%.

7.2 Adsorción del PCF en PUF y fibra de nylon

7.2.1 Cinética de adsorción de PCF en PUF y fibra de nylon

La interpretación de los resultados cinéticos se realizó en base a los modelos de pseudo-primer orden (Lagergren, 1898) y pseudo-segundo orden (Ho, 2006). En la tabla 7.2 se muestran las ecuaciones de velocidad de adsorción, los parámetros de adsorción y las formas linearizadas de las expresiones de velocidad utilizadas para la interpretación de los resultados experimentales.

Tabla 7.2 Representaciones matemáticas de la velocidad de adsorción de Lagergren y Ho, así como, sus formas linearizadas.

Cinética de adsorción	Expresión de velocidad	Forma linearizada
Lagergren	$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_e - q_t)$	$\log(q_e - q_t) = \log(q_e) - \frac{k_1}{2.303} t$
Ho	$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2$	$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t$

Para tener una mejor interpretación de los resultados experimentales cinéticos se utilizaron dos parámetros estadísticos, los cuales fueron: 1) el coeficiente de correlación (R^2), y 2) la

desviación estándar normalizada (Mathialagan y col., 2009), que se definió de la siguiente forma:

$$\Delta q(\%) = 100 * \sqrt{\frac{\sum[(q_{t,exp} - q_{t,cal})/q_{t,exp}]^2}{n-1}} \quad (28)$$

7.2.1.1 Cinética de adsorción de PCF en PUF

La cinética de adsorción de PCF en PUF se muestra en el gráfico 7.1.

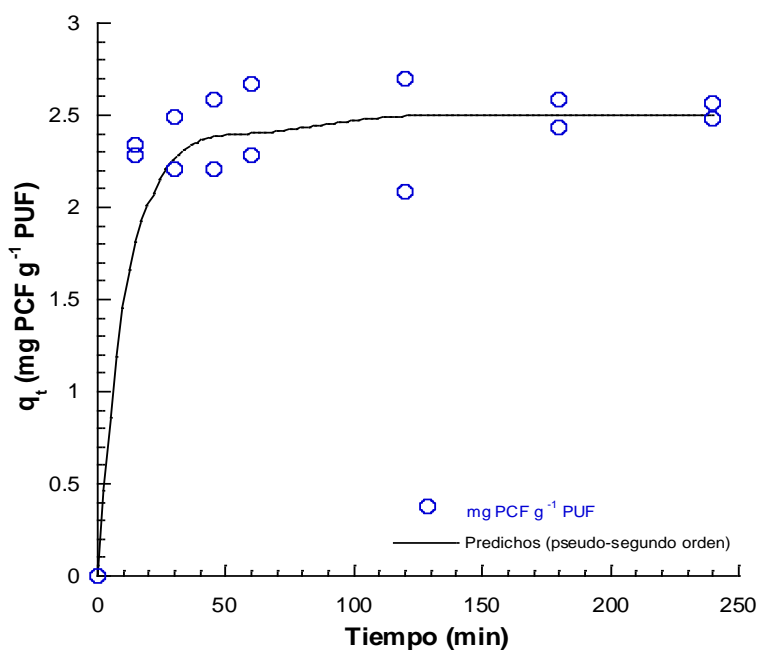


Gráfico 7.1 Efecto del tiempo de contacto sobre la adsorción de PCF en PUF, T=30°C; pH=5.3

Se puede observar que la adsorción de PCF es muy rápida, con un tiempo de equilibrio de aproximadamente 2 h. En los primeros 15 minutos se adsorbe el 75.9% de PCF inicial (50 mg L⁻¹). El gráfico 7.2 muestra la linearización de la ecuación de velocidad de adsorción descrita por el modelo de pseudo-segundo orden.

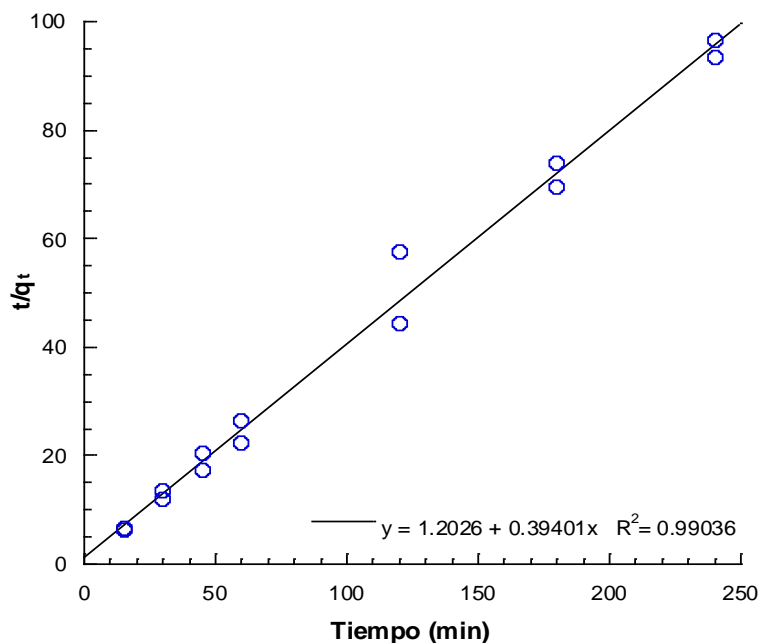


Gráfico 7.2 Linearización del modelo cinético de pseudo-segundo orden en la adsorción de PCF en PUF.

Con la linearización del modelo cinético de pseudo-segundo orden se observa un buen ajuste de los datos experimentales ($R^2=0.99$). Sin embargo, el modelo cinético de pseudo-primer orden mostró mal ajuste con los datos experimentales ($R^2=0.12$) por lo que se descartó como modelo cinético de adsorción de PCF en PUF (Anexo B). A partir del modelo de pseudo-segundo orden se encontró que la constante de velocidad fue $0.13 \text{ g PUF mg}^{-1} \text{ PCF min}^{-1}$, lo cual propició una alta velocidad de adsorción inicial de PCF en PUF, la cual fue $0.832 \text{ mg PCF g}^{-1} \text{ PUF min}^{-1}$ (tabla 7.3).

Tabla 7.3 Parámetros cinéticos y estadísticos de la linearización del modelo de pseudo-segundo orden en la adsorción de PCF en PUF.

Adsorbente	Modelo cinético de pseudo-segundo orden				
	k_2 (g/mg min)	q_e (mg/g)	h ($k_2 q_e^2$)	R^2	Δq (%)
PUF	0.13	25	0.832	0.99	8.5

7.2.1.2 Cinética de adsorción de PCF en fibra de nylon

La cinética de adsorción de PCF en fibra de nylon se muestra en el gráfico 7.3.

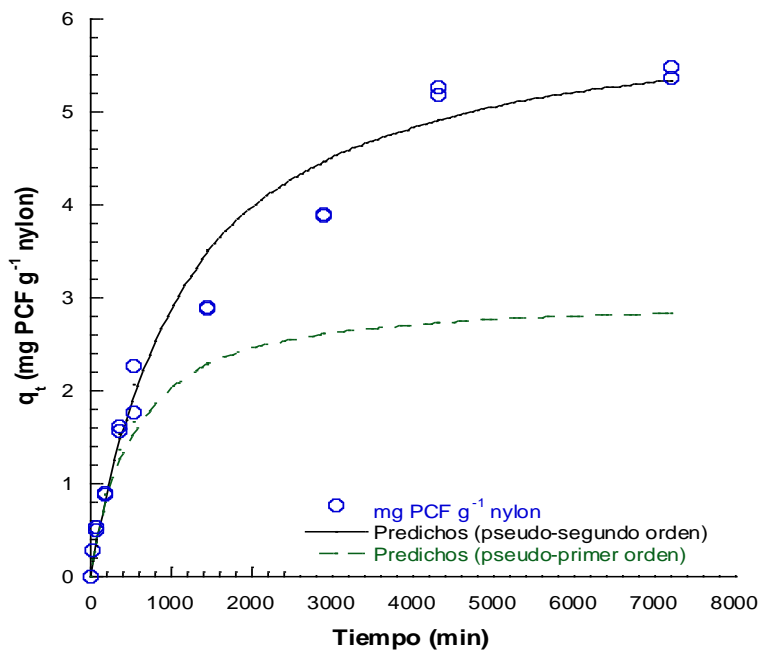


Gráfico 7.3 Efecto del tiempo de contacto sobre la adsorción de PCF en fibra de nylon, $T=30\pm 1^\circ\text{C}$; $\text{pH}=5.3$

Se observa que la adsorción de PCF en la fibra de nylon se lleva a cabo lentamente con un tiempo de equilibrio de aproximadamente 120 h, presentando una adsorción del 78.1% del PCF inicial (200 mg L^{-1}).

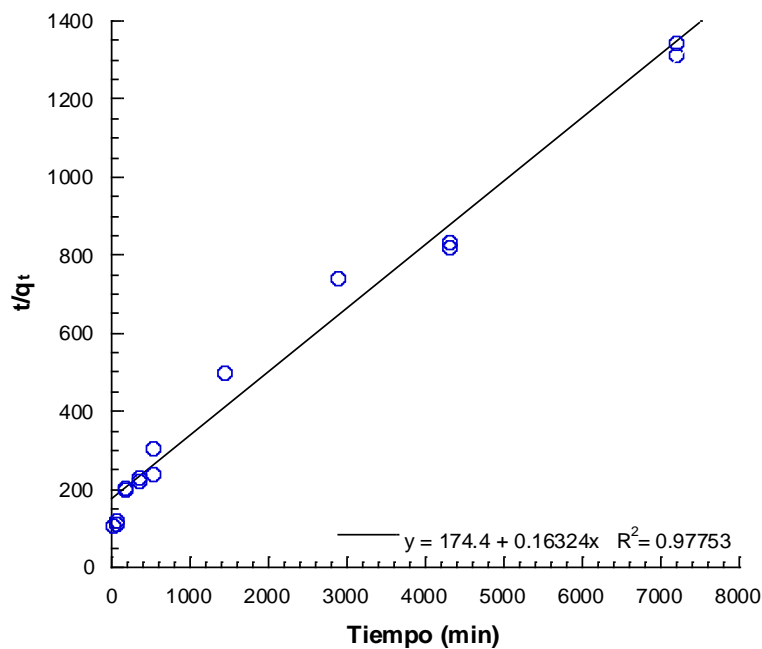


Gráfico 7.4 Linearización del modelo cinético de pseudo-segundo orden en la adsorción de PCF en fibra de nylon.

El gráfico 7.4 muestra la linearización del modelo de pseudo-segundo orden. A partir de esta gráfica se calcularon los parámetros cinéticos mostrados en la tabla 7.4. La adsorción de PCF en fibra de nylon fue lenta, su constante de velocidad de adsorción de pseudo-segundo fue $0.0002 \text{ g nylon mg}^{-1} \text{ PCF min}^{-1}$. La velocidad inicial de adsorción de PCF en fibra de nylon fue de $0.006 \text{ mg PCF g}^{-1} \text{ nylon min}^{-1}$.

En la tabla 7.4 se observa que los dos modelos cinéticos de adsorción presentan coeficientes de correlación altos y muy cercanos, por lo que, no se puede seleccionar un modelo cinético en base a este parámetro estadístico. Al utilizar la desviación estándar normalizada se observa que los datos experimentales presentan mayor variación con respecto a los valores predichos en el modelo cinético de pseudo-primero orden (22.0%), lo cual no sucede en el modelo de pseudo-segundo orden (19.8%). El modelo cinético de pseudo-primero orden describe bien la adsorción de PCF en fibra de nylon solamente durante los primeros 540 min. Sin embargo, el modelo cinético de pseudo-segundo orden describe el proceso completo de adsorción; hasta alcanzar el equilibrio (gráfico 7.3), por lo que se seleccionó a este modelo (Anexo B).

Tabla 7.4 Parámetros cinéticos y estadísticos de las linearizaciones de los modelos de pseudo-primero y segundo orden en la adsorción de PCF en fibra de nylon.

Adsorbente	Modelo cinético de pseudo-primero orden					Modelo cinético de pseudo-segundo orden				
	q_e^* (mg/g)	k_1 (min^{-1})	q_e (cal) ⁺ (mg/g)	R^2	Δq (%)	k_2 (g/mg min)	q_e (mg/g)	h ($k_2 q_e^2$)	R^2	Δq (%)
NYLON	3.0	0.002	3.1	0.99	22.0	0.0002	6.1	0.006	0.98	19.8

*Capacidad de adsorción máxima tomada de la isoterma de adsorción de PCF en fibra de nylon.

+Capacidad de adsorción máxima calculada a partir de la cinética de adsorción de pseudo-primero orden.

7.2.2 Isotermas de adsorción de PCF en PUF y fibra de nylon

Para el estudio de isotermas de adsorción de PCF en PUF y fibra de nylon la capacidad de adsorción se definió mediante el balance de masa de la ecuación 34 (Ip y col., 2009).

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e) \cdot V}{m} \quad (29)$$

Donde q_e (mg PCF g^{-1} adsorbente) y C_e (mg L^{-1}) representan la capacidad de adsorción y la concentración de PCF en la solución en el equilibrio, respectivamente; C_0 es la

concentración inicial de PCF (mg L^{-1}), V es el volumen de la solución (L), y m es la masa del adsorbente (g PUF o fibra de nylon).

Para ajustar los resultados experimentales de equilibrio de adsorción de PCF en PUF y fibra de nylon se utilizaron los modelos de isothermas de Langmuir (Langmuir, 1918) y Freundlich (Freundlich, 1906). Las ecuaciones de las isothermas junto con sus formas linearizadas se muestran en la tabla 7.5.

Tabla 7.5 Representaciones matemáticas de las isothermas de adsorción de Freundlich y Langmuir, así como, sus formas linearizadas.

Isoterma	Modelo	Forma linearizada
Freundlich	$q_e = K_F C_e^{1/n}$	$\log(q_e) = \log(K_F) + 1/n \log(C_e)$
Langmuir	$q_e = \frac{q_m K_a C_e}{1 + K_a C_e}$	tipo 1 $\frac{1}{q_e} = \left(\frac{1}{K_a q_m}\right) \frac{1}{C_e} + \frac{1}{q_m}$
		tipo 2 $\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_m} C_e + \frac{1}{K_a q_m}$

Al igual que en las cinéticas de adsorción, se utilizó el coeficiente de correlación y la desviación estándar normalizada como parámetros estadísticos.

A partir de la constante de equilibrio de adsorción (K_a) se calculó el término de factor de separación o constante de equilibrio R_L para indicar la naturaleza de la adsorción (Ahmaruzzaman y col., 2005).

Si $R_L > 1$; la adsorción del PCF es desfavorable.

Si $0 < R_L < 1$; la adsorción del PCF es favorable.

Si $R_L = 0$; la adsorción del PCF es irreversible.

Y si $R_L = 1$ la adsorción del PCF es lineal.

El factor de separación se definió como:

$$R_L = \frac{1}{1 + K_a C_0} \quad (30)$$

En donde K_a es la constante de equilibrio de adsorción (L mg PCF^{-1}) y C_0 es la concentración inicial del adsorbato (mg PCF L^{-1}).

7.2.2.1 Isoterma de adsorción de PCF en PUF

La tabla 7.6 muestra que todos los modelos de isothermas de adsorción se ajustan bien a los resultados experimentales (R^2 grandes), por lo que es difícil elegir un modelo solo por el coeficiente de correlación. Debido a esto, se utilizó a la desviación estándar normalizada para elegir el modelo de isoterma que mejor se ajuste a la adsorción de PCF en PUF. En el Anexo C se muestran los gráficos de las expresiones linearizadas de las isothermas de Freundlich y Langmuir para la adsorción de PCF en PUF, así como su análisis estadístico de regresión.

Tabla 7.6 Parámetros calculados utilizando los modelos de isothermas de adsorción de PCF en PUF.

Modelo de isoterma	Parámetros	Intervalo de confianza al 95%		R^2	$\Delta q(\%)$
		Inferior	Superior		
Freundlich	$K_F = 2.9$ $1/n = 0.82$	2.4 0.76	3.5 0.87	0.98	8.0
Langmuir (Linearización tipo II)	$K_a = 0.007$ $q_m = 268.6$	0.006 222.8	0.008 338.2	0.89	6.3
Langmuir (Linearización tipo I)	$K_a = 0.006$ $q_m = 347.9$	0.0001 175.17	0.0102 25716.78	0.98	7.2

Se puede observar que la menor desviación estándar normalizada la presenta la linearización de Langmuir tipo II (6.3%), seguida por la linearización de Langmuir tipo I (7.2%) y por último la linearización de Freundlich (8.0%). Esto indica que en la linearización de Langmuir tipo II los datos experimentales tiene menos variación entre sí. Por lo que, aunque sea la forma linearizada con menor coeficiente de correlación es la forma linearizada que mejor describe la adsorción de PCF en PUF. Es importante notar que en la linearización tipo II de Langmuir al tener la menor desviación estándar normalizada, los intervalos de confianza ($\alpha = 0.05$) de K_a y q_m se hacen más pequeños, en comparación con los parámetros de adsorción de las demás linearizaciones. Esto hace que la estimación de los parámetros de adsorción sea estadísticamente más confiable.

El gráfico 7.5 muestra la capacidad de adsorción de PCF experimental en PUF en función de la concentración de PCF en el equilibrio junto con las capacidades de adsorción predichas a partir de los parámetros de adsorción calculados. Para el PUF la máxima capacidad de adsorción promedio de PCF fue de 268.6 mg PCF g^{-1} PUF, por lo que se tiene

una confianza del 95% de que esta capacidad máxima de adsorción se encuentra entre 222.8 y 338.2 mg PCF g⁻¹ PUF.

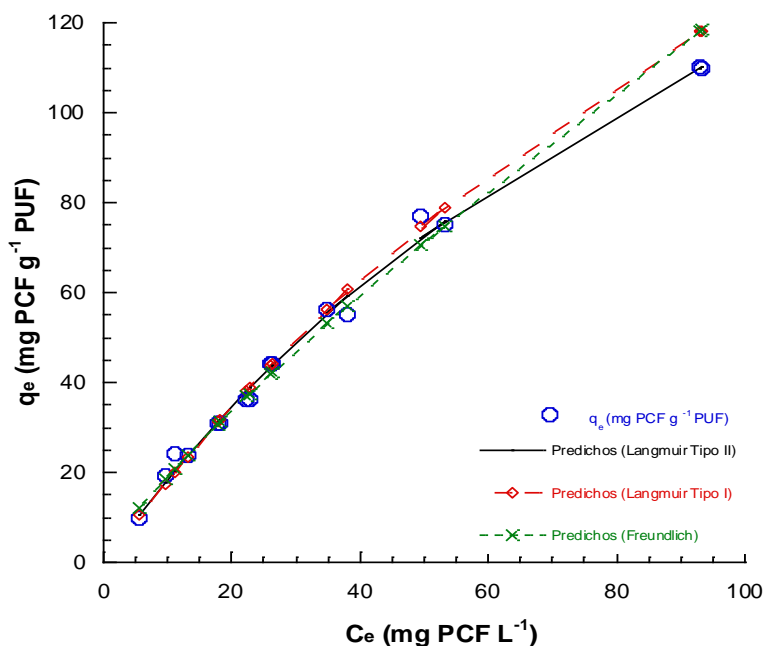


Gráfico 7.5 Capacidad de adsorción de PCF en PUF; T=30°C; pH=5.3

En esta adsorción de PCF en PUF se calculó el término de factor de separación (R_L) y se utilizó la constante de Langmuir obtenida a partir de la linearización tipo II. La R_L para la adsorción de PCF en PUF tuvo un valor promedio de 0.36, por lo que, se concluye que la adsorción de PCF en PUF es favorable.

7.2.2.2 Isoterma de adsorción de PCF en fibra de nylon

La tabla 7.7 muestra que el modelo de isoterma de adsorción de PCF que mejor se ajusta a los datos experimentales de adsorción de PCF en fibra de nylon es Langmuir con la linearización II ($R^2=0.95$), seguida de la linearización de Freundlich ($R^2=0.82$) y la linearización I de Langmuir ($R^2=0.80$). En el Anexo D se muestran los gráficos de las expresiones linearizadas de las isotermas de Freundlich y Langmuir para la adsorción de PCF en fibra de nylon, así como su análisis estadístico de regresión.

Tabla 7.7 Parámetros calculados utilizando los modelos de isotermas de adsorción de PCF en fibra de nylon.

Modelo de isoterma	Parámetros	Intervalo de confianza al 95%		R ²	Δq(%)
		Inferior	Superior		
Freundlich	$K_F = 0.5$	0.3	0.8	0.82	4.84
	$1/n = 0.33$	0.21	0.44		
Langmuir (Linearización tipo II)	$K_a = 0.03$	0.02	0.04	0.95	5.0
	$q_m = 3.0$	2.5	3.6		
Langmuir (Linearización tipo I)	$K_a = 0.03$	0.026	0.04	0.80	5.02
	$q_m = 2.9$	2.5	3.5		

En la adsorción de PCF en fibra de nylon, las desviaciones estándar normalizadas de las isotermas de Freundlich y Langmuir (tipo I y II) no tienen una gran diferencia entre sí, por lo que la variación de los datos experimentales con respecto a los valores predichos es prácticamente la misma para los tres modelos. En este caso la mejor isoterma de adsorción será la que presente el mayor coeficiente de correlación. El mayor coeficiente de correlación se encontró en la linearización tipo II de Langmuir ($R^2=0.95$), por lo que, el modelo que mejor describe la adsorción de PCF en fibra de nylon es el de Langmuir con la linearización tipo II.

El gráfico 7.6 muestra la capacidad de adsorción de PCF experimental en fibra de nylon en función de la concentración de PCF en el equilibrio junto con las capacidades de adsorción predichas a partir de los parámetros de adsorción calculados. Para la fibra de nylon la máxima capacidad de adsorción promedio de PCF fue de 3.0 mg PCF g⁻¹ nylon, por lo que se tiene una confianza del 95% de que la capacidad de adsorción máxima de PCF en fibra de nylon se encuentra entre 2.5 y 3.6 mg PCF g⁻¹ nylon.

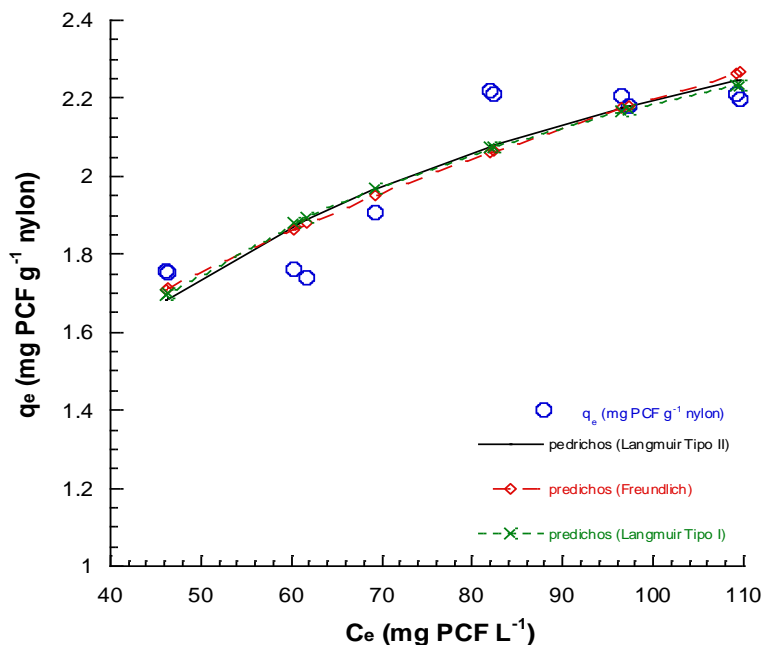


Gráfico 7.6 Capacidad de adsorción de PCF en nylon; T=30°C; pH=5.3

En esta adsorción de PCF en fibra de nylon, al igual que la adsorción de PCF en PUF, la R_L se calculó a partir de la isoterma de Langmuir con la linearización tipo II. La R_L promedio en fibra de nylon fue de 0.14, por lo que, la adsorción de PCF en fibra de nylon es favorable, el valor R_L cercano a 0 indica que la adsorción de PCF en fibra de nylon es un poco más fuerte que la adsorción de PCF en PUF, donde la R_L fue de 0.36.

7.3 Observaciones morfológicas del crecimiento de *R. oryzae* ENHE inmovilizado en PUF y fibra de nylon

El crecimiento de *R. oryzae* ENHE en PUF y fibra de nylon se realizó hasta las 72 h de cultivo, observando la morfología de *R. oryzae* ENHE cada 24 h con un microscopio de contraste de fases con un aumento de 10x. Se utilizaron dos condiciones de cultivo para las observaciones morfológicas de *R. oryzae* ENHE inmóvil en los dos soportes. En la primera condición de cultivo se utilizó PUF y fibra de nylon saturados con PCF, utilizando las concentraciones de PCF derivadas de las capacidades máximas de adsorción de PCF del PUF y la fibra de nylon (q_e) obtenidas a partir de las isotermas de adsorción de PCF; y en la segunda condición de cultivo se utilizó PUF y fibra de nylon sin PCF, como cultivos control.

7.3.1 Crecimiento de *R. oryzae* ENHE en PUF

La figura 7.1 muestra el crecimiento de *R. oryzae* ENHE inmovilizado en PUF a través del tiempo.

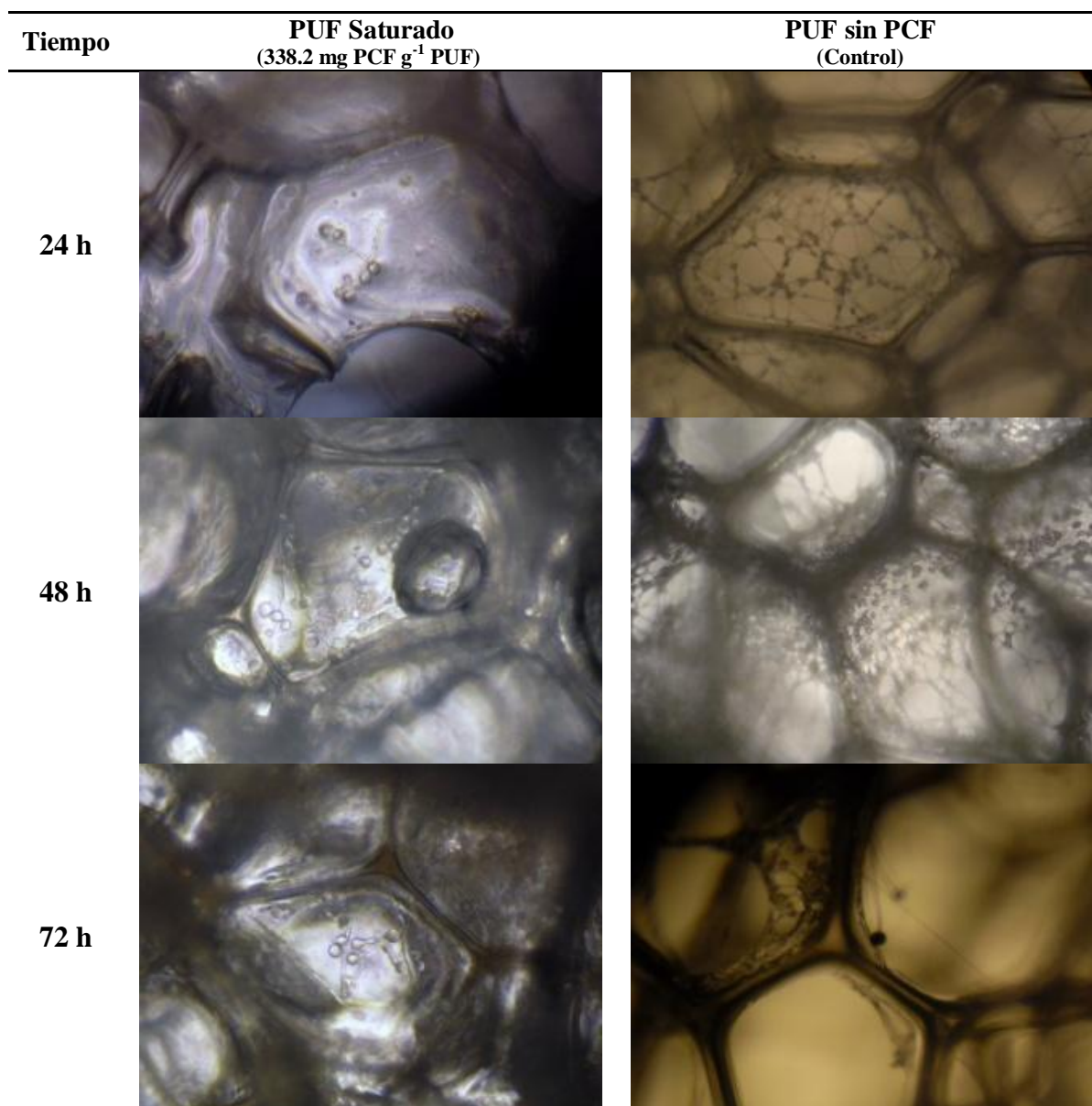


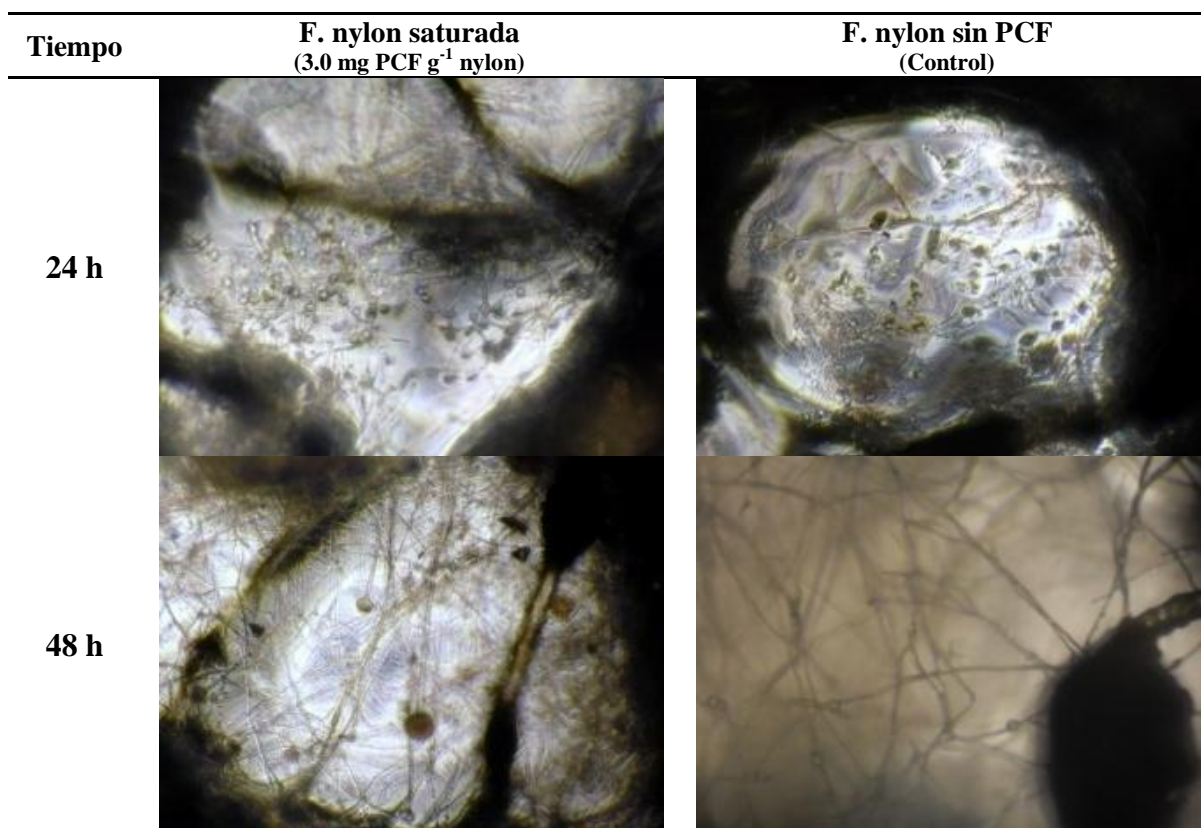
Figura 7.1 Imágenes de *R. oryzae* ENHE inmovilizado en PUF (saturado con PCF y sin PCF) a través del tiempo. Fotografías tomadas en un microscopio de contraste de fases con un objetivo de 10x.

Se observó a las 24 h en los cultivos control que las esporas de *R. oryzae* ENHE germinaron y formaron hifas las cuales formaron estructuras de red. En cambio, en el PUF saturado con PCF las esporas de *R. oryzae* ENHE apenas comenzaron a germinar, y se

observó poco micelio. A las 48 h en los cultivos control hubo mucho más presencia de redes de hifas, de hecho, se pudo apreciar que los poros del PUF estaban completamente invadidos de micelio. En cambio, en el PUF saturado con PCF el crecimiento se mantuvo prácticamente igual que en las 24 h. En las 72 h en los cultivos control se empezaron a formar los primeros esporangios, lo cual indica la reproducción asexual de *R. oryzae* ENHE y la formación de esporangiosporas. Finalmente, los cultivos con PUF saturado con PCF siguieron sin presentar crecimiento. Con esto se demostró que el PCF adsorbido en el PUF inhibe fuertemente el crecimiento de *R. oryzae* ENHE.

7.3.2 Crecimiento de *R. oryzae* ENHE en fibra de nylon

La figura 7.2 muestra el crecimiento de *R. oryzae* ENHE inmovilizado en fibra de nylon a través del tiempo.



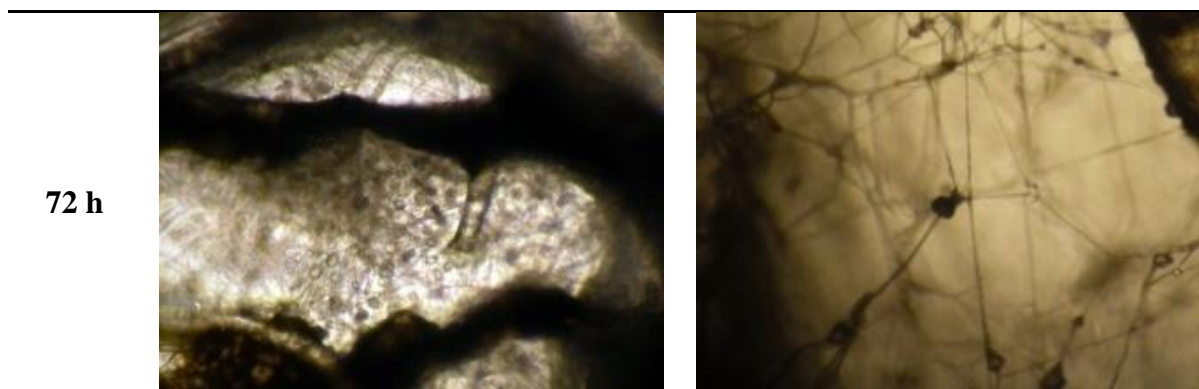


Figura 7.2 Imágenes de *R. oryzae* ENHE inmovilizado en fibra de nylon (saturada con PCF y sin PCF) a través del tiempo. Fotografías tomadas en un microscopio de contraste de fases con un objetivo de 10x.

Se observó a las 24 h que las esporas de *R. oryzae* ENHE habían germinado completamente en las dos condiciones de cultivo. A las 48 h en las dos condiciones de cultivo las hifas de *R. oryzae* ENHE invadieron completamente el espacio interno de la fibra de nylon formando estructuras en forma de red. El crecimiento fue muy similar en los cultivos con fibra de nylon saturada con PCF en comparación con los cultivos control. Sin embargo, en las fibras de nylon saturadas con PCF se formaron los primeros esporangios. Para las 72 h el crecimiento en las dos condiciones de cultivo permaneció prácticamente sin cambios, excepto en los cultivos control, que presentaron la formación de esporangios.

Debido a que se observó cualitativamente mayor crecimiento de *R. oryzae* ENHE en la fibra de nylon, en comparación con el PUF, y además menor capacidad de adsorción de PCF en comparación con la del PUF, se decidió utilizar la fibra de nylon saturada con PCF como soporte para la inmovilización del hongo, y así estudiar la remoción de PCF en cultivos sumergidos.

7.4 Estimación de Biomasa

Antes de determinar el crecimiento de *R. oryzae* ENHE en fibra de nylon, se realizó una cinética de crecimiento en cultivo sumergido para observar aumento o variación de la concentración de glucosamina del micelio de *R. oryzae* ENHE con respecto al tiempo (Anexo E). De esta cinética se observó que la glucosamina de la pared celular del micelio de *R. oryzae* ENHE no cambia con respecto al tiempo y se mantiene constante por lo menos hasta las 144 h de cultivo. Considerando esta información se tomó biomasa de *R. oryzae*

ENHE con una edad de 48 h para construir la curva patrón de glucosamina de *R. oryzae* ENHE (Anexo F) que se utilizó para determinar el crecimiento de *R. oryzae* ENHE inmovilizado en fibra de nylon.

7.4.1 Efecto de la concentración de PCF sobre el crecimiento de *R. oryzae* ENHE en fibra de nylon

El efecto del PCF sobre el crecimiento de *R. oryzae* ENHE en fibra de nylon se puede observar en el gráfico 7.7. En cada una de las cinéticas de crecimiento de *R. oryzae* ENHE en fibra de nylon mostradas en el gráfico, se utilizó medio M-N 2X (25 g glucosa L⁻¹) y una capacidad de retención de agua del 55%.

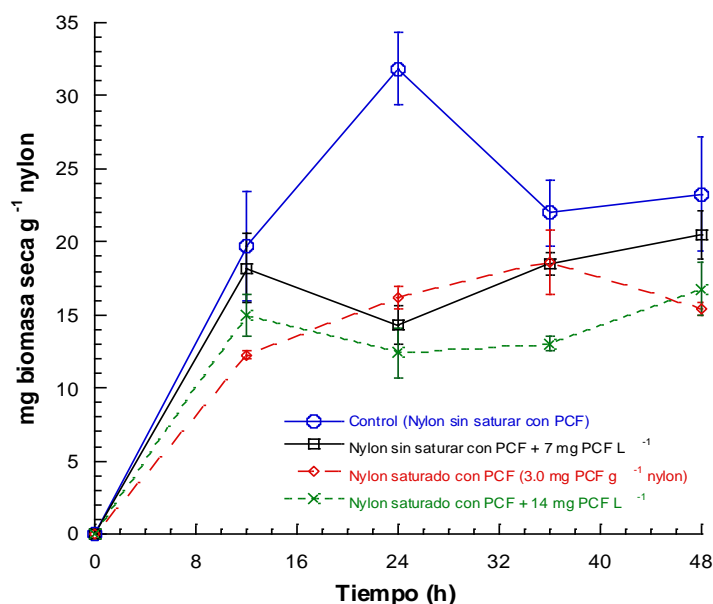


Gráfico 7.7 Cinéticas de crecimiento de *R. oryzae* ENHE en fibra de nylon con diferentes concentraciones de PCF.

Los resultados del gráfico 7.7 indican una fuerte inhibición del crecimiento de *R. oryzae* ENHE por la presencia del PCF, ya que en los cultivos control (sin PCF) se observó el mayor crecimiento, el cual fue en promedio 31.86 ± 2.45 mg biomasa seca g⁻¹ nylon a las 24 h de cultivo, mientras que en los cultivos con PCF el máximo crecimiento se encontró entre 20 y 16 mg biomasa seca g⁻¹ nylon, es decir 1.77 veces menor que los cultivos control. Los cultivos con PCF presentan perfiles de crecimiento similares. Los cultivos con fibra de nylon saturada con PCF más 14 mg PCF L⁻¹ presentaron la menor cantidad de biomasa producida, la máxima fue de 16.76 ± 1.83 mg biomasa seca g⁻¹ nylon alcanzada

hasta las 48 h de cultivo, es decir 1.39 veces menor que los cultivos control. Los cultivos con fibra de nylon sin saturar más 7 mg PCF L^{-1} y los cultivos con fibra de nylon saturada con PCF tuvieron un comportamiento similar, pero el crecimiento fue más rápido en los cultivos con 7 mg PCF L^{-1} ; a las 12 h ya había en promedio $18.2 \pm 2.36 \text{ mg biomasa seca g}^{-1} \text{ nylon}$, mientras que en los cultivos saturados con PCF solamente se determinaron $12.25 \pm 0.25 \text{ mg biomasa seca g}^{-1} \text{ nylon}$. Después de las 12 h, los cultivos con 7 mg PCF L^{-1} y con fibra de nylon saturada con PCF presentaron la misma producción de biomasa, hasta las 48 h; donde la biomasa producida en la fibra de nylon saturada con PCF disminuyó 1.33 veces en comparación con la biomasa producida con 7 mg PCF L^{-1} .

7.5 Remoción de PCF en cultivos sumergidos con *R. oryzae* ENHE inmovilizado en fibra de nylon saturada con PCF

Se determinó la capacidad que tiene *R. oryzae* ENHE inmovilizado en fibra de nylon saturada con PCF ($3.0 \text{ mg PCF g}^{-1} \text{ nylon}$) para remover PCF en cultivos sumergidos con medio M-N ($10 \text{ g glucosa L}^{-1}$). Se probaron dos concentraciones iniciales de PCF, las cuales fueron 12.5 y 25 mg L^{-1} . En el gráfico 7.8 se muestran los perfiles de remoción de PCF a través del tiempo. En donde, el PCF residual se consideró como la suma del PCF cuantificado en los extractos libres y de biomasa.

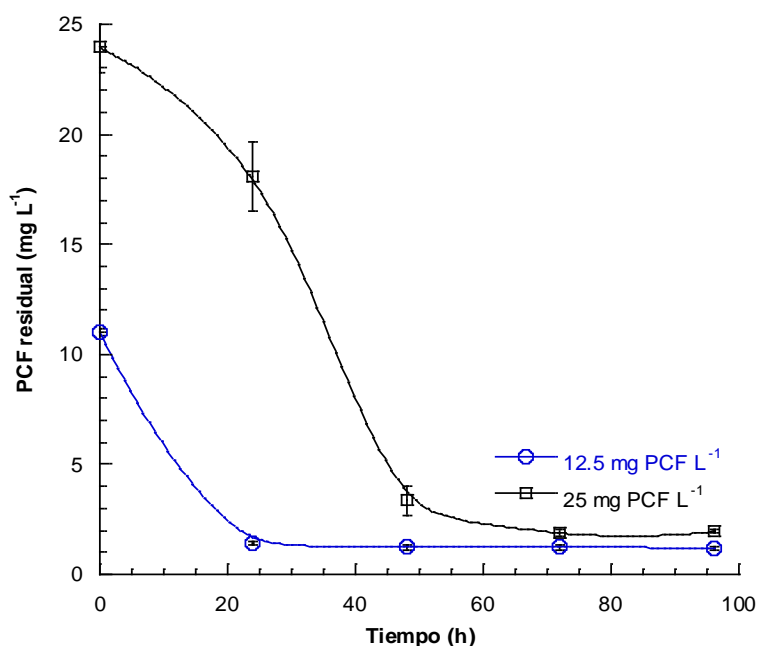


Gráfico 7.8 Cinéticas de remoción de PCF en cultivo sumergido con *R. oryzae* ENHE inmovilizado en fibra de nylon saturada con PCF.

Los resultados de la remoción indican, que no se alcanza una remoción total del PCF en los cultivos líquidos, con ninguna de las concentraciones iniciales de PCF. Una vez alcanzada la remoción máxima, la concentración del PCF residual permanece constante. A las 24 h, los cultivos con una concentración inicial de 12.5 mg PCF L⁻¹ habían alcanzado su máxima remoción, la cual fue en promedio el $87 \pm 1.04\%$ del PCF inicial, mientras que los cultivos con la concentración inicial de 25 mg PCF L⁻¹ solo habían alcanzado una remoción promedio del $23.3 \pm 6.72\%$. A las 72 h se alcanzó la máxima remoción de PCF en los cultivos con 25 mg PCF L⁻¹, la cual fue en promedio el $92 \pm 0.78\%$ del PCF inicial. Con la concentración inicial de 25 mg PCF L⁻¹ la tasa de remoción promedio obtenida fue de 0.6 mg PCF L⁻¹ h⁻¹, mientras que con una concentración inicial de 12.5 mg PCF L⁻¹, la tasa de remoción promedio fue de 0.4 mg PCF L⁻¹ h⁻¹. Aunque la remoción máxima del PCF en los cultivos con 12.5 mg PCF L⁻¹ fue en 24 h; la remoción del PCF en los cultivos con la concentración inicial de 25 mg PCF L⁻¹ fue 1.5 veces más rápida, que la remoción con la menor concentración inicial de PCF.

8 Discusión

En este estudio se utilizó la espuma de poliuretano (PUF) y la fibra de nylon como soportes para la inmovilización de *R. oryzae* ENHE, con la finalidad de remover PCF presente en medio líquido. Sin embargo, independientemente de la remoción biológica causada por *R. oryzae* ENHE, los soportes sintéticos removieron PCF del medio líquido por factores abióticos, como la sorción. Debido a que es difícil extraer el PCF de los soportes para su cuantificación total, se decidió como alternativa, saturar al PUF y la fibra de nylon con PCF, con la finalidad de eliminar la pérdida de PCF debida a la sorción. Inicialmente se había contemplado que la desaparición abiótica del PCF era debida solamente al fenómeno de adsorción, sin embargo, es posible que el PCF también pueda ser absorbido por los soportes sintéticos. Es por esto que se decidió utilizar el término sorción, que engloba la desaparición de PCF por adsorción y absorción, en lugar del término adsorción. Para caracterizar el fenómeno de sorción se utilizaron los modelos cinéticos de pseudo-primer y pseudo-segundo orden, y las isothermas de Freundlich y Langmuir.

Se encontró que la sorción de PCF en PUF sigue una cinética de pseudo-segundo orden. La sorción de PCF en PUF fue rápida con un tiempo de equilibrio de aproximadamente 2 h; éste tiempo de equilibrio fue el doble de lo reportado por Shumack y Chow, (1987) quienes estudiaron la extracción de compuestos aromáticos sorbidos en el PUF. Denizli y col., (2004) reportaron un tiempo de equilibrio de 3 h para una solución de clorofenoles (2,4,6-triclorofenol, *p*-clorofenol y *o*-clorofenol) utilizando biomasa seca de *P. chrysosporium*, mientras que Kennedy y Pham, (1995) reportaron un tiempo de equilibrio de PCF en biomasa anaerobia granular de un reactor UASB de aproximadamente 2 h.

Por otro lado, la sorción de PCF en fibra de nylon fue más lenta en comparación con la del PUF. La fibra de nylon presentó un tiempo de equilibrio de aproximadamente 120 h. Los resultados cinéticos de sorción de PCF en fibra de nylon se ajustaron bien a los modelos cinéticos de pseudo-primer y segundo orden. Ho y McKay, (1998), reportaron que el modelo cinético de pseudo-primer orden de Lagergren no se ajusta bien a un intervalo

amplio de tiempos de contacto y solo es aplicable entre los primeros 20 y 30 min de contacto. Por lo que, si se desea utilizar este modelo con un intervalo de tiempos de contacto mayor a 30 min se debe obtener el parámetro q_e por ensayo y error ó utilizar la q_e obtenida a partir de isothermas. En este estudio al ajustar los resultados cinéticos de sorción de PCF en fibra de nylon con el modelo de pseudo-primer orden (q_e tomada de la isoterma de sorción de PCF en fibra de nylon) se encontró que este modelo solo describe el perfil cinético de sorción de PCF en los primeros minutos de contacto, por lo que se descartó como modelo cinético. No hay reportes en la literatura acerca de la caracterización cinética de la fibra de nylon con respecto a sorción de PCF. En este estudio, se compararon las constantes cinéticas de pseudo-segundo orden del PUF y la fibra de nylon y se encontró que la sorción del PCF en PUF es en promedio 650 veces más rápida que la sorción de PCF en fibra de nylon.

En los estudios de isothermas de sorción de PCF, se encontró que el mejor modelo de isoterma que se ajusta a los resultados experimentales tanto para PUF como para la fibra de nylon, fue el modelo de Langmuir con la linearización tipo II. En la isoterma de Langmuir los dos parámetros importantes son q_m (mg PCF g⁻¹) y K_a (L mg⁻¹) que son la capacidad máxima de sorción y el coeficiente de afinidad (el cual es una medida directa de la intensidad de la sorción), respectivamente. Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que para el PUF la q_m promedio fue de 268.6 mg PCF g⁻¹ PUF con una K_a promedio de 0.007 L mg⁻¹ PCF. Mientras que en el trabajo realizado Hu y col., (1994); donde inmovilizaron a *Flavobacterium sp.* ATCC39723 (3) en PUF para la degradación de PCF, encontraron que la sorción del PCF se ajusta al modelo de isoterma de Langmuir con una q_m de 21.3 mg PCF g⁻¹ PUF y una K_a de 0.03 L mg PCF⁻¹ ($K_d = 28.7$ mg L⁻¹). La q_m encontrada en esta investigación fue aproximadamente un orden de magnitud mayor a la reportada por Hu y y col., (1994).

La fibra de nylon presentó una q_m promedio de 3.0 mg PCF g⁻¹ nylon y una K_a promedio de 0.03 L mg⁻¹ PCF. En este caso el coeficiente de afinidad fue un orden de magnitud mayor al encontrado en el PUF; esto sugiere que la sorción de PCF en la fibra de nylon es más fuerte que en el PUF, lo cual fue corroborado por el factor de separación (R_L). Sin embargo, el

PUF sorbió mayor concentración de PCF, de hecho, la q_m promedio del PUF fue 895.3 veces mayor que la q_m promedio del nylon.

La sorción de compuestos fenólicos en un sólido depende principalmente de cuatro factores, lo cuales son: 1) la temperatura, 2) el pH del medio, 3) pK_a del compuesto fenólico y 4) la estructura química de las superficies sólidas. La molécula de PCF tiene un pK_a de 4.75; si el pH del medio es mayor que el pK_a del PCF, las moléculas de PCF se encontraran primordialmente con carga negativa (aniones). No obstante, si el pH del medio es menor que el pK_a del PCF, las moléculas se encontraron en forma neutra. En los experimentos de sorción de PCF realizados en este estudio el pH del medio fue de 5.3, por lo que, muchas de las moléculas de PCF se encontraban en forma de pentaclorofenolato. Jianlong y col., (2000) observaron que la biosorción de PCF en lodos activados secos estaba en función del pH de la solución. Ellos trabajaron en un intervalo de pH que iba de 6 a 8, y encontraron que a pH 6, la q_m aumentaba, mientras que a pH más básico la q_m disminuía. Todo esto debido a cambio de las cargas de la superficie de contacto de los lodos activados al cambiar la concentración de iones hidrógeno. Algo similar fue encontrado por Deng y col., (2008) en su estudio de biosorción de PCF y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en biomasa de *Penicillium chrysogenum*. Estos investigadores realizaron sus estudios de sorción a diferentes pH tanto con biomasa seca, como con biomasa polimerizada con polietilenimina; para aumentar el número de grupos funcionales (principalmente aminas primarias, secundarias y terciarias) que pueden realizar sorción en la superficie activa. Deng y col., (2008) encontraron que la biomasa polimerizada se mantenía protonada a $pH < 10.2$. En ese mismo intervalo de pH las moléculas de PCF y 2,4-D se encontraban en forma de aniones, por lo que, la sorción del PCF y 2,4-D en la biomasa polimerizada era debida a interacciones iónicas. Sin embargo, también observaron que al aumentar el pH del medio, la biomasa polimerizada perdía su carga positiva, disminuyendo la capacidad de sorción.

A partir de los resultados experimentales cinéticos y de equilibrio de sorción de PCF en el PUF y la fibra de nylon de esta investigación, es difícil describir un mecanismo de sorción de PCF en los soportes sintéticos. Sin embargo, estos resultados pueden dar algunos

indicios sobre el posible mecanismo de sorción del PCF. En los dos soportes sintéticos utilizados los resultados experimentales tanto cinéticos, como de isotermas de sorción de PCF se ajustaron bien a modelos teóricos que describen quimisorción. Es posible que la sorción de PCF en PUF y en fibra de nylon sea por enlaces iónicos y siga un mecanismo de sorción similar al reportado por Jianlong y col., (2000); Deng y col., (2008). Debido a que estos soportes cuentan con grupos funcionales que pueden ser protonados a pH ácido, por ejemplo: El PUF cuenta con nitrógenos de las aminas secundarias de los enlaces uretano y los nitrógenos de los diisocianatos, mientras que la fibra de nylon cuenta con los nitrógenos de las aminas secundarias de los enlaces amida. También es posible que un menor número de nitrógenos que se pueden protonar a pH ácido en la molécula de la fibra de nylon disminuya su capacidad de sorción de PCF en comparación con el PUF. Por otro lado, no se puede descartar la posibilidad de que el mecanismo de sorción de PCF en los soportes sintéticos sea debido a fisisorción. Ya que es posible que los grupos hidroxilo del PCF formen puentes de hidrógeno con algunos átomos fuertemente electronegativos (oxígeno y nitrógeno) del PUF y la fibra de nylon, como lo reportaron Schumack y Chow, (1987); estos investigadores observaron que compuestos aromáticos con grupos hidroxilo, como el fenol, el ácido benzoico, y la hidroquinona entre otros, podían formar puentes de hidrógeno con espuma de poliéster y poliéter; siendo esta última espuma la que mayor número de puentes de hidrógeno formó con los compuestos aromáticos hidroxilados.

Después de haber encontrado las capacidades máximas de sorción de PCF en el PUF y la fibra de nylon (q_m), se observó cualitativamente, si *R. oryzae* ENHE podía crecer dentro de los soportes en condiciones de saturación de PCF, en comparación con el crecimiento de *R. oryzae* ENHE en PUF y fibra de nylon sin la presencia del PCF. Se encontró que en el PUF saturado con PCF el crecimiento de *R. oryzae* ENHE se inhibió fuertemente, pero no la germinación de esporas. Mientras que en el PUF sin PCF las esporas de *R. oryzae* ENHE germinaron más rápidamente, causando un mayor crecimiento de *R. oryzae* ENHE que prácticamente invadió el espacio interno del PUF. Debido a que el crecimiento de *R. oryzae* ENHE en PUF saturado con PCF a lo largo de 72 h no fue significativo en comparación al crecimiento observado en el PUF sin PCF, se descartó al PUF saturado con PCF como soporte para la inmovilización de *R. oryzae* ENHE. En cambio, la fibra de nylon saturada

con PCF, y la fibra de nylon sin PCF presentaron gran crecimiento micelial, inclusive a simple vista. Esto debido principalmente a su baja capacidad de sorción máxima de PCF (q_m) y a factores físicos como: mayor espacio interno, y menor pérdida de humedad, en comparación al PUF. Es por esto que se eligió a la fibra de nylon saturada con PCF como soporte para la inmovilización de *R. oryzae* ENHE.

Una vez identificada la capacidad de *R. oryzae* ENHE para crecer en fibra de nylon saturada con PCF, se cuantificó el crecimiento del hongo a través de la determinación de glucosamina de la pared celular. Las cinéticas de crecimiento mostraron que el PCF sorbido por la fibra de nylon, y el PCF libre en el medio inhiben fuertemente el crecimiento de *R. oryzae* ENHE dentro del soporte. De hecho, el mayor crecimiento de *R. oryzae* ENHE se observó en los cultivos control que tenían fibra de nylon sin PCF sorbido, y fue a las 24 h, presentando 1.77 veces mayor crecimiento que el encontrado en los cultivos con PCF. Mientras que el mayor crecimiento de *R. oryzae* ENHE inmovilizado en fibra de nylon saturada con PCF se observó a la 36 h, y fue en promedio 18.59 mg biomasa seca g⁻¹ nylon.

Utilizando biomasa de *R. oryzae* ENHE inmovilizada en fibra de nylon saturada con PCF, con una edad de 36 h, se estudió la capacidad de remoción de PCF en cultivo sumergido con medio M-N. La remoción de PCF con biomasa de *R. oryzae* ENHE inmovilizada en fibra de nylon saturada con PCF fue más rápida con una concentración inicial de 25 mg PCF L⁻¹, en comparación con la concentración inicial de 12.5 mg PCF L⁻¹. La velocidad de remoción obtenida con 25 mg PCF L⁻¹ permitió remover en promedio 92% del PCF inicial en 72 h, mientras que en la cinética de remoción con 12.5 mg PCF L⁻¹, la remoción promedio fue 87% del PCF inicial en 24 h (tabla 8).

Tabla 8 Resumen de los resultados obtenidos en las cinéticas de remoción de PCF con *R. oryzae* ENHE inmóvil en fibra de nylon saturada con PCF.

Concentración inicial de PCF (mg L ⁻¹)	Tasa de remoción (mg PCF L ⁻¹ h ⁻¹)	Porcentaje de remoción
12.5	0.6	92 ± 0.78%
25	0.4	87 ± 1.04%

León-Santiesteban y col., (2008) mostraron el potencial que *R. oryzae* ENHE tiene para la remoción de PCF en cultivo sumergido con biomasa libre, encontrando una remoción

promedio del 90% del PCF inicial ($12.5 \text{ mg PCF L}^{-1}$) en 48 h. En este trabajo la máxima remoción alcanzada fue el 92% del PCF inicial en 72 h. Sin embargo, esta remoción se alcanzó con una concentración inicial de 25 mg PCF L^{-1} , lo cual fue el doble de la concentración utilizada por León-Santiesteban y col., (2008). Otro trabajo similar fue el realizado por Shim y Kawamoto. (2002), quienes reportaron degradación de PCF con *P. chrysosporium* inmovilizado en polipropileno en un reactor de lecho empacado alimentado continuamente con 30 mg PCF L^{-1} , a un flujo de 2 L d^{-1} . Ellos encontraron que en un periodo de 7 a 21 días (donde se encontraba el estado estacionario de actividad enzimática) se degradaba más del 80% del PCF, en comparación con las muestras control (polipropileno sin hongo). Sin embargo, para mantener el estado estacionario de actividad enzimática tuvieron que cambiar repetidas veces el medio de crecimiento por un medio inductivo de la actividad enzimática, a lo largo de aproximadamente 20 días. Los resultados de remoción de PCF obtenidos en esta tesis se realizaron en un sistema en lotes, lo cual implica solo una alimentación inicial de PCF. *R. oryzae* ENHE removió prácticamente la misma concentración de PCF reportada por Shim y Kawamoto, (2002), en solo tres días de cultivo sin la necesidad de inducir las actividades enzimáticas. Este hecho hace que la biomasa de *R. oryzae* ENHE inmovilizada en fibra de nylon saturada con PCF sea un buen sistema para la remoción de PCF.

9 Conclusiones

- Al utilizar un soporte sintético para la inmovilización de un microorganismo removedor de PCF, como *R. oryzae* ENHE, se debe considerar la desaparición de PCF por sorción.
- La fibra de nylon resultó ser el mejor soporte sintético para la inmovilización de *R. oryzae* ENHE, debido principalmente a que presentó una baja capacidad de sorción máxima de PCF (3 mg PCF g⁻¹ nylon), en comparación con la del PUF (268.6 mg PCF g⁻¹ PUF). Y además, permitió un gran crecimiento del hongo en su interior, lo cual no se observó en el PUF debido principalmente a la alta concentración de PCF sorbido. Sin embargo, la fibra de nylon alcanzó el equilibrio de sorción de PCF muy lentamente, en aproximadamente cinco días, en comparación con el PUF que alcanzó el equilibrio en aproximadamente 2 h.
- *R. oryzae* ENHE inmovilizado en fibra de nylon saturada con PCF resultó ser un buen sistema para la remoción de PCF. Puesto que, removió el 87% de 12.5 mg PCF L⁻¹ en 24 h, y el 92% de 25 mg PCF L⁻¹ en 72 h. Mejorando la remoción de PCF reportada para este zigomiceto.

10 Referencias

1. Ahmaruzzaman, M., Sharma, D.K. (2005). Adsorption of phenols from wastewater. *J. Colloid Interface Sci.* 287 (1): 14-24.
2. Allen, S.J., McKay, G., Potter, J.F. (2004). Adsorption isotherm models for basic dye adsorption by peat in single and binary component system. *J. Colloid Interface Sci.* 280 (2). 322-333.
3. Ban, K., Kaieda, M., Matsumoto, T., Kondo, A., Fukuda, H. (2001). Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cell immobilized within biomass support particles. *Biochem. Eng. J.* 8 (1): 39-43.
4. Billmeyer, F.W. Jr. (1984). Heterochain Thermoplastics. *Textbook of polymer science.* John Wiley and Sons, Canada. 413-417.
5. Boelsterli, U.A. (2007). Disruption of Mitochondrial Function and Mitochondria-Mediated Toxicity. *Mechanistic Toxicology, The Molecular Basis of How Chemicals.* CRC Press, Taylor & Francis Group, The United States of America. 360-362.
6. Boles, J.W., Klaassen, C.D. (2000). Effect of molybdate and pentachlorophenol on the sulfation of acetaminophenol. *Toxicol.* 176 (1): 23-25.
7. Carraher, C.E. Jr. (2007). Step-Reaction Polymerization (Polycondensation Reaction). *Introduction to Polymer Chemistry.* CRC Press Taylor & Francis Group. 90; 147; 157-160.
8. Carswell, T.S., Nason, H.K. (1938). Properties and Uses of Pentachlorophenol. *Ind. Eng. Chem.* 30 (6): 622-626.
9. Hill, C.G., Jr. (1977). Elements of Heterogeneous Catalysis. *An introduction to chemical engineering kinetics and reactor design.* John Wiley and Sons, United States of America. 167-215.
10. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias tóxicas, CICOPLAFEST, Catálogo Oficial de Plaguicidas. 2004.
11. Deng, S., Ma, R., Yu, Q., Huang, j., Yu, G. (2008). Enhanced removal of pentachlorophenol and 2,4-D from aqueous solution by an aminated biosorbent. *J. Hazard. Mater.* 165 (1-3): 408-414.
12. Denizli, A., Cihangir, N., Rad, A.Y., Taner, M., Alsancak, G. (2004). Removal of chlorophenol from synthetic solution using *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochem.* 39 (12): 2025-2030.

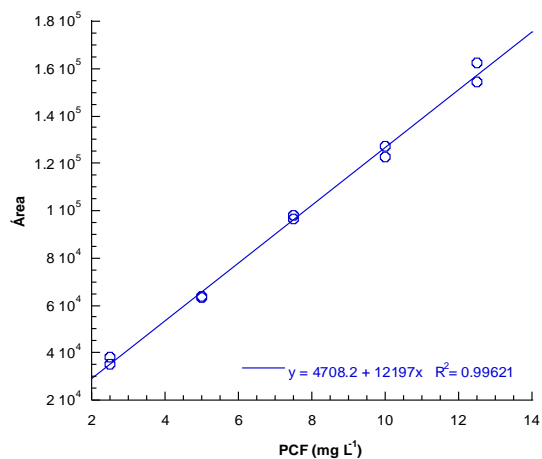
13. Doménech, X.A., Peral, J.P. (2006). La interface sólido-agua. Procesos de sorción e Intercambio iónico. *Química ambiental de sistemas terrestres*. Editorial Reverte. Barcelona, España. 39-73
14. Elwell, M.J., Ryan, A.J. (1996). *In-Situ* Studies of Structure Development during the Reactive Processing of Model Flexible Polyurethane Foam Systems Using FT-IR Spectroscopy, Synchrotron SAXS, and Rheology. *Macromolecules*. 29 (8): 2960-2968.
15. Escher, B.I., Snozzi, M., Schwarzenbach, R.P. (1996). Uptake, Speciation, and Uncoupling Activity of Substituted Phenols in Energy Transducing Membranes. *Environ. Sci. Technol.* 30 (10): 3071-3079.
16. Fang, H., Wenrong, H., Yuezhong, H. (2004). Investigation of isolation and immobilization of a microbial consortium for decoloring of azo dye 4BS. *Water Res.* 38 (16): 3596-3604.
17. Fernández, A., Yarto, M., Castro, J. (2004). Listado adicional al Convenio de Estocolmo. Plaguicidas. *Las sustancias tóxicas persistentes*. Del Pont, R.M. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT), México, D.F. 97-98.
18. Fisher, B. (1991). Pentachlorophenol: Toxicology and Environmental Fate. *J. Pesticide Reform*. 11 (1): 2-5.
19. Freundlich, H.M.F. (1906). Over the adsorption in solution. *J. Phys. Chem.* 57: 385-470.
20. Ho, Y.S. (2004). Pseudo-Isotherms Using a Second Order kinetic Expression Constant. *Adsorpt. Sci. Technol.* 10 (2): 151-158.
21. Ho, Y.S. (2006). Review of second-order models for adsorption systems. *J. Hazard. Mater.* 136 (3): 681-689.
22. Ho, Y.S. and McKay, G. (1998). A comparison of chemisorption kinetic model applied to pollutant removal on various sorbents. *Trans IChemE*. 76 (4): 332-340.
23. Horstman, S.W., Rossner, A., Kalman, D.A., Morgan, M.S. (1989). Penetration of pentachlorophenol and tetrachlorophenol through human skin. *J. Env. Sci. Health A*. 24 (3): 229-242.
24. Hu, Z.C., Korus, R.A., Levinson, W.E., Crawford, R.L. (1994). Adsorption and Biodegradation of pentachlorophenol by Polyurethane-Immobilized *Flavobacterium*. *Environ. Sci. Technol.* 28 (3): 491-496.
25. Huang, L.P., Jin, B., Lant, P., Zhou, J. (2005). Simulation saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. *Biochem. Eng. J.* 27 (4): 229-238.

26. Huff, J. (2001). Sawmill Chemicals and Carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* 109 (3): 209-212.
27. Ip, A.W.M., Barford, J.P., McKay, G. (2009). Reactive Black dye adsorption/desorption onto different adsorbents: Effect of salt, surface chemistry, pore size and surface area. *J. Colloid Interface Sci.* 337 (1): 32-38.
28. Jensen, S., Renberg, L. (1972). Contaminants in Pentachlorophenol: Chlorinated Dioxins and Predioxins (Chlorinated Hydroxy-Diphenylethers). *Ambio.* 1 (2): 62-65.
29. Jiang, X.Y., Zeng, G.M., Huang, D.L., Chen Y., Liu, F., Huang, G.H. (2006). Remediation of pentachlorophenol-contaminated soil by composting with *Phanerochaete chrysosporium*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22 (9): 909-913.
30. Jianlong, W., Yi, Q., Horan, N., Stentiford, E. (2000). Bioadsorption of pentachlorophenol (PCP) from aqueous solution by activated sludge biomass. *Bioresour. Technol.* 75 (2): 157-161.
31. Johnson, P.J., Gehring, P.J., Kociba, R.J., Schwetz, B.A. (1973). Chlorinated Dibenzodioxins and Pentachlorophenol. *Environ. Health Perspect.* 5: 171-175.
32. Kaieda, M., Samukawa, T., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo., Shimada, Y., Noda, H., Nomoto, F., Ohtsuka, K., Izumoto, E., Fukuda, H. (1999). Biodiesel Fuel Production from Plant Oil Catalyzed by *Rhizopus oryzae* Lipase in Water-Containing System without an Organic Solvent. *J. Biosci. Bioeng.* 8 (6): 627-631.
33. Kennedy, K.L., Pham, T.T. (1995). Effect of anaerobic sludge source and condition on biosorption of PCP. *Water Res.* 29 (10): 2360-2366.
34. Langmuir, I. (1916). The constitution and fundamental properties of solids and liquids. *J. Am. Chem. Soc.* 38 (11): 2221-2295.
35. Langmuir, I. (1918). The adsorption of gases on plane surface of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.* 40 (9): 1361-1403.
36. Largergren, S. (1898). Zur theorie der sogenannten adsorption gelöster stoffer. *K. Sven. Vetenskapsakad. Handl.* 24: 1-39.
37. Lemos, V.A., Santos, M.S., Santos, E.S., Santos M.J.S., dos Santos, W.N.L., Souza, A.S., de Jesus, D.S., das Virgens, C.F., Carvalho, M.S., Oleszczuk, N., Vale, M.G.R., Welz, B., Ferreira, S.L.C. (2007). Application of polyurethane foam as a sorbent for traces metal pre-concentration-A review. *Spectrochim. Acta. Part B.* 62 (1): 4-12.
38. León-Santiesteban, H., Bernal, R., Fernandez, F.J., Tomasini, A. (2008). Tyrosinase and peroxidase production by *Rhizopus oryzae* strain ENHE obtained from pentachlorophenol-contaminated soil. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83 (10): 1394-1400.

39. Liouni, M., Drichoutis, P., Nerantzis, E.T. (2008). Studies of the mechanical properties and the fermentation behavior of double layer alginate-chitosan beads, using *Saccharomyces cerevisiae* entrapped cells. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24 (2): 281-288.
40. Liu, Y. (2006). Some consideration on the Langmuir isotherm equation. *Colloids Surf., A.* 274 (1-3): 34-36.
41. Lu, Y., Yan, L., Wang, Y., Zhou, S., Fu, J., Zhang, J. (2009). Biodegradation of phenolic compounds from coking wastewater by immobilized white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Hazard. Mater.* 165 (1-3): 1091-1097.
42. Marcial, J. (2005). Determinación de las condiciones de cultivo para la degradación de pentaclorofenol con *Amylomyces rouxii* por fermentación en estado sólido. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.
43. Marcial, J., Barrios-González, J., Tomasini, A. (2006). Effect of medium composition on pentachlorophenol removal by *Amylomyces rouxii* in solid-state culture. *Process Biochem.* 41 (2): 496-500.
44. Mathialagan, T., Viraraghavan, T. (2009). Biosorption of pentachlorophenol from aqueous solutions by a fungal biomass. *Bioresource Technol.* 100 (2): 549-558.
45. Miranda, R.U. (2008). Expresión del gen *sod1* durante la trofofase e idiofase de *Aspergillus terreus* en fermentación sólida y líquida para la producción de lovastatina. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.
46. Oda, Y., Yajima, Y., Kinoshita, M., Ohnishi, M. (2003). Differences of *Rhizopus oryzae* strains in organic acid synthesis and fatty acid composition. *Food Microbiol.* 20 (3): 371-375.
47. Park, E.Y., Anh, P.N., Okuda, N. (2004). Bioconversion of waste paper to L (+)-lactic acid by the filamentous fungus *Rhizopus oryzae*. *Bioresour. Technol.* 93 (1): 77-83.
48. Peer, M.M., Nirmala, J., Kutty, M.N. (1983). Effects of pentachlorophenol (Na PCP) on survival, activity and metabolism in *Rhinomugil corsula* (Hamilton), *Cyprinus carpio* (Linnaeus) and *Tilapia mossambica* (Peters). *Hidrobiol.* 107 (1): 19-24.
49. Rudin, A. (1987). Effects of Polymer Isomerism and Conformational Changes. The *Elements of Polymer Science and Engineering. An Introductory Text for Engineers and Chemists*. Academic Press, The United States of America. 155-186.
50. Schumack, L., and Chow, A. (1987). Extraction of aromatic organic compounds by polyurethane foam. *Talanta.* 34 (11): 957-962.
51. Seiler, J.P. (1991). Pentachlorophenol. *Mutat Res.* 257 (1): 27-47.

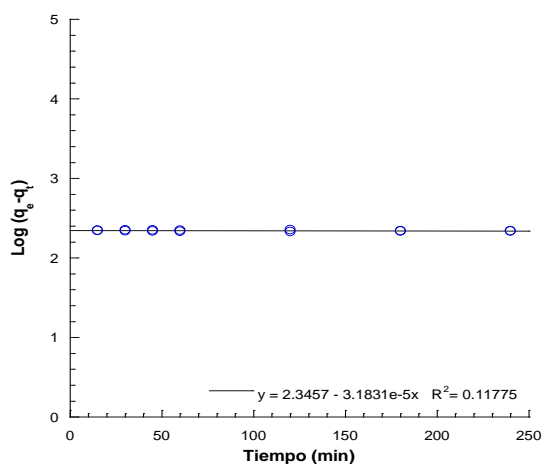
52. Shim, S.S., Kawamoto, K. (2000). Enzyme production activity of *Phanerochaete chrysosporium* and degradation of pentachlorophenol in a bioreactor. *Water Res.* 36 (18): 4445-4454.
53. Smith, J.M. (1981). Heterogeneous processes, catalysis, and adsorption. *Chemical Engineering Kinetics*. Brown, J.V. McGraw-Hill Publishing Company. 289-325.
54. Šušla, M., Svobodová, K. (2008). Effect of various synthetic dyes on the production of manganese-dependent peroxidase isoenzymes by immobilized *Irpex lacteus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24 (2): 225-230.
55. Taherzadeh, M.J., Fox, M., Hjorth, H., Edebo, L. (2003). Production of mycelium biomass and ethanol from paper pulp sulfite liquor by *Rhizopus oryzae*. *Bioresour. Technol.* 88 (3): 167-177.
56. Tomaselli, S.C., Vergoignan, C., Feron, G., Durand, A. (2001). Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in soil state cultivation conditions. *Biochem. Eng. J.* 7 (1): 1-5.
57. U.S. Environmental Protection Agency. 1990. Suspended, Cancelled, and Restricted Pesticides. Washington, D.C.: Office of Pesticides and Toxic Substances.
58. Ürek, Ö.R., Pazarlioğlu, N.K. (2005). Production and stimulation of manganese peroxidase by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochem.* 40 (1): 83-87.
59. WBS & Associates Inc. (2004). Physical, Chemical and Biological Properties. *Assessment report on Pentachlorophenol for developing ambient air quality objectives*. Science and Standards Branch, Alberta Environment, Edmonton, Canada. 4.
60. Weinbach, E.C. (1957). Biochemical Basis for the Toxicity of Pentachlorophenol. *Proc. Natl. Acad. USA.* 43 (5): 393-397.
61. Weinbach, E.C., (1954). The Effect of Pentachlorophenol on Oxidative Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 210 (2): 545-550.
62. WHO. (1987). *Pentachlorophenol*. Geneva. World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Environmental Health Criteria 71).
63. Williams, P.L. (1982). Pentachlorophenol, an assessment of the occupational hazard. *Am. Ind. Hyg. Assn. J.* 43 (11): 799-810.
64. Yang, S., Han, X., Wei, C., Chen, J., Yin, D. (2005). The effects of pentachlorophenol on rat Sertoli cells in vitro. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20 (1): 182-187.
65. Zouari, H., Labat, M., Savadi, S. (2002). Degradation of 4-chlorophenol by the White rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in free and immobilized cultures. *Bioresour. Technol.* 84 (2): 145-150.

ANEXO A. Curva de calibración de PCF cuantificada por HPLC

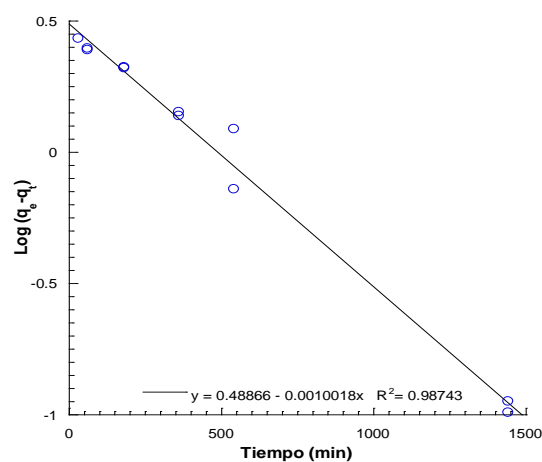


A1. Curva de calibración de PCF.

ANEXO B. Regresión lineal de la cinética de adsorción de pseudo-primer orden de PCF en PUF y fibra de nylon

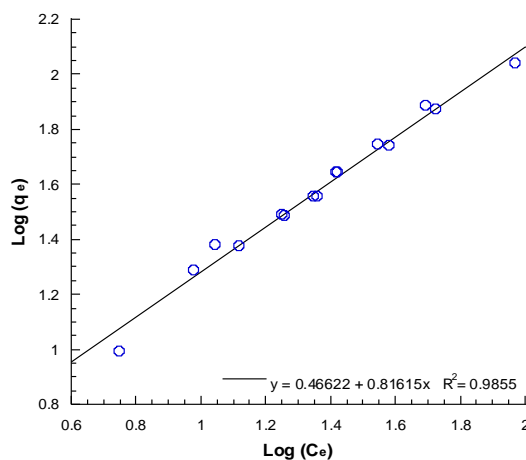


B1. Linearización del modelo cinético de pseudo-primer orden en la adsorción de PCF en PUF.



B2. Linearización del modelo cinético de pseudo-primer orden en la adsorción de PCF en fibra de nylon.

ANEXO C. Gráficos de las expresiones linearizadas de las isothermas de Freundlich y Langmuir (tipo I y II) para la adsorción de PCF en PUF y su análisis estadístico de regresión lineal



C1. Linearización de la isoterma de adsorción de Freundlich.

C1 Análisis estadístico de regresión lineal para la isoterma de Freundlich

C1.1 Estadísticos descriptivos

	Media	Desviación típ.	N
Log qe	1.6099	.28079	16
Log Ce	1.4013	.34154	16

C1.2 Resumen del modelo

R	R cuadrado	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio			
			Sig. del cambio en F	Cambio en R cuadrado	Cambio en F	gl1 gl2
.993(a)	.985	.03500	.000	.985	951.219	1 14

a Variables predictoras: (Constante), Log (Ce)

C1.3 ANOVA(b)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	1.165	1	1.165	951.219	.000(a)
Residual	.017	14	.001		
Total	1.183	15			

a Variables predictoras: (Constante), Log (Ce)

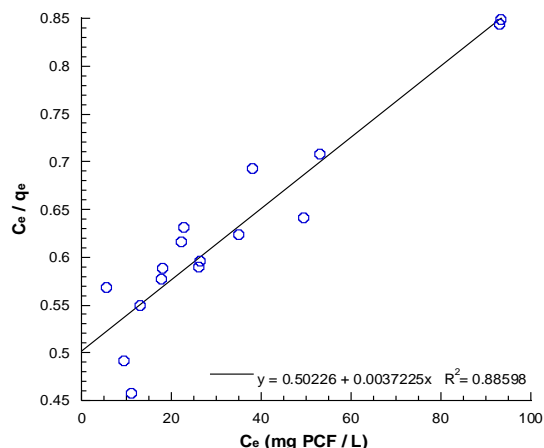
b Variable dependiente: Log (qe)

C1.4 Coeficientes(a)

	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.	Intervalo de confianza para B al 95%	
	B	Error típ.	Beta			Límite inferior	Límite superior
Log K _F	.466	.038		12.236	.000	.384	.548
1/n	.816	.026	.993	30.842	.000	.759	.873

a Variable dependiente: Log(qe)

Parámetro	Media	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior
1/n	.82	.76	.87
K _F	2.9	2.4	3.5



C2. Linearización de la isoterma de adsorción de Langmuir tipo II.

C2 Análisis estadístico de regresión lineal para la isoterma de Langmuir Tipo II

C2.1 Estadísticos descriptivos

	Media	Desviación típ.	N
Ce/qe	.6266	.10651	16
Ce	33.4131	26.93197	16

C2.2 Resumen del modelo

R	R cuadrado	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio			
			Sig. del cambio en F	Cambio en R cuadrado	Cambio en F	gl1 gl2
.941(a)	.886	.03723	.000	.886	108.783	1 14

a Variables predictoras: (Constante), Ce

C2.3 ANOVA(b)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática a	F	Sig.
Regresión	.151	1	.151	108.783	.000(a)
Residual	.019	14	.001		
Total	.170	15			

a Variables predictoras: (Constante), Ce

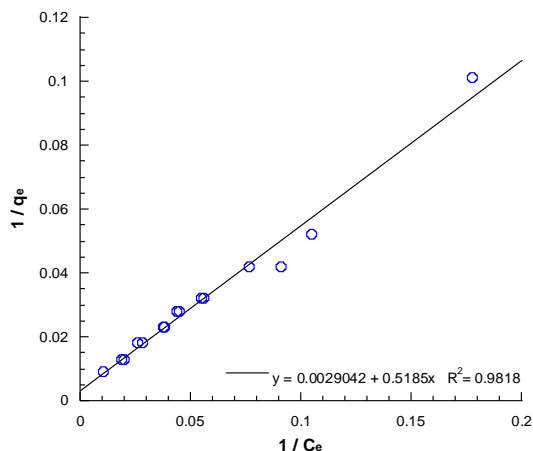
b Variable dependiente: Ce/qe

C2.4 Coeficientes(a)

	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.	Intervalo de confianza para B al 95%	
	B	Error típ.	Beta			Límite inferior	Límite superior
1/K _a *q _m	.502	.015		33.202	.000	.470	.535
1/q _m	.004	.000	.941	10.430	.000	.003	.004

a Variable dependiente: Ce/qe

Parámetro	Media	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior
K _a	0.007	0.006	0.008
q _m	268.6	222.8	338.2



C3. Linearización de la isoterma de adsorción de Langmuir tipo I.

C3 Análisis estadístico de regresión lineal para la isoterma de Langmuir Tipo I

C3.1 Estadísticos descriptivos

	Media	Desviación típ.	N
1/qe	.0302	.02262	16
1/Ce	.0526	.04323	16

C3.2 Resumen del modelo

R	R cuadrado	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio			
			Sig. del cambio en F	Cambio en R cuadrado	Cambio en F	gl1 gl2
.991(a)	.982	.00316	.000	.982	755.044	1 14

a Variables predictoras: (Constante), 1/Ce

C3.3 ANOVA(b)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	.008	1	.008	755.044	.000(a)
Residual	.000	14	.000		
Total	.008	15			

a Variables predictoras: (Constante), 1/Ce

b Variable dependiente: 1/qe

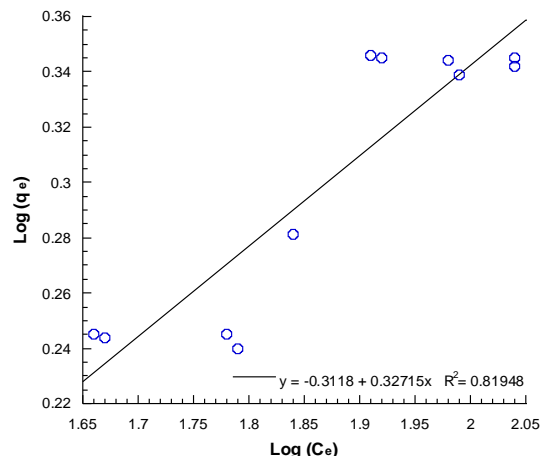
C3.4 Coeficientes(a)

	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.	Intervalo de confianza para B al 95%	
	B	Error típ.	Beta			Límite inferior	Límite superior
1/qm	.003	.001		2.289	.038	.000	.006
1/Ka*qm	.519	.019	.991	27.478	.000	.478	.559

a Variable dependiente: 1/qe

Parámetro	Media	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior
Ka	0.006	0.0001	0.0102
qm	347.96	175.17	25716.78

ANEXO D. Gráficos de las expresiones linearizadas de las isotermas de Freundlich y Langmuir (tipo I y II) para la adsorción de PCF en fibra nylon y su análisis estadístico de regresión lineal



D1. Linearización de la isoterma de adsorción de Freundlich.

D1 Análisis estadístico de regresión lineal para la isoterma de Freundlich

D1.1 Estadísticos descriptivos

	Media	Desviación típ.	N
Log (qe)	.3015	.04951	11
Log (Ce)	1.8745	.13699	11

D1.2 Resumen del modelo

R	R cuadrado	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio			
			Sig. del cambio en F	Cambio en R cuadrado	Cambio en F	gl1 gl2
.905(a)	.819	.02217	.000	.819	40.857	1 9

a Variables predictoras: (Constante), Log (Ce)

D1.3 ANOVA(b)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática a	F	Sig.
Regresión	.020	1	.020	40.857	.000(a)
Residual	.004	9	.000		
Total	.025	10			

a Variables predictoras: (Constante), Log (Ce)

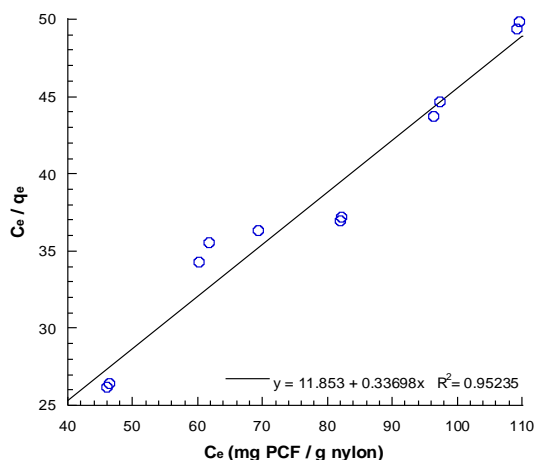
b Variable dependiente: Log (qe)

D1.4 Coeficientes(a)

	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.	Intervalo de confianza para B al 95%	
	B	Error típ.				Límite inferior	Límite superior
Log (K _F)	-.312	.096		-3.242	.010	-.529	-.094
1/n	.327	.051	.905	6.392	.000	.211	.443

a Variable dependiente: Log (qe)

Parámetro	Media	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior
I/n	0.33	.21	.44
K_F	0.5	.3	.8



D2. Linearización de la isoterma de adsorción de Langmuir tipo II.

D2 Análisis estadístico de regresión lineal para la isoterma de Langmuir Tipo II

D2.1 Estadísticos descriptivos

	Media	Desviación típ.	N
Ce/qe	38.2273	8.02007	11
Ce	78.2664	23.22577	11

D2.2 Resumen del modelo

R	R cuadrado	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio			
			Sig. del cambio en F	Cambio en R cuadrado	Cambio en F	gl1 gl2
.976(a)	.952	1.84530	.000	.952	179.896	1 9

a Variables predictoras: (Constante), Ce

D2.3 ANOVA(b)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	612.570	1	612.570	179.896	.000(a)
Residual	30.646	9	3.405		
Total	643.216	10			

a Variables predictoras: (Constante), Ce

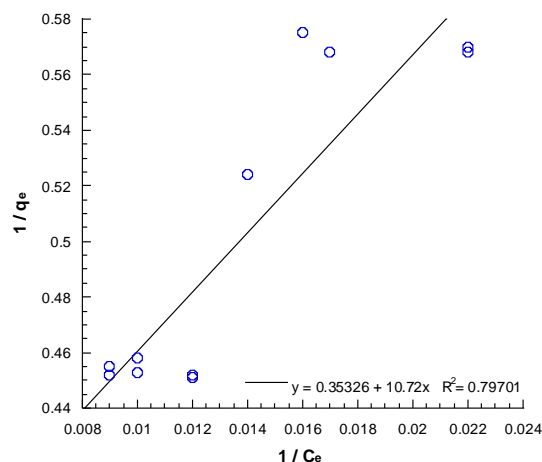
b Variable dependiente: Ce/qe

D2.4 Coeficientes(a)

	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		t	Sig.	Intervalo de confianza para B al 95%	
	B	Error típ.	Beta				Límite inferior	Límite superior
$I/K_a * q_m$	11.853	2.044			5.800	.000	7.230	16.476
I/q_m	.337	.025	.976		13.413	.000	.280	.394

a Variable dependiente: Ce/qe

Parámetro	Media	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior
K_a	0.03	0.02	0.04
q_m	3.0	2.5	3.6



D3. Linearización de la isoterma de adsorción de Langmuir tipo I.

D3 Análisis estadístico de regresión lineal para la isoterma de Langmuir Tipo I

D3.1 Estadísticos descriptivos

	Media	Desviación típ.	N
1/qe	.5024	.05770	11
1/Ce	.0139	.00481	11

D3.2 Resumen del modelo

R	R cuadrado	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio				
			Sig. del cambio en F	Cambio en R cuadrado	Cambio en F	gl1	gl2
.893(a)	.797	.02740	.000	.797	35.337	1	9

a Variables predictoras: (Constante), 1/Ce

D3.3 ANOVA(b)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	.027	1	.027	35.337	.000(a)
Residual	.007	9	.001		
Total	.033	10			

a Variables predictoras: (Constante), 1/Ce

b Variable dependiente: 1/qe

D3.4 Coeficientes(a)

	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.	Intervalo de confianza para B al 95%	
	B	Error típ.				Límite inferior	Límite superior
1/qm	.353	.026		13.376	.000	.294	.413
1/Ka*qm	10.720	1.803	.893	5.945	.000	6.641	14.800

a Variable dependiente: 1/qe

Parámetro	Media	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior
Ka	0.03	0.026	0.04
qm	2.90	2.5	3.5

ANEXO E. Cinética de crecimiento de *R. oryzae* ENHE en cultivo sumergido

Para poder interpretar el crecimiento de *R. oryzae* ENHE en términos de glucosamina en cultivo sumergido se construyó un curva patrón de glucosamina comercial (SIGMA) que se muestra en el gráfico E1.

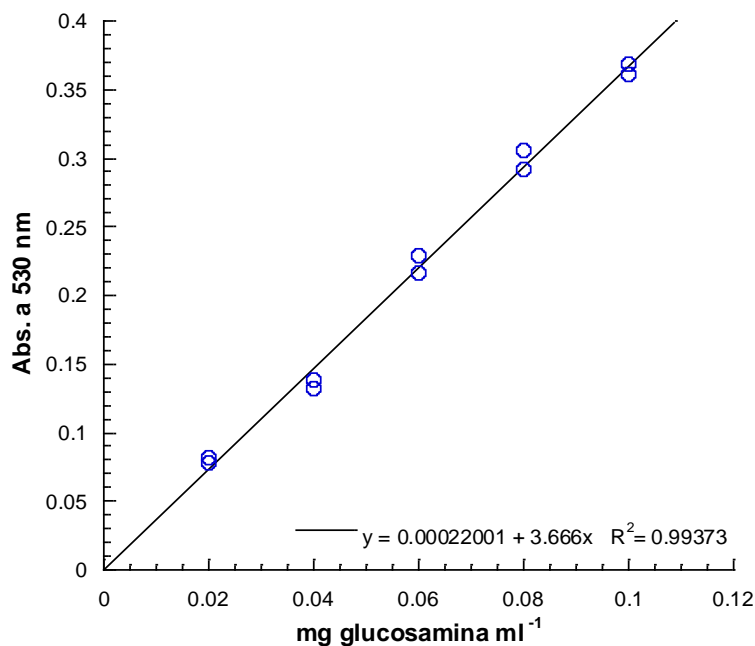


Gráfico E1. Curva patrón de glucosamina comercial (SIGMA).

En donde:

y = Absorbancia a 530 nm.

x = mg glucosamina mL⁻¹

Por lo que la concentración de glucosamina en la pared celular de *R. oryzae* ENHE se pudo calcular por medio de la siguiente ecuación:

$$x = \frac{y - 0.0002}{3.666} \quad (d1)$$

A partir de la ecuación de la recta obtenida de la curva patrón de glucosamina comercial (SIGMA) se encontró el siguiente perfil de crecimiento mostrado en el gráfico

E2, se utilizó como control el crecimiento de *R. oryzae* ENHE en términos de peso seco (mg de biomasa mL⁻¹).

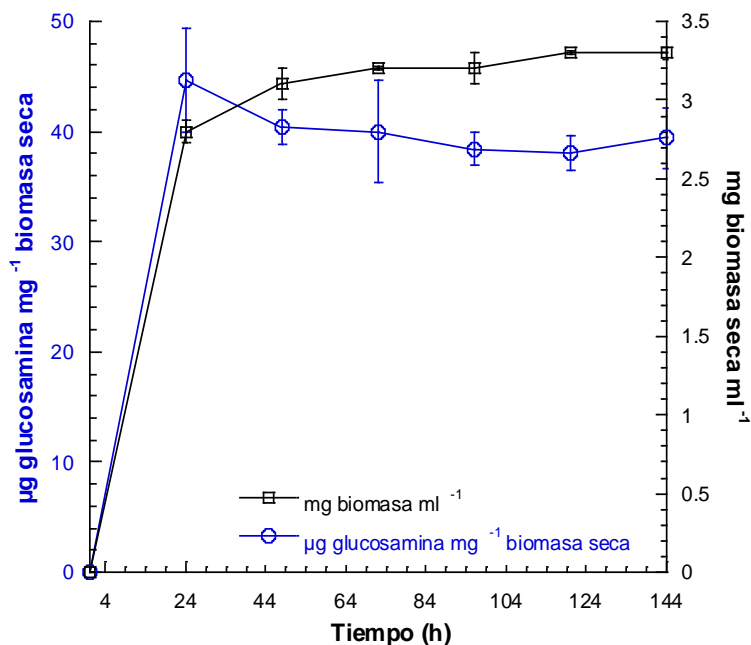


Gráfico E2. Perfiles de crecimiento de *R. oryzae* ENHE en FL en términos de Glucosamina y peso seco.

El gráfico E2 muestra que la fase de crecimiento rápido de *R. oryzae* ENHE en medio líquido; se observó a las 24 h, ya sea en términos de biomasa seca o en términos de glucosamina. La mayor producción de biomasa en términos de peso seco se obtuvo a partir de las 48 h de cultivo, y fue de 3.2 ± 0.01 mg de biomasa seca mL⁻¹. En el caso de glucosamina la mayor concentración en la pared celular del micelio de *R. oryzae* ENHE se alcanzó a las 24 h, corresponde a la fase de crecimiento rápido del hongo, y fue de 44.7 ± 4.7 µg glucosamina mg de biomasa seca⁻¹. Una vez alcanzado el máximo crecimiento, ya sea en términos de peso seco o en términos de glucosamina, la biomasa de *R. oryzae* ENHE se mantiene constante por lo menos hasta los 144 h.

ANEXO F. Curva patrón de glucosamina de la pared celular del micelio de *R. oryzae* ENHE

La curva patrón de glucosamina de la pared celular del micelio de *R. oryzae* ENHE en función de biomasa seca se muestra en el gráfico F1.

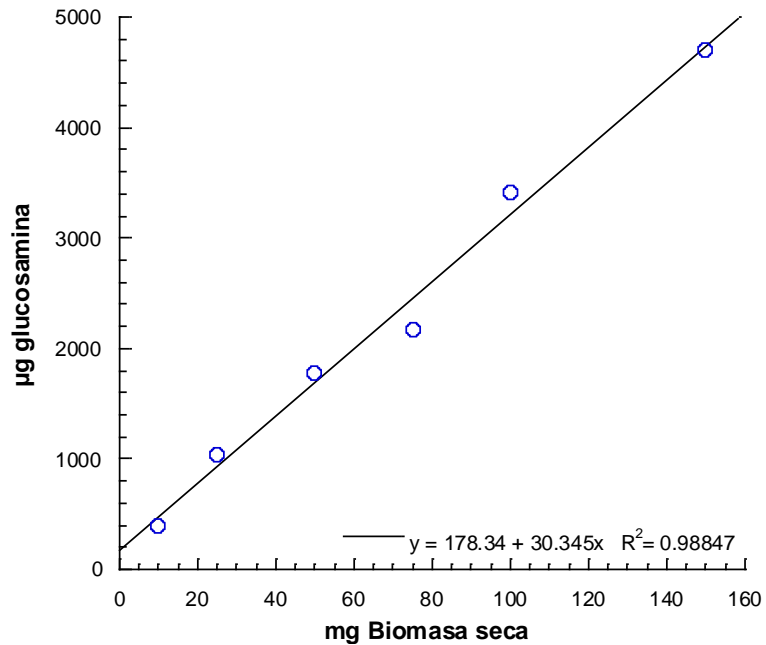


Gráfico F1. Curva patrón de glucosamina de *R. oryzae* ENHE.

En donde:

$y = \mu\text{g}$ glucosamina de la pared celular del micelio de *R. oryzae* ENHE.

$x = \text{mg}$ de biomasa seca.

Por lo que la biomasa seca inmovilizada en la fibra de nylon se pudo calcular a partir de los μg glucosamina por medio de la siguiente ecuación:

$$x = \frac{y-178.34}{30.345} \quad (\text{f1})$$

Iztapalapa, D.F. a 28 de enero del 2010

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

“Inmovilización de *Rhizopus oryzae* ENHE”

Que presentó
Héctor Hugo León Santiesteban

Comité Tutorial:

Directora: Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Asesora: Dra. Mónica Alicia Meraz Rodríguez

Asesor: Dr. Kazimierz Wrobel Zasada

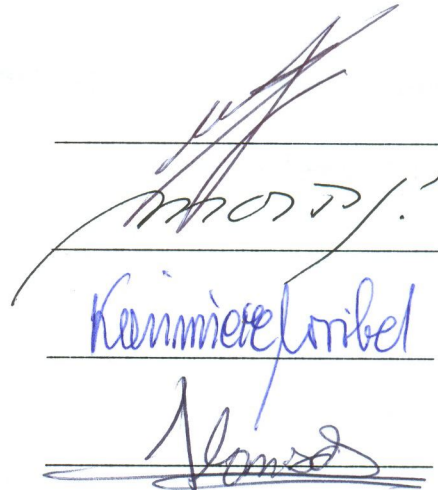
Jurado:

Presidente: Dr. Sergio Revah Moiseev

Secretaria: Dra. Mónica Alicia Meraz Rodríguez

Vocal: Dr. Kazimierz Wrobel Zasada

Vocal: Dr. Alejandro Coreño Alonso



Handwritten signatures of the jury members, including the President, Secretary, and two vocal members, written in blue ink on horizontal lines.