



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**IZTAPALAPA**

---

---

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**OBTENCIÓN DE UNA EMULSIÓN MÚLTIPLE  $W_1/O/W_2$   
CONTENIENDO UN CONSORCIO MICROBIANO  
DEGRADADOR DE MTBE**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**DIANA JAQUELINE PIMENTEL GONZÁLEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. E. JAIME VERNON CARTER**

**ASESORES:**

**DR. SERGIO REVAH MOISEEV**

**DRA. BLANCA ROSA RODRÍGUEZ PASTRANA**

**DR. OSCAR MONROY HERMOSILLO**

**MÉXICO, D. F.**

**NOVIEMBRE 2005**

## AGRADECIMIENTOS:

A CONACYT, por financiar el proyecto: “Estructuras y propiedades fisicoquímicas de películas interfaciales y su interrelación con la protección de nutraceuticos emulsificados y microencapsulados” (No. Convenio: 45992/A-1)

Al apoyo recibido por CONACYT con la beca de la Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACYT Registro 0471-O.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioprocesos del Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica y en el Laboratorio de Emisiones Gaseosas del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Iztapalapa, D. F. a de 30 de noviembre de 2005.

EL JURADO DESIGNADO POR LA División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la  
Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

OBTENCIÓN DE UNA EMULSIÓN MÚLTIPLE  $W_1/O/W_2$   
CONTENIENDO UN CONSORCIO MICROBIANO  
DEGRADADOR DE MTBE

Que presentó

**Diana Jaqueline Pimentel González**

Comité Tutorial:

Director: Dr. E. Jaime Vernon Carter

Asesores: Dr. Sergio Revah Moiseev

Dra. Blanca Rosa Rodríguez Pastrana

Dr. Oscar Monroy Hermosillo

Jurado:

Presidente: Dr. Sergio Huerta Ochoa

Secretario: Dra. Elsa Bosquez Molina

Vocal: Dra. Blanca Rosa Rodríguez Pastrana

Vocal: Dra. Consuelo Lobato Calleros

## **Agradecimientos:**

Dr. Vernon por haberme recibido en el laboratorio, por la dirección de este trabajo, por su incondicional apoyo, paciencia, atención y sobre todo su amistad. Dr. Jaime, gracias por ser un ejemplo de entrega y dedicación.

Dr. Sergio Revah por su asesoría invaluable, sus sugerencias y su intervención en la realización de este trabajo

Dr. Oscar Monroy y Dra. Blanca Rosa Rodríguez, por su colaboración y valiosas asesorías en este proyecto.

Al comité de jurado, Dr. Sergio Huerta, Dra. Elsa Bosquez y Dra. Consuelo Lobato, por sus observaciones.

A Pablo y Gaby, por compartir su experiencia y conocimientos.

A Hugo, Ofelia, Sergio, Abraham, Miguel, Yara, Reyna, Ramón, Eristeo, compañeros y amigos del laboratorio de Bioprocesos (T-166) porque con ustedes pasé la mayor parte del tiempo en que realicé este proyecto e hicieron mis jornadas más agradables.

A Angélica y Miguel (W 107) por su tiempo y apoyo con el consorcio microbiano.

A Landy, por los buenos y malos momentos, por las alegrías, enojos y preocupaciones que vivimos juntas, por las aventuras diarias; AMIGA GRACIAS.

A mi amigo Joe, por salvarme de mis problemas técnicos en las clases y con la computadora, sin tu ayuda, hubiese sido más difícil.

*Mamá, gracias por haberme formado de tal manera que me hiciste una mujer fuerte, capaz de enfrentar las adversidades con valor y firmeza,*

*Papá, gracias por la inmensa confianza que has depositado en mí, y por guiarme en todos los aspectos y por tus valiosos consejos.*

*Ana y Eva, ustedes son el impulso que me anima diariamente a seguir adelante.*

*Rafael, gracias por tu infinito apoyo, seguridad, orientación pero sobre todo, el cariño que me brindaste y porque siempre supiste que lo lograría.*

*Agradezco a Dios haberme dado la oportunidad de lograr esta meta y acompañar mi sendero con sus ángeles.*

# ÍNDICE

|  |     |
|--|-----|
| RESUMEN.....   | i   |
| ABSTRACT .....   | iii |
| INTRODUCCIÓN .....   | 1   |
| 1. MARCO TEÓRICO.....  | 3   |
| 1.1 Emulsiones.....  | 4   |
| 1.1.1 Concepto y tipos.....  | 4   |
| 1.1.2 Proceso de emulsificación.....   | 5   |
| 1.1.3 Factores de estabilidad de emulsiones .....  | 7   |
| 1.1.4 Emulsificantes y estabilizantes.....   | 11  |
| 1.1.4.1 Surfactantes de bajo peso molecular .....  | 12  |
| 1.1.4.2 Polímeros de alto peso molecular.....  | 14  |
| 1.1.5 Aplicaciones de emulsiones en tratamiento de aguas .....                             | 18  |
| 1.1.6 Entrampamiento de microorganismos en el sistema de emulsiones múltiples .....        | 19  |
| 1.2 Metil ter butil éter (MTBE).....   | 20  |
| 1.2.1 Origen de las gasolinas oxigenadas.....  | 20  |
| 1.2.2 Producción y uso de MTBE .....   | 22  |
| 1.2.3 Características del MTBE .....   | 23  |
| 1.2.4 Impacto del MTBE en medio ambiente y en salud .....                                  | 24  |
| 1.2.5 Contaminación de agua por MTBE.....  | 26  |
| 1.3 Eliminación de MTBE.....   | 27  |
| 1.3.1 Eliminación físico química de MTBE.....  | 27  |
| 1.3.2 Eliminación biológica de MTBE.....   | 28  |
| 1.3.3 Factores que afectan la biodegradación .....   | 30  |
| 2. OBJETIVOS .....   | 33  |
| 2.1 Objetivo general .....   | 34  |
| 2.2 Objetivos particulares.....  | 34  |
| 3. HIPÓTESIS.....  | 35  |
| 4. JUSTIFICACIÓN .....   | 37  |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS .....  | 40  |
| 5.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....  | 41  |
| 5.2 EMULSIONES.....  | 42  |
| 5.2.1 Materiales.....  | 42  |
| 5.2.2 Medición de índice de refracción.....  | 42  |
| 5.2.3 Formación de emulsiones.....   | 43  |
| 5.3 CARACTERIZACIÓN DE LA EMULSIÓN PRIMARIA $W_1/O$ .....                                  | 45  |
| 5.3.1 Selección del tipo de emulsificante lipofílico en la emulsión primaria $W_1/O$ ..... | 45  |
| 5.3.2 Concentración de emulsificante lipofílico en la emulsión primaria $W_1/O$ .....      | 46  |
| 5.3.3 Fracción de la fase dispersa en la emulsión primaria $W_1/O$ .....                   | 47  |
| 5.3.4 Emulsión primaria $W_1/O$ con el consorcio microbiano degradador de MTBE.....        | 47  |

|   |    |
|---|----|
| 5.4 CARACTERIZACIÓN DE LA EMULSIÓN MÚLTIPLE $W_1/O/W_2$ .....   | 48 |
| 5.4.1 Estabilización de la emulsión múltiple con biopolímeros y combinación de biopolímeros.....                                | 48 |
| 5.4.2 Caracterización de emulsiones múltiples con polímero sintético .....  | 49 |
| 5.4.3 Efecto de la adición de MTBE en la estabilidad de la emulsión múltiple formada con biopolímero y polímero sintético.....  | 50 |
| 5.4.4 Efecto de la incorporación del consorcio microbiano en la estabilidad de la emulsión múltiple.....                        | 50 |
| 5.5 BIODEGRADACIÓN DE MTBE.....   | 51 |
| 5.5.1 Consorcio microbiano .....  | 51 |
| 5.5.2 Medio de cultivo para el consorcio microbiano .....   | 51 |
| 5.5.3 Preinóculo.....   | 52 |
| 5.5.4 Microcosmos .....   | 53 |
| 5.5.5 Pruebas de actividad del consorcio microbiano en microcosmos .....  | 53 |
| 5.5.6 Determinación de velocidad de reacción en microcosmos.....  | 54 |
| 5.6 Métodos de análisis en microcosmos .....  | 55 |
| 5.6.1 Cuantificación de MTBE.....   | 55 |
| 5.6.2 Cuantificación de $CO_2$ y $O_2$ .....  | 56 |
| 5.7 Diseño experimental.....  | 56 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....   | 58 |
| 6.1 CARACTERIZACIÓN DE EMULSIÓN PRIMARIA.....   | 59 |
| 6.1.1 Tipo de emulsificante lipofílico .....  | 59 |
| 6.1.2 Concentración del emulsificante Span 80 .....   | 60 |
| 6.1.3 Fracción de la fase dispersa ( $\phi$ ).....  | 61 |
| 6.1.4 Estabilidad de emulsión primaria $W_1/O$ conteniendo el consorcio microbiano degradador de MTBE .....                     | 62 |
| 6.1.5 Tinción de Gram en la emulsión primaria $W_1/O$ .....   | 62 |
| 6.2 CARACTERIZACIÓN DE EMULSIÓN MÚLTIPLE $W_1/O/W_2$ .....  | 63 |
| 6.2.1 Caracterización de emulsiones múltiples con biopolímeros y combinación de biopolímeros.....                               | 63 |
| 6.2.2 Caracterización de emulsiones múltiples con polímero sintético (ácido poliacrílico) a distintas concentraciones.....      | 68 |
| 6.3 Comparación de emulsiones múltiples formadas con biopolímero y polímero sintético.....                                      | 71 |
| 6.3.1 Estabilidad de emulsiones múltiples formadas con biopolímero y polímero sintético .....                                   | 71 |
| 6.3.2 Efecto de la adición de MTBE en la estabilidad de la emulsión múltiple formada con biopolímero y polímero sintético ..... | 72 |
| 6.3.3 Efecto de la presencia del consorcio microbiano en la estabilidad de la emulsión múltiple.....                            | 73 |
| 6.4 Estudios cinéticos de la oxidación biológica de MTBE.....   | 76 |
| 6.4.1 Actividad del consorcio microbiano en medio mineral .....   | 76 |
| 6.4.2 Biodegradación de MTBE por el consorcio microbiano entrampado en la emulsión múltiple.....                                | 78 |

|  |     |
|--|-----|
| 6.4.3. Pruebas de consumo y de inhibición de los componentes de la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ en los microcosmos..... | 82  |
| 7. CONCLUSIONES .....  | 86  |
| 7.1 Conclusiones.....  | 87  |
| 7.2 Recomendaciones .....  | 88  |
| 8. BIBLIOGRAFÍA .....  | 89  |
| 9. ANEXOS .....  | 103 |



## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1.1. Características de una gasolina comercial .....  | 22 |
| Tabla 1.2. Principales países consumidores de MTBE en el mundo durante 1998 .....   | 23 |
| Tabla 1.3. Propiedades fisicoquímicas del MTBE.....   | 24 |
| Tabla 1.4. Comparación de cultivos mixtos y puros capaces de biodegradar MTBE ....  | 32 |
| Tabla 5.1. Valores de los rangos de la Relación $D_{3,2}/D_{4,3}$ que indican el tipo de estabilidad en una emulsión .....                              | 45 |
| Tabla 5.2. Formulación de emulsiones $W_1/O$ con diferente tipo de emulsificante lipofílico.....  | 46 |
| Tabla 5.3. Formulación de emulsiones $W_1/O$ con diferentes concentraciones de emulsificante lipofílico .....   | 46 |
| Tabla 5.4. Formulación de emulsión primaria $W_1/O$ para formar emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ . .....   | 48 |
| Tabla 5.5. Formulación de emulsiones múltiples con diferentes tipos de biopolímeros y mezclas de biopolímeros.....                                      | 49 |
| Tabla 5.6. Formulación de emulsiones múltiples con diferentes concentraciones de PS. . . . .  | 50 |
| Tabla 5.7. Composición de medio mineral utilizado por el consorcio microbiano para la degradación de MTBE .....   | 52 |
| Tabla 5.8. Microcosmos para las cinéticas de consumo de MTBE y producción de $CO_2$ .....   | 54 |
| Tabla 6.1. Comparación de medias de los glóbulos de la emulsión primaria $D_{3,2}$ formulada con Span 80 .....  | 61 |
| Tabla 6.2. Cinética de coalescencia de los glóbulos de la emulsión primaria formulada con diferentes fracciones de fase dispersa .....                  | 61 |
| Tabla 6.3. Cinética de coalescencia de los glóbulos de la emulsión múltiple formada con biopolímeros.....   | 64 |
| Tabla 6.4. Valores de la relación $D_{3,2}/D_{4,3}$ de las emulsiones múltiples formadas con biopolímeros.....  | 67 |
| Tabla 6.5. Cinética de cambio en el tamaño de los glóbulos de la emulsión múltiple formada con distintas concentraciones de polímero sintético.....     | 68 |
| Tabla 6.6. Valores de la relación $D_{3,2}/D_{4,3}$ de las emulsiones múltiples formadas con distintas concentraciones de polímero sintético.....       | 71 |
| Tabla 6.7. Cinética de cambio en el tamaño de los glóbulos de la emulsión primaria y múltiple conteniendo el consorcio microbiano .....                 | 74 |
| Tabla 6.8. Comportamiento de las principales variables de los microcosmos en medio mineral y en sistema de emulsión múltiple en presencia de MTBE ..... | 81 |
| Tabla 6.9. Comportamiento de las principales variables de los microcosmos en medio mineral y en sistema de emulsión múltiple en ausencia de MTBE .....  | 81 |
| Tabla 6.10. Contenido en microcosmos para la prueba de consumo de compuestos de emulsión .....  | 82 |
| Tabla 6.11. Contenido en microcosmos para la prueba de inhibición de consumo de MTBE por compuestos de emulsión.....                                    | 83 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Fig. 1.1. Representación gráfica de una emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ .....   | 4  |
| Fig. 1.2. Tipos de emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ de acuerdo a los glóbulos presentes en la fase interna.....  | 5  |
| Fig. 1.3. Ilustración esquemática del proceso de emulsificación de dos etapas de una emulsión múltiple.....   | 6  |
| Fig. 1.4. Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, pero pueden existir en un estado metaestable y por lo tanto ser cinéticamente estables.....  | 8  |
| Fig. 1.5. Principales mecanismos de inestabilidad en una emulsión simple.....   | 9  |
| Fig. 1.6. Orientación de algunos emulsificantes poliméricos en una interfase aceite-agua: (a) surfactantes de moléculas pequeñas, (b) biopolímeros flexibles, y (c) biopolímeros globulares.....  | 15 |
| Fig. 1.7. Flujo de agua hacia el subsuelo.....  | 25 |
| Fig. 1.8. Ruta metabólica propuesta para biodegradación aeróbica de MTBE.....   | 30 |
| Fig. 4.1. Esquema propuesto para la biodegradación de MTBE por un consorcio.....  | 38 |
| Fig. 5.1. Reactor agitado que contiene al consorcio microbiano degradador de MTBE   | 51 |
| Fig. 5.2. Propagación de biomasa en un matraz de procultivo de 1 L.....   | 52 |
| Fig. 5.3. Microcosmos con 10 mL de emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ .....  | 53 |
| Fig. 6.1. Comportamiento del diámetro de los glóbulos de la emulsión primaria con dos diferentes tipos de emulsificantes lipofílicos.....   | 59 |
| Fig. 6.2. Comportamiento de los glóbulos de la emulsión primaria con diferentes concentraciones de Span 80 a través del tiempo.....   | 60 |
| Fig. 6.3 A) Emulsión primaria con microorganismos sin tinción de Gram, observada al microscopio óptico con un aumento de 100x; B) Emulsión primaria con microorganismos observada al microscopio óptico con un aumento de 100x teñida por el método de Tinción de Gram..... | 63 |
| Fig. 6.4. Diámetro de glóbulos internos a través del tiempo en emulsiones múltiples formadas con biopolímeros.....  | 65 |
| Fig. 6.5. Diámetro de glóbulos externos a través del tiempo en emulsiones múltiples formadas con biopolímeros.....  | 66 |
| Fig. 6.6. Microfotografías de los glóbulos de las emulsiones múltiples a diferentes tiempos.....  | 67 |
| Fig. 6.7. Diámetro de glóbulos internos a través del tiempo en emulsiones múltiples formadas con distintas concentraciones de polímero sintético.....   | 69 |
| Fig. 6.8. Diámetro de glóbulos externos a través del tiempo en emulsiones múltiples formadas con distintas concentraciones de polímero sintético.....   | 69 |
| Fig. 6.9. Microfotografías de los glóbulos de las emulsiones múltiples formadas con polímero sintético observadas en diferentes tiempos.....  | 70 |
| Fig. 6.10. Relación $D_{3,2}/D_{4,3}$ de las emulsiones múltiples formadas con goma de mezquite y polímero sintético.....   | 71 |

|   |    |
|---|----|
| Fig. 6.11. Efecto de la adición de MTBE en la estabilidad de emulsiones múltiples a) Separación de fases de emulsión formulada con goma de mezquite b) Permanencia de la emulsión múltiple formulada con polímero sintético ..... | 73 |
| Fig. 6.12. Microfotografías de los glóbulos de las emulsiones múltiples formadas con polímero sintético observadas en diferentes tiempos.....   | 74 |
| Fig. 6.13. Comparación de diámetros de a) glóbulos internos y b) glóbulos externos a través del tiempo en emulsiones múltiples bióticas y abióticas.....  | 75 |
| Fig. 6.14. a) Consumo de MTBE y b) producción de CO <sub>2</sub> del consorcio microbiano en medio mineral .....  | 77 |
| Fig. 6.15. Producción de CO <sub>2</sub> del consorcio microbiano en medio mineral, en presencia y en ausencia de MTBE .....  | 78 |
| Figura 6.16. Biodegradación de MTBE del consorcio microbiano entrampado en la emulsión.....   | 79 |
| Fig. 6.17. Producción de CO <sub>2</sub> del consorcio microbiano entrampado en la emulsión múltiple, en presencia y en ausencia de MTBE.....   | 80 |
| Fig. 6.18. Prueba de consumo de los compuestos de la emulsión múltiple por el consorcio microbiano en microcosmos.....  | 84 |
| Fig. 6.19. Prueba de inhibición de los compuestos de la emulsión múltiple por el consorcio microbiano en microcosmos.....   | 85 |

## RESUMEN

Las aplicaciones de las emulsiones han sido ampliamente exploradas en el área alimentaria humana, animal, así como en el área farmacéutica. No obstante, en el área ambiental también se han propuesto para tratar aguas. Actualmente se ha logrado atrapar microorganismos en el sistema de emulsiones, ya que esta técnica permite incrementar las distancias de transporte de células degradadoras en el medio a tratar donde exista la presencia de contaminantes móviles. En el presente trabajo, se trató el metil ter butil éter –MTBE–, considerado un importante contaminante de aguas subterráneas, debido a su movilidad, a su naturaleza recalcitrante, y su potencial toxicidad. El objetivo de este estudio fue obtener una emulsión múltiple, para poder atrapar un consorcio microbiano capaz de degradar MTBE en esas condiciones.

Como primera etapa, se formuló una emulsión primaria ( $W_1/O$ ) variando los factores que afectan su estabilidad en el tiempo, como el tipo (Span 20 y Span 80) y concentración de emulsificante (0.5, 1, 2, 4, 8, 10, 16 y 30%), fracción de fase dispersa – $\phi$ – (0.1, 0.2, 0.3 y 0.4); además, se evaluó el efecto en la estabilidad con la presencia de los microorganismos atrapados en el interior de la emulsión. Posteriormente, con la emulsión  $W_1/O$  estable caracterizada en la primera etapa, se procedió a caracterizar la emulsión múltiple ( $W_1/O/W_2$ ) probando su estabilidad con biopolímeros (goma arábiga –GA– y goma de mezquite –GM– en una concentración de 10% en peso; también se realizaron combinaciones de estas gomas con quitosano –Q–, 10-0.4% respectivamente), y con un polímero sintético –PS– (ácido poliacrílico) en diferentes concentraciones (0.025, 0.05, 0.1, 0.2 y 0.4%). Con la formulación más estable, se observó el efecto de la adición de MTBE y el consorcio microbiano sobre la estabilidad de la emulsión  $W_1/O/W_2$ . Finalmente, se realizaron microcosmos para comprobar la biodegradación por parte del consorcio microbiano atrapado en la emulsión múltiple. Los resultados mostraron que el emulsificante que brindó mayor estabilidad a la emulsión  $W_1/O$  fue el Span 80, en una concentración de 8% y una  $\phi$  de 0.3. La adición del consorcio microbiano en el interior de la emulsión  $W_1/O$ , no afectó la estabilidad en el tiempo. La GM (10%) y el PS (0.2%) formaron una emulsión  $W_1/O/W_2$  estable en ausencia de MTBE, pero, en presencia de MTBE sólo la emulsión formada con PS persistió. La presencia del consorcio

microbiano en la emulsión  $W_1/O/W_2$  no afectó significativamente su estabilidad. El consorcio microbiano atrapado en la emulsión  $W_1/O/W_2$  fue capaz de degradar  $60.7 \pm 5.1\%$  de MTBE con una velocidad máxima de consumo de  $0.012 \pm 0.04 \text{ mg}_{\text{MTBE}}/\text{mg}_{\text{prot}} \text{ hr}$ . Sin embargo, se encontró que en ausencia de MTBE, el consorcio microbiano produjo  $\text{CO}_2$ , lo que sugirió el consumo de algún componente de la emulsión, lo que contribuye a disminuir la eficiencia de degradación de MTBE, debido a la presencia de una fuente alterna de carbono, por lo que para incrementar la biodegradación de MTBE, se deben utilizar materiales no biodegradables.

No obstante, con este trabajo se pudo establecer que es posible atrapar el consorcio microbiano viable en una emulsión múltiple estable, y se mantiene la actividad de degradación de MTBE. En trabajos futuros, se puede llegar a aplicar como una alternativa para el tratamiento de aguas contaminadas con MTBE provenientes de mantos acuíferos.

## ABSTRACT

The use of emulsions in the food and pharmaceutical fields has been extensively studied, but not in the environmental field, where their use is proposed. The use of emulsions entrapping microorganisms has allowed for a more efficient transport of degradative cells so as to achieve a much closer contact with mobile pollutants. In this work, methyl tertiary butyl ether – MTBE–, characterized by its mobility, recalcitrant nature and potential toxicity, was considered as a pollutant of subterranean water. The objective of this study was to obtain a multiple emulsion entrapping a microbial consortium capable of degrading MTBE.

In a first stage, a primary emulsion ( $W_1/O$ ) was formulated varying factors that affect its stability over time, as are the type (Span 20 and Span 80) and concentration (0.5, 1, 2, 4, 8, 10, 16 and 30%) of emulsifier, the dispersed phase volume fraction –  $\phi$  – (0.1, 0.2, 0.3, and 0.4); and the effect of the inclusion of microorganisms on stability. Once the conditions for obtaining a stable  $W_1/O$  emulsion were established,  $W_1/O/W_2$  multiple emulsion was characterized by evaluating the effect of biopolymers (Arabic gum –GA– and mesquite gum –MG– at 10% weight concentration; or combinations of GA or MG with chitosan –C– in a concentration 10-0.4% respectively), and a synthetic polymer –SP– (poly acrylic acid) in different concentrations (0.025, 0.05, 0.01, 0.02 y 0.4%). The effect of adding MTBE and of entrapping the microbial consortium on the stability of  $W_1/O/W_2$  emulsions was evaluated. Finally, microcosms were employed for evaluating the MTBE biodegradation capacity of the entrapped microorganisms in the  $W_1/O/W_2$  multiple emulsion. Results showed that the emulsifier that provided best stability to  $W_1/O$  emulsion was Span 80 at 8% concentration and  $\phi = 0.3$ . Addition of the microbial consortium in  $W_1/O$  emulsion did not affect its stability overtime. Both, MG (10%) and SP (0.2%) formed stable  $W_1/O/W_2$  multiple emulsions without MTBE, but when put into media with MTBE, only emulsion formed with SP persisted. The inclusion of microbial consortium in  $W_1/O/W_2$  emulsion did not affect significantly its stability.

The entrapped microbial consortium in  $W_1/O/W_2$  emulsion was capable of degrading  $60.7 \pm 5.1\%$  of MTBE with a maximum consumption rate of  $0.012 \pm 0.04 \text{ mg}_{\text{MTBE}}/\text{mg}_{\text{prot}} \text{ hr}$ . However, it was found that in the absence of MTBE, the microbial consortium produced  $\text{CO}_2$ ,

so that it is assumed that it is consuming an emulsion component. This causes a reduction in MTBE degradation efficiency, due to the presence of an alternative carbon source. In order to increase MTBE biodegradation only non-biodegradable compounds should be use in the emulsion formulation.

Nevertheless, it was established in this work that entrapment of a viable microbial consortium in a multiple emulsion is possible, which is capable of degrading MTBE. In the future, it may be possible to apply this technology in the treatment of polluted waters containing MTBE.

# INTRODUCCIÓN



En los últimos años, se ha incrementado el interés por el uso de emulsiones en diversos campos como la liberación prolongada de fármacos, en el área de alimentos, cosméticos, agricultura (Florence y Whitehill, 1981), tratamiento de aguas residuales, inmovilización de enzimas, separación de metales pesados (Garti y Aserín, 1996) e incluso la encapsulación de microorganismos (Adhikari y col., 2000) para diversos fines.

Las emulsiones múltiples ( $W_1/O/W_2$ ) son membranas líquidas donde una emulsión sencilla agua en aceite ( $W_1/O$ ) se dispersa en una segunda fase acuosa ( $W_2$ ) llamada externa. Pero, en la práctica, las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables debido a diferentes tipos de procesos químicos y físicos tales como la coalescencia, floculación y cremado. Por lo que, en este sentido, es preciso obtener una emulsión cinéticamente estable para poder utilizarla en el área ambiental atrapando un consorcio microbiano capaz de degradar Metil *tert*-Butil Éter (MTBE).

La contaminación de los mantos acuíferos por MTBE se da por accidente cuando hay derrames en el suelo de gasolina y por lixiviación llegan a sus aguas.

El MTBE es un compuesto que ha sido ampliamente reportado como contaminante de los mantos acuíferos por su alta solubilidad en agua (50g/L) y baja biodegradabilidad en el suelo (Fortin y col., 2001). Este contaminante se encuentra en muy baja concentración (~10-40  $\mu\text{g/L}$ ) y se ha sugerido que es tóxico para los seres vivos (Odencrantz y González, 1997). Por esto, se ha generado un gran interés en su eliminación a través de diferentes tratamientos, el método que propone mejores resultados es la biodegradación y se ha encontrado un consorcio microbiano que en condiciones aerobias consume este compuesto (López y col., 2004). Sin embargo, debido a que el contaminante está presente en bajas concentraciones, es preciso desarrollar una tecnología alternativa que coadyuve a biodegradarlo eficazmente.

La aplicación de emulsiones cinéticamente estables conteniendo el consorcio microbiano en su interior nos provee de una capacidad de alcance a los microorganismos de su fuente de carbono, por medio de la dispersión de gotas que en su interior los contengan.

En este trabajo se pretendió obtener una emulsión agua-en-aceite-en-agua ( $W_1/O/W_2$ ) cinéticamente estable, de manera que funcionara como una matriz porosa (Moslemy y col., 2002) que permitiera una adecuada difusión del contaminante y los gases disueltos para ser biodegradado por el consorcio microbiano atrapado en su interior.

## Capítulo 1

# MARCO TEÓRICO

## 1.1 Emulsiones.

### 1.1.1 Concepto y tipos.

Las emulsiones son sistemas dispersos de dos (o más) líquidos insolubles, por ejemplo agua y aceite. Dependiendo cual es la fase dispersada y cual es la fase continua, hay dos tipos de emulsiones: aceite en agua (O/W) y agua en aceite (W/O) (Charcosset y col., 2004; McClements, 1999), suelen llamarse emulsiones simples. Los sistemas con una emulsión simple como fase dispersa (que en este caso, cambia su nombre a emulsión primaria) son llamados emulsiones múltiples (Fig. 1.1), por ejemplo, agua-en-aceite-en-agua ( $W_1/O/W_2$ ) o aceite-en-agua-en-aceite ( $O_1/W/O_2$ ). En ambos casos, la fase interna y externa son parecidas químicamente y una fase intermedia inmisible separa físicamente las dos fases parecidas químicamente (Dickinson, 1992).

Cada glóbulo dispersado en una emulsión múltiple  $W_1/O/W_2$  forma una estructura vesicular con uno o más compartimentos acuosos separados de la fase acuosa continua por una capa de fase oleosa (Florence y col., 1976; Florence y Whitehill, 1981; Florence y Whitehill, 1982; Fox, 1986). La figura 1.2 es un esquema de los posibles tipos de emulsión múltiple  $W_1/O/W_2$  de acuerdo al número y configuración de los glóbulos de la fase interna (Myers, 1991). Las emulsiones del tipo C, presentan un gran número de glóbulos en la fase interna, y confiere mayor estabilidad y generalmente se considera como el mejor vehículo de compuestos (Dickinson, 1992).

Las emulsiones juegan un papel importante en la formulación de cosméticos, farmacéuticos, pinturas, alimentos, y, en los últimos tiempos, en el área ambiental. También se aplican en la industria del petróleo, especialmente durante la producción del aceite crudo y en algunos procesos de extracción de solventes (Vladislavljević y Schubert, 2002).

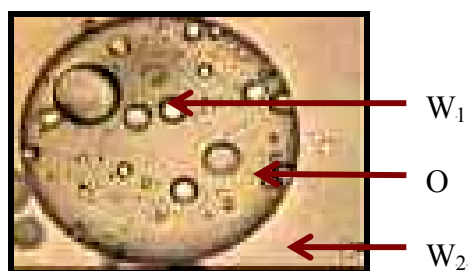
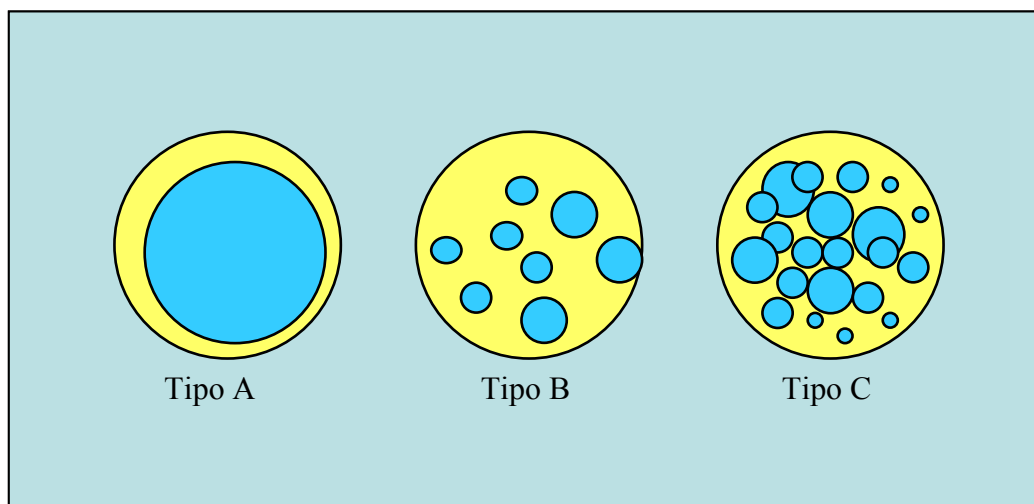


Fig. 1.1. Representación gráfica de una emulsión múltiple  $W_1/O/W_2$ .

Otra forma de llamar a las emulsiones múltiples es membrana líquida y fue inventada por Li en 1968, y han sido propuestas como soluciones a un gran número de problemas de eliminación de residuos en aguas (Li y col., 1973). Se definen como emulsiones inmiscibles en agua que consisten en una fase oleosa compuesta de surfactantes y varios aditivos en un solvente hidrocarbonado el cual encapsula glóbulos microscópicos de una solución acuosa de reactivos apropiados para remover y atrapar contaminantes de aguas residuales (Kitagawa y col., 1977).

Las emulsiones son usualmente preparadas usando homogenizadores de alta presión, homogenizadores ultrasónicos y sistemas de roto/estator, tales como vasos agitados, molinos coloidales, entre otras máquinas.



*Fig. 1.2. Tipos de emulsión múltiple  $W_1/O/W_2$  de acuerdo a los glóbulos presentes en la fase interna.*

### 1.1.2 Proceso de emulsificación.

Las emulsiones múltiples pueden ser formadas por emulsificación de una o dos etapas. El método de una etapa fue basado en el concepto que una emulsión múltiple es una mesofase entre una emulsión O/W y una W/O (Shinoda y Kunieda, 1983; Lin y col., 1975). Tal mesofase puede lograrse por el incremento de temperatura de una emulsión consistente de emulsificantes no iónicos o por mezcla de dos diferentes tipos de emulsificantes. Se podría decir, que la región para obtener emulsiones O/W/O y W/O/W se encuentra muy cerca de la

fase surfactante. El proceso de una etapa es difícil de controlar; por esto, el método de las dos etapas fue adoptado (Matsumoto, 1987; Mulley y Marland, 1970). En la primera etapa de este método, una emulsión W/O se prepara empleando un exceso de emulsificante lipofílico, y aplicando una fuerte homogenización, para formar las gotas o glóbulos más pequeños posibles. En la segunda etapa, una emulsión múltiple W/O/W se forma por la adición de una W/O (nombrada emulsión primaria) al agua, en la cual, un emulsificante hidrofílico ha sido disuelto (Fig. 1.3). Una típica emulsión W/O/W estabilizada por emulsificantes monoméricos consiste de glóbulos internos de la emulsión W/O de tamaño  $0.5\text{-}2\mu\text{m}$  y de la múltiple (fase externa) de  $10\text{-}60\mu\text{m}$ .

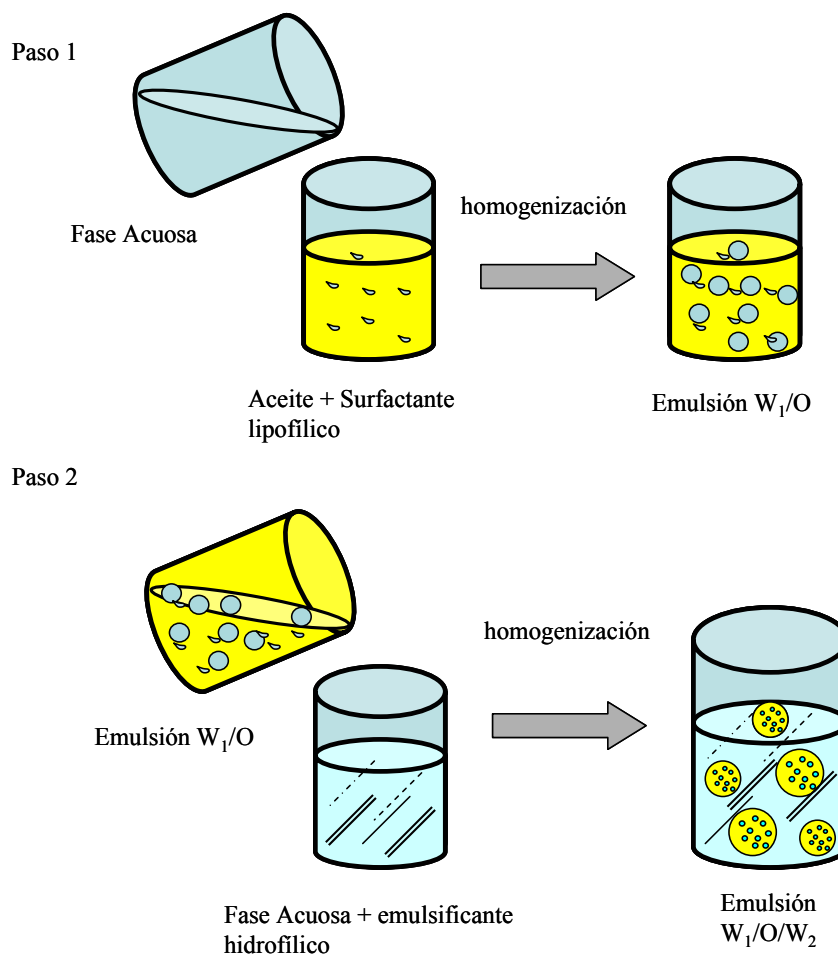


Fig. 1.3. Ilustración esquemática del proceso de emulsificación de dos etapas de una emulsión múltiple.

### 1.1.3 Factores de estabilidad de emulsiones.

Desde el punto de vista termodinámico, en un sistema bifásico, la fase dispersa consiste de glóbulos microscópicos, usualmente con un rango de tamaño de 0.1 a 100  $\mu\text{m}$  en diámetro. Tales dispersiones nunca son *completamente estables* en el sentido absoluto, porque la interfase entre las fases es el lugar de energía libre superficial, y si dos glóbulos se encuentran juntos hay una reducción neta en el área interfacial. Por esta razón, la coalescencia de los glóbulos es un proceso termodinámicamente espontáneo, pero el proceso inverso requiere gasto de energía y por eso no ocurre espontáneamente (Sherman, 1968).

Las emulsiones son sistemas inestables debido a que el contacto entre moléculas de agua y aceite no es favorable termodinámicamente, es decir, son altamente dinámicas por lo que ocurren movimientos e interacciones continuas en el tiempo, afectando las propiedades fisicoquímicas de la emulsión (Dickinson, 2003).

El cambio de energía libre asociada con la formación de la emulsión determina si una emulsión es o no termodinámicamente estable, pero no da una indicación de la velocidad con la que las propiedades de una emulsión cambian a través del tiempo, ni el tipo de cambios que pueden ocurrir, o los mecanismos físicos responsables de estos cambios. La información acerca de la dependencia del tiempo en la estabilidad de la emulsión es particularmente importante para los científicos en alimentos quienes necesitan crear productos alimentarios que retengan sus propiedades deseables por un tiempo suficientemente largo bajo una variedad de diferentes condiciones ambientales. Por esta razón, los investigadores se interesan más en la estabilidad cinética de las emulsiones, que en su estabilidad termodinámica (McClements, 1999).

La importancia de los efectos cinéticos se destaca al comparar la estabilidad a largo plazo de las emulsiones con la misma composición pero con diferentes tamaños de glóbulos. Una emulsión que contiene glóbulos pequeños usualmente tiene una mayor vida de anaquel (estabilidad cinética más grande) que una que contenga glóbulos grandes, aunque sea más inestable termodinámicamente (porque tiene un área interfacial mayor) (McClements, 1999).

A pesar del hecho de que las emulsiones existen en un estado termodinámicamente inestable, muchas de ellas permanecen cinéticamente estables (*metaestables*) por meses o incluso años.

Conceptualmente, la estabilidad cinética de una emulsión puede atribuirse a la presencia de una barrera energética entre dos niveles energéticos; esto es, una energía de activación ( $\Delta G^*$ ), la cual debe superarse antes de que se alcance el estado termodinámicamente más favorable (Fig. 1.4). Una emulsión que es cinéticamente estable debe tener una energía de activación significativamente más grande que la energía térmica del sistema ( $kT$ ). En realidad, las emulsiones tienen un número diferente de estados metaestables, y cada uno de ellos tiene su propia energía de activación. Así, una emulsión puede moverse de un estado metaestable a otro antes de que finalmente alcance el estado termodinámicamente estable.

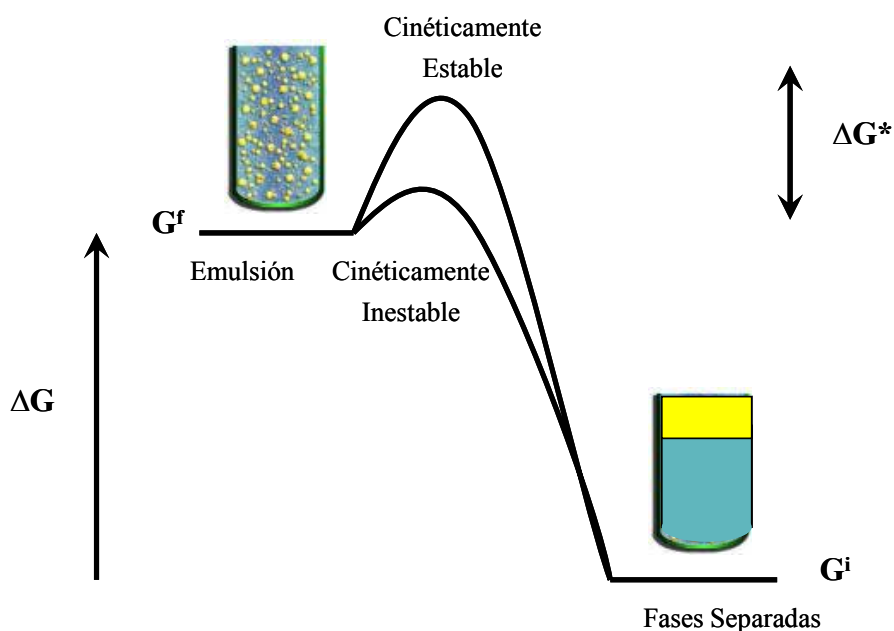


Fig. 1.4. Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, pero pueden existir en un estado metaestable y por lo tanto ser cinéticamente estables.

Una emulsión cinéticamente estable (metaestable) es aquella en la que no se presentan cambios marcados en la distribución del tamaño de los glóbulos, o su estado de agregación, o su arreglo espacial en la escala del tiempo de observación. Esta escala de tiempo puede variar de horas a meses dependiendo de la situación (Dickinson, 2003).

Existe una variedad de mecanismos fisicoquímicos reconocidos como los responsables de las alteraciones en las propiedades de la emulsión o en la inestabilidad de una emulsión simple.

Los mecanismos de inestabilidad física de las emulsiones simples se muestran en la figura 1.5. Las formas de separación gravitacional están representados por el *cremado*, en donde la fase dispersa tiene menor densidad que la fase continua y se observan dos regiones –crema y suero– y la *sedimentación*, en la cual, los glóbulos dispersados se precipitan debido a una densidad mayor que la fase continua. También se puede presentar el fenómeno de agregación de glóbulos mostrados en la *floculación*, cuando dos o más glóbulos forman un conglomerado conservando su integridad individual, este fenómeno depende de varios factores tales como cobertura de la superficie de los glóbulos por un polímero, el espesor de la capa, la densidad de la carga superficial, y las condiciones de la solución acuosa (especialmente el pH, la fuerza iónica, y el contenido de iones divalentes); y la *coalescencia* tiene lugar cuando al chocar dos o más glóbulos, éstos se fusionan generando un glóbulo de mayor tamaño. La *inversión de fases* sucede cuando una emulsión O/W es convertida en una emulsión W/O o viceversa (Garti y Aserín, 1996). Por lo que respecta a los mecanismos de inestabilidad química en una emulsión simple, éstos se pueden dar debido a la oxidación y la hidrólisis de los componentes.

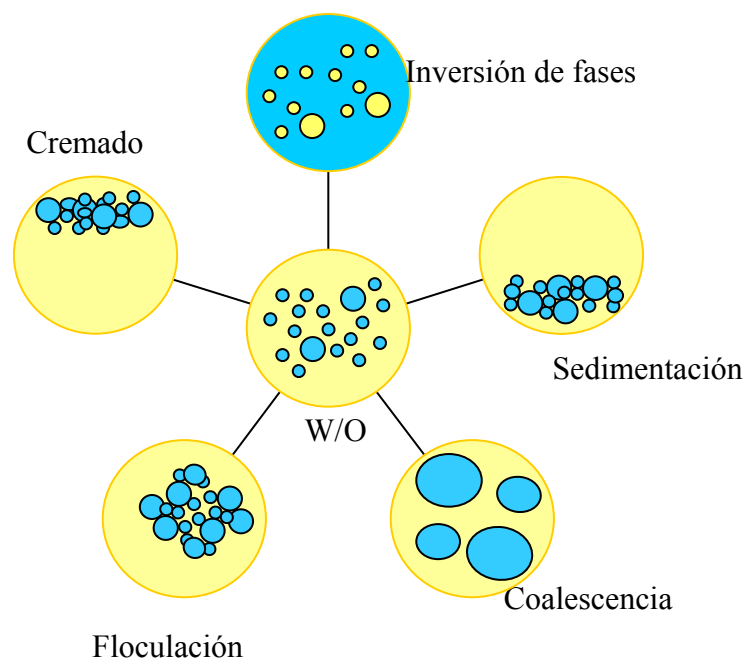


Fig.1.5. Principales mecanismos de inestabilidad en una emulsión simple.



Otros factores que juegan un papel importante en la estabilidad de la emulsión son el pH, el óptimo es de 4 a 8; resistencia a altas fuerzas de corte; presencia de sales o cationes solubles; tamaño de partícula, un tamaño muy grande de gota de aceite, a veces puede provocar que la suspensión del aceite en agua se dificulte, el tamaño de la gota de aceite puede ser disminuido incrementando el tiempo de mezclado, utilizando agitación moderada cuando se está preparando la emulsión. Además también tiene influencia el método de emulsificación (Noveon Inc., 2001); el tipo y concentración de emulsificante, la temperatura y la viscosidad (Dickinson, 1993).

En la práctica, pueden presentarse más de uno de los mecanismos de inestabilidad de manera simultánea en una emulsión simple, lo que dificulta obtener una emulsión cinéticamente estable. Y en la emulsión múltiple, los mecanismos de inestabilidad ocurren en la emulsión primaria y en la múltiple, por lo que la probabilidad de que sea una emulsión estable se minimiza.

Las emulsiones múltiples al ser más inestables, tarde o temprano, ellas se invierten a emulsiones simples (Matsumoto, 1987).

En este caso, el rompimiento de la emulsión se lleva a cabo mediante dos procesos: (i) agregación de las gotas múltiples; y (ii) rompimiento de las gotas múltiples. Existen varias teorías que explican este fenómeno. La más aceptada plantea la presencia de un gradiente osmótico entre los dos lados de la capa oleosa. Esto causa el hinchamiento de las gotas internas de agua, las cuales llegan a romper la capa oleosa resultando en la unificación de las fases acuosa interna y externa. Aun no están definidas las relaciones cuantitativas entre los más importantes componentes (por ejemplo la concentración del primer emulsificante) y la estabilidad de estos sistemas (Csóka y Erős, 1997).

Balázs y col. (1988), y Erős y col. (1990) confirmaron que la formación y estabilidad de las emulsiones múltiples W/O/W son principalmente influenciadas por dos factores: (i) la estructura de la interfase agua/aceite y su saturación por el emulsificante; y (ii) el número de las gotas múltiples y las posibles interacciones entre ellas.

La fase acuosa puede contener una variedad de ingredientes solubles en agua, incluyendo azúcares, sales, ácidos, bases, surfactantes, proteínas y carbohidratos. La fase oleosa usualmente contiene una mezcla compleja de compuestos solubles en lípidos, tales como

triacilgliceroles, ácidos grasos libres, esteroides, y vitaminas. La región interfacial puede contener una mezcla de varios compuestos con actividad superficial, incluyendo proteínas, fosfolípidos, surfactantes, alcoholes y partículas sólidas. En suma, estos componentes pueden formar varios tipos de entidades estructurales en el aceite, agua, o regiones interfaciales, tales como cristales grasos, cristales de hielo, agregados proteínicos, burbujas de aire, cristales líquidos y micelas de surfactante. Es claro que las emulsiones son estructuralmente y dinámicamente materiales complejos y muchos factores contribuyen a sus propiedades (McClements, 1999).

#### 1.1.4 Emulsificantes y estabilizantes.

En la formulación de emulsiones, se distinguen dos tipos de ingredientes; agente emulsificante, que es un agente químico individual (o mezcla de especies) que promueve la formación de la emulsión y un corto periodo de estabilización por la acción interfacial; y agente estabilizante, que es un compuesto único (o mezcla) que confiere un largo periodo de estabilidad en la emulsión por mecanismo de adsorción, aunque no necesariamente en todos los casos (Dickinson, 1992).

Se pueden obtener emulsiones cinéticamente metaestables de mediano o largo plazo, y para ello se emplean emulsificantes previo a la homogenización. Los emulsificantes son moléculas con actividad superficial que se adsorben en la superficie de los glóbulos durante la homogenización, formando una membrana protectora que previene la agregación de los glóbulos y además disminuyen la tensión superficial en la interfase. La mayoría de los emulsificantes son moléculas anfífilas, es decir, contienen regiones polares y no polares en la misma molécula (Dickinson, 2003).

Los emulsificantes, pueden además tener propiedades espesantes, que sirven para incrementar la viscosidad de la fase continua de la emulsión y refuerza la estabilidad retardando el movimiento de los glóbulos (McClements, 1999).

La estabilidad de las emulsiones es de vital importancia en aplicaciones industriales. Las características deseables (Cobb, 1946) de un emulsificante pueden englobarse en los siguientes puntos. (1) Deben reducir la tensión interfacial a alrededor de 5 dinas/cm en emulsiones

preparadas con agitación. (2) Deben adsorberse rápidamente alrededor de los glóbulos dispersos como un condensado, una película no adherente que no se adelgace cuando dos glóbulos colisionen y no permita la floculación o coalescencia. (3) Debe tener estructura molecular específica con terminación polar para atraer al agua o terminación apolar para atraer al aceite. (4) Debe ser más soluble en la fase continua así que debe adsorberse rápidamente alrededor de los glóbulos de la emulsión. (5) Debe mostrar un adecuado potencial electrocinético. (6) Debe influenciar la viscosidad de la emulsión. (7) Mostrar capacidad para emulsificar el sistema requerido con pequeñas concentraciones de emulsificante. (8) Debe ser relativamente económico. (9) Debe ser seguro y no tóxico.

Los mecanismos de inestabilidad en una emulsión tanto simple como múltiple, son influenciados por la concentración de los emulsificantes en las fases acuosas, y en mayor grado, por la concentración del emulsificante liposoluble, la naturaleza y viscosidad de la fase oleosa, la naturaleza y concentración de los ingredientes que se encapsulan en la fase acuosa interna, o de aquellos que se piensan separar en la fase acuosa externa, así como la adsorción de moléculas en las interfases (Wen y Papadopoulos, 2001).

#### 1.1.4.1 Surfactantes de bajo peso molecular.

Un factor importante en el desarrollo de emulsiones, es el tipo de emulsificante, los más comunes son conocidos como surfactantes (Kobayashi y col., 2002; Schröder y Schubert, 1999).

Por definición, un surfactante es una molécula anfifílica que tiene una “cabeza” con un grupo hidrofílico, el cual tiene una alta afinidad por el agua y una “cola” con un grupo lipofílico el cual tiene una alta afinidad por el aceite (Hasenhuettl, 1997). Existen diferentes tipos de surfactantes y pueden ser aniónicos (e.g., sales de sodio de ácidos grasos, lauril sulfato), catiónicos (contienen compuestos nitrogenados del tipo sal de amina grasa o de amonio cuaternario) y no iónicos (e.g., monoacilgliceroles, ésteres de ácidos grasos).

Los surfactantes no iónicos pueden tornarse relativamente hidrofílicos gracias a la presencia de una cadena poliéter del tipo polióxido de etileno. El grupo hidrófobo es generalmente un

radical alquilo o alquil benceno y a veces una estructura de origen natural como un ácido graso, sobre todo cuando se requiere una baja toxicidad (Salager, 2002).

Estos surfactantes no iónicos no producen iones en solución acuosa y por este hecho son compatibles con cualquier otro tipo; es por esto que son excelentes candidatos para formulaciones complejas que se consiguen a menudo en aplicaciones prácticas.

Por otra parte estos surfactantes son menos sensibles a los electrolitos, especialmente a los cationes divalentes, que los aniónicos, y pueden por lo tanto, ser utilizados en presencia de una salinidad alta. Algunos presentan muy bajo nivel de toxicidad y se utilizan en la fabricación de fármacos, cosméticos y alimentos (Salager, 2002).

En general, el grupo de la cola de los surfactantes usualmente consiste de una o más cadenas hidrocarbonadas de entre 10 y 20 átomos de carbono por cadena (Bergenshtahl, 1997).

Los surfactantes juegan dos funciones principales en la formación de la emulsión. Primeramente, ellos reducen la tensión superficial entre el aceite y el agua, esto facilita la distribución de los glóbulos. En segundo lugar, los surfactantes estabilizan los glóbulos en contra de la coalescencia y/o agregación (Kobayashi y col., 2002).

La literatura de las emulsiones múltiples se refiere casi en su totalidad a sistemas estabilizados con agentes surfactantes de bajo peso molecular, en los que destacan los siguientes aspectos: las relaciones de fracción volumétrica ( $\phi$ ) entre la emulsión primaria ( $W_1/O$ ) y de ésta con la emulsión múltiple ( $W_1/O/W_2$ ) para obtener un sistema estable se encuentran entre 0.2 a 0.5 (Dickinson y McClements, 1996); la relación de agente emulsificante hidrofílico-lipofílico debe encontrarse entre 2-20 para obtener el mejor rendimiento (Sholmo y col., 1984); el tamaño de partícula de la emulsión  $W_1/O$  debe ser muy pequeño (0.5-2  $\mu\text{m}$ ) y entre más pequeño, se mejora la estabilidad; el tamaño de partícula de la emulsión múltiple  $W_1/O/W_2$  en relación a la emulsión primaria  $W_1/O$  debe ser sustancialmente mayor (10-60  $\mu\text{m}$ ) o esto conlleva a la inversión de fases de la emulsión múltiple (Garti y Aserín, 1996).

Lo anterior implica el uso de muy bajas concentraciones de agente surfactante en la fase acuosa externa (ya que a mayor concentración menor tamaño de partícula) y bajas velocidades de agitación, sin embargo éstos resultados están en contraposición con las características para la obtención emulsiones múltiples estables, que involucran el uso de biopolímeros como material de pared en muy altas concentraciones.

Por todo lo anterior, se recomienda el uso de una mezcla de compuestos, un surfactante lipofílico en la fase oleosa y un polímero hidrofílico en la fase acuosa externa, para permitir una emulsión múltiple  $W_1/O/W_2$  persistente en el proceso de emulsificación. Específicamente la estabilidad de fase acuosa interna ( $W_1$ ) y la emulsión externa cambia con la formulación, composición y la viscosidad del aceite (Allouche y col., 2003).

#### 1.1.4.2 Polímeros de alto peso molecular.

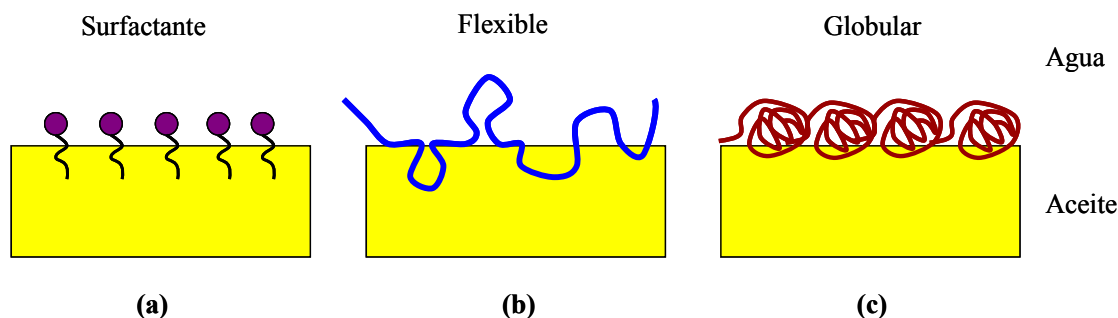
##### Biopolímeros.

Las proteínas y los polisacáridos son dos de los biopolímeros más importantes usados como ingredientes en las emulsiones (Damodaran, 1996). El uso de sustancias macromoleculares tales como gomas, proteínas y polímeros sintéticos ha favorecido la formación de emulsiones estables (Garti, 1997).

Muchos emulsificantes usados en la industria alimentaria son parcial o enteramente poliméricos: como las proteínas y los polisacáridos, y muchos surfactantes no iónicos con cabeza polar (polímeros de oxietileno). La conformación de un emulsificante polimérico en una interfase depende del número, tipo y secuencia de monómeros a lo largo de su esqueleto (Damodaran, 1996).

Un emulsificante tiende a adoptar una conformación interfacial que minimiza la energía libre del sistema (Damodaran, 1989). La energía libre conformacional está determinada por varias contribuciones entálpicas (interacciones energéticas intermoleculares) y entrópicas (entropía configuracional y solvatación). En la práctica, el factor más importante que determina la conformación interfacial del emulsificante es el efecto hidrofóbico (esto es, la tendencia por una molécula a adoptar un arreglo el cual minimice el número de contactos desfavorables entre grupos polares y no polares) (Damodaran, 1989). Así, las pequeñas moléculas de surfactantes, adoptan una conformación en la cual las colas hidrocarbonadas se proyectan dentro de la fase oleosa, mientras que, la cabeza del grupo hidrofílico se proyecta dentro de la fase acuosa (Fig. 1.6a). Los biopolímeros flexibles, tales como la caseína o almidones modificados, existen como una serie de línea curva continua (Fig. 1.6b). Inmediatamente

después de la adsorción, los biopolímeros compactos (proteínas globulares) tienden a adoptar una orientación que maximiza el área de contacto entre algún espacio hidrofóbico en su superficie y la fase oleosa (Fig. 1.6c) (Damodaran, 1989). Después de la adsorción, las



moléculas de proteína pueden cambiar su conformación en respuesta a su nuevo ambiente (Dickinson y McClements, 1995).

Fig. 1.6. Orientación de algunos emulsificantes poliméricos en una interfase aceite-agua: (a) surfactantes de moléculas pequeñas, (b) biopolímeros flexibles, y (c) biopolímeros globulares.

Para que un biopolímero sea un estabilizante efectivo en partículas dispersas debe exhibir cuatro características: *adsorción fuerte*, implica que el polímero anfifílico tiene un grado sustancial de carácter hidrofóbico (ejemplo, lados no polares de cadenas o fracción proteínica); *cobertura superficial completa*, debe existir suficiente polímero para saturar la superficie de los glóbulos; *capacidad de formación de una capa estérica gruesa estabilizante*, el polímero es predominantemente hidrofílico y de alto peso molecular ( $10^4 - 10^6$  Da) dentro de un medio acuoso con buenas propiedades solventes; *formación de una capa estabilizante cargada*, la presencia de grupos cargados en el polímero contribuye a la interacción electrostática repulsiva entre superficies de partículas, especialmente en baja fuerza iónica (esta característica es solo si la capa polimérica no es suficientemente gruesa).

Para una buena estabilización estérica se necesita en el polímero una pequeña fracción hidrofóbica que se adsorba fuertemente (para mantener a la macromolécula permanentemente fija a la superficie) y la fracción mayoritaria de un segmento hidrofílico no adsorbido (para proveer una capa protectora y espesar el medio) (Dickinson, 1988; Garti, 1997).

Las interacciones de van der Waals siempre operan entre los glóbulos de la emulsión y estas interacciones son suficientemente fuertes para causar agregación de los glóbulos, excepto si

hay una fuerte interacción repulsiva que prevenga el acercamiento de los glóbulos (McClements, 1999). Cuando los glóbulos de una emulsión están rodeados por una capa de moléculas de emulsificante eléctricamente cargadas (biopolímeros), ellos se estabilizan contra la agregación, por la repulsión electrostática.

Es conocido que los complejos biopoliméricos poseen la capacidad de formar y estabilizar sistemas alimenticios dispersos, y que tales complejos se forman principalmente entre macromoléculas cargadas opuestamente (Plashchina y col., 2001), particularmente entre proteínas y polisacáridos debido a su punto isoeléctrico (Renard y col., 1997). El equilibrio termodinámico entre una mezcla proteína-polisacárido puede ser alcanzado cuando las interacciones atractivas entre los biopolímeros se favorecen con el detrimento del solvente por el llamado fenómeno de coacervación compleja (Schmitt y col., 2001). Tal es el caso de la goma Arábiga (GA) y la goma de mezquite (GM), debido a que en su estructura poseen una pequeña fracción proteica.

Tradicionalmente, la GA ha sido el material elegido para encapsulación de lípidos debido a sus eficientes características de emulsificación (Kenyon, 1995) y a la estabilidad antioxidativa que provee a los aceites (Thevenet, 1995). Sin embargo, la GA tiene muy alto costo, por lo que los industriales han buscado materiales alternativos para la encapsulación, tal como la goma de mezquite (GM) (Vernon-Carter y col., 2000), que tiene una estructura similar a la GA, y ha sido reportada como un buen agente emulsificante de aceite de cáscara de naranja (Beristain y col., 2002) y oleorresina de chile (Vernon-Carter y col., 1998). La goma de mezquite (*Prosopis* spp.) ha sido propuesta como un sustituto de la goma arábiga (*Acacia senegal*) y es reportada como un excelente agente encapsulante de aceites esenciales en un amplio rango de actividades de agua, y un agente emulsificante y estabilizante de colorantes naturales extendiendo su vida de anaquel más allá de la que provee la GA (Pérez-Alonso y col., 2003). La capacidad de la goma de mezquite de formar películas es debido a la formación de capas macromoleculares estabilizantes alrededor de los glóbulos de aceite, y no por modificación de la reología de la fase acuosa. Debido a su baja actividad superficial en comparación con las proteínas emulsificantes, se requiere una alta proporción de goma-aceite para obtener emulsiones aceite-en-agua con tamaños de glóbulos pequeños y homogéneos (Vernon-Carter y col., 2000).

Se ha reportado que químicamente, la goma de mezquite es una sal neutra de un polisacárido ramificado de naturaleza ácida formado por un núcleo de residuos de  $\beta$ -D-galactosa, constituyendo un esqueleto de uniones (1-3) y ramificaciones (1-6) conteniendo L-arabinosa (formas cíclicas de piranosa y furanosa), L-ramnosa,  $\beta$ -D-glucuronato y 4-O-metil- $\beta$ -D-glucuronato como azúcares simples o cadenas laterales de oligosacáridos. La goma de mezquite también contiene una pequeña cantidad de proteína (0.7-5.8%) ubicada en la parte central de la estructura principal, siendo químicamente muy similar a la goma arábiga (Vernon-Carter y col., 2000; Orozco-Villafuerte y col. 2003). Es un polielectrolito, es decir, una macromolécula que posee un gran número de grupos ionizables. La goma de mezquite es un agente emulsificante muy efectivo, esta propiedad está relacionada con su contenido proteico, el cual le confiere un modelo de estructura de “Wattle–blossom” similar a la sugerida para la goma arábiga, en la que los residuos de aminoácidos se anclan en la interfase y los bloques de carbohidratos se extienden en la solución acuosa, evitando la floculación y coalescencia de las gotas debido a efectos estéricos. Estas características y propiedades le confieren un gran potencial para su uso como material estructural en la elaboración de emulsiones múltiples.

Se ha sugerido la mezcla de varios materiales para obtener un mejor rendimiento comparado cuando se usan estos ingredientes solos (Kenyon, 1995). Para esto, es conveniente determinar una óptima combinación de materiales que provean una excelente capacidad de emulsificación. Este es el caso de los biopolímeros de naturaleza polisacárida, tales como la goma arábiga (GA), goma de mezquite (GM) y maltodextrina (MD) (Kenyon, 1995).

El quitosano, es un biopolímero que se ha propuesto para emplearse en combinación con gomas para aumentar la estabilidad de las emulsiones debido a su carácter catiónico. El quitosano es un polisacárido lineal que contiene dos residuos de azúcar, N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina, respectivamente, ambos con enlaces  $\beta$ -1,4. Tiene la capacidad de disolverse en soluciones acuosas ácidas diluidas (Ruiz-Ramos y col., 2004). Su peso molecular tiene un rango de 10,000 a 1,000,000 g/mol. El polímero en solución, tiene una forma enrollada expandida aleatoriamente (Fredheim y Christensen, 2003).

Es un componente polimérico de complejos polielectrolitos, ya que tiene la capacidad de formar películas con buenas propiedades mecánicas y de permeabilidad, y se ha referido como



un potencial agente encapsulante (Goycoolea y col., 2000). Se ha incrementado el uso de quitosano para proveer estabilidad microbiológica de productos tales como emulsiones alimenticias, pero su aplicación en productos en los cuales la capacidad emulsificante es importante para lograr eficiencias en el proceso (e.g. microencapsulación por secado por aspersión de aceites esenciales) es limitada, a pesar de su buena propiedad de formar películas (Pérez-Orozco y col., 2004).

Polímero sintético: ácido poliacrílico.

El ácido poliacrílico es un emulsificante polimérico de alto peso molecular, tiene una pequeña porción que es afín al aceite (lipofílica), además de poseer una porción grande afín al agua (hidrofílica). Se puede considerar como un surfactante polimérico de tipo catiónico que contiene grupos carboxílicos (Salager y Fernández, 2004).

La estructura química del ácido poliacrílico permite que funcione como emulsificante y proporciona viscosidad en interfases aceite en agua (O/W). La porción lipofílica se adsorbe en la interfase aceite-agua, y la porción hidrofílica se hincha en agua, formando una red de gel alrededor de los glóbulos de aceite, para proveer una estabilidad excepcional a una amplia gama de aceites por medio del espesamiento y dando un poder de suspensión o estructura a la fase acuosa (Noveon Inc., 2001). La alta viscosidad de las soluciones se debe a la solvatación de los grupos carboxílicos y a veces a la formación de enlaces laterales entre cadenas mediante puente hidrógeno con una misma molécula de solvente (Salager y Fernández, 2004).

Las emulsiones formadas con bajas concentraciones de este tipo de emulsificante, son altamente estables. Los glóbulos de aceite son protegidos y suspendidos como resultado de la producción de un gel acuoso que se adsorbe alrededor de ellos (Noveon Inc., 2001).

#### 1.1.5 Aplicaciones de emulsiones en tratamiento de aguas.

La técnica de emulsiones múltiples también ha sido utilizada el para tratamiento de aguas residuales, específicamente para extraer amonio, sulfuro y amoniaco (Cahn y col., 1978); iones de metales pesados como cadmio, sales inorgánicas -NaCl- (Kitagawa y col., 1977,

2001); fenol (Kim y col., 1983); cobre, níquel, zinc, mercurio, cromo y plomo (Raghuraman y col., 1994, 1995); (Kiyoyama y col.), aminas (Teramoto y col. 1981), metales raros (Li y col., 1973); etc.

Un ejemplo claro de utilización de emulsiones múltiples para eliminación de residuos contaminantes es el experimento realizado por Kim y col. (1983) para remover fenol de aguas residuales. La forma de realizar la eliminación de fenol en aguas residuales consiste en preparar una emulsión agua en aceite (W/O) mezclando rigurosamente la solución acuosa (NaOH) con la fase orgánica que contiene un surfactante hidrofóbico. El resultado de la emulsión primaria W/O, se mezcla después con la solución acuosa de fenol formándose la emulsión  $W_1/O/W_2$  tipo membrana líquida.

#### 1.1.6 Entrampamiento de microorganismos en el sistema de emulsiones múltiples.

La encapsulación de células microbianas implica el entrampamiento de microorganismos vivos dentro de una estructura semipermeable de gel polimérico. El uso de células encapsuladas para aplicaciones ambientales tiene muchas ventajas sobre formulaciones con células libres, entre las que se incluyen la protección contra estreses bióticos tales como depredación por protozoarios y bacteriófagos (Smit y col., 1996), protección contra estreses abióticos tales como efectos inhibitorios de compuestos tóxicos (Cassidy y col., 1997), realzan la supervivencia y mejoran la actividad fisiológica (Weir y col., 1995), permiten el suministro de aditivos nutricionales co-encapsulados (Trevors y col., 1993), el incremento de densidad celular (Lee y col., 1994), y el crecimiento celular preferencial en varias zonas internas aeróbicas y anaeróbicas del gel encapsulante. Además el entrampamiento puede incrementar las distancias de transporte de células degradadoras en el medio a tratar.

La aplicación de células degradadoras en acuíferos contaminados, requiere la producción de grandes escalas de acarreadores de diámetro sub-milimétrico (microcápsulas menores a 50  $\mu\text{m}$ ) para permitir la distribución hidráulica de células encapsuladas dentro de la matriz granular del acuífero. Las células encapsuladas podrían eventualmente ser inmovilizadas dentro de la zona contaminada y degradar contaminantes móviles. La matriz porosa de las microcápsulas de gel permite una adecuada difusión de los contaminantes, gases disueltos,

nutrientes, y metabolitos intermediarios, conduciendo a la descontaminación de agua subterránea.

Las técnicas de dispersión de fases, han sido descritas para la encapsulación de células dentro de micro- (0.1-1 mm) y macrocápsulas (1-3mm) de geles de polímeros naturales tales como agar (Nilsson y col., 1983), agarosa (Nilsson y col., 1983; Knaebel y col., 1996), y k-carragenina (Nilsson y col., 1983; Audet y Lacroix, 1989).

La encapsulación en geles de polímeros naturales es favorecida por la alta porosidad de geles naturales, no intoxican el medio, simplifican el proceso de encapsulación, y aumentan la viabilidad de las células encapsuladas (Cassidy y col., 1997; Kolot, 1981; Leenen y col., 1996; McLoughlin, 1994; Trevors y col., 1992).

También se ha reportado la utilización de microcápsulas con diámetros de 2 a 100  $\mu\text{m}$  suspendidas en soluciones acuosas de agentes estabilizantes ocurriendo un posterior proceso de polimerización con compuestos hidrofílicos tales como poli(metilmetakrilato) (Omi y col., 1995), poli(acrilamida-co-ácido acrílico) (Nagashima y col., 1998<sup>a</sup>; Nagashima y col., 1998<sup>b</sup>; Nagashima y col., 1999), poliestireno (Dowding y col., 2001; Hatate y col., 1995), entre otros.

## 1.2 Metil ter butil éter (MTBE).

### 1.2.1 Origen de las gasolinas oxigenadas.

La mejora de los combustibles ha sido un proceso continuo que se manifestó con la reducción drástica del uso de plomo en gasolina a principios de los años ochenta y se culminó en enero de 1998, al suprimir totalmente su uso (Garfias y Díaz, 2003). Para controlar el efecto contaminante de la gasolina, en México se encaró la disyuntiva de adoptar un cambio radical en la política energética con la norma NOM-086-ECOL (Diario Oficial de la Federación, 1994). A mediados de 1986, Petróleos Mexicanos (PEMEX), inició el uso de aditivos detergentes en gasolina, cuya primera generación mantenía libre de depósitos el sistema de alimentación de combustible; y la última generación –las dos desarrolladas por el Instituto Mexicano del Petróleo (1996)- sirve hoy en día para limpiar, además la cámara de combustión

de los motores. A finales de 1989, se inició el uso de gasolina que contiene un compuesto oxigenado.

El término oxigenado, se refiere a sustancias que contienen oxígeno; por ejemplo, un éter o un alcohol. Sin embargo, no debería nombrarse una gasolina oxigenada por el solo hecho de mezclarse con un éter o con un alcohol, ya que la gasolina no sufre ninguna transformación química y por ello estrictamente debería describirse como *gasolina que contiene sustancias oxigenadas*. A pesar de esto, la difusión del vocablo *gasolina oxigenada* ha sido muy amplia por lo que su uso se ha arraigado y se acepta para denotar la mezcla de hidrocarburos derivados del petróleo, obtenidos por destilación o por medios catalíticos o térmicos, o por una combinación de éstos, que contiene sustancias oxigenadas como éteres o alcoholes y que se usa como combustible en automotores. Al compuesto oxigenado, una vez que se agrega a la gasolina, se le denomina entonces, *oxigenante* (Mayers, 1986).

Al restringirse el uso de plomo en la formulación de gasolina, las refinerías se vieron obligadas a usar sustancias oxigenantes con el propósito de resarcir el octano perdido.

Las sustancias oxigenantes tienen la peculiaridad de presentar un elevado número de octano, por lo que constituyen una valiosa herramienta para satisfacer la creciente demanda de gasolina con mayor octano y limitar el contenido de un aromático cancerígeno, el benceno (Garfias y Díaz, 2003).

El metil ter butil éter –MTBE por sus siglas en castellano– es el compuesto oxigenante de mayor uso en los Estados Unidos (Garfias, 1993).

En el valle de México, se recurrió al uso generalizado de MTBE en el invierno de 1989, con la idea de disminuir las emisiones de monóxido de carbono e hidrocarburos y consecuentemente los niveles de ozono. Cabe destacar que el uso de 5% de MTBE en la gasolina cuyo octano inicial es de 76.35, eleva a 87, lo que facilita el trabajo de los técnicos en refinación para producir una gasolina de calidad (Garfias, 1993). Las propiedades físicas y químicas de la gasolina, están resumidas en la tabla 1.1 (Moslemy y col., 2002).

Tabla 1.1. Características de una gasolina comercial.

| Grupo hidrocarbonado  | Concentraciones representativas (% w/w) |
|---|---|
| n-Alcanos (C <sub>4</sub> a C <sub>11</sub> )                     | 10-30                                   |
| Alcanos ramificados (C <sub>4</sub> a C <sub>9</sub> )            | 18-60                                   |
| Cicloalcanos (C <sub>6</sub> a C <sub>9</sub> )                   | 3-14                                    |
| Alquenos (C <sub>4</sub> -C <sub>6</sub> )                        | 5-14                                    |
| Alquenos ramificados (C <sub>5r</sub> & C <sub>6</sub> )          | <1                                      |
| Monoaromáticos (BTEX, C <sub>3</sub> -& C <sub>4</sub> -bencenos) | 18-40                                   |
| Poliaromáticos  | <2.5                                    |
| Otros ingredientes  |   |
| Plomo (Pb) permitido  | Máx. 5 mg/L                             |
| Manganeso, Mn   | Máx. 18 mg/L                            |
| Sulfuro, S  | Máx. 0.10 % masa                        |
| Antioxidantes   | Mín 5.7 g/m <sup>3</sup>                |
| Inhibidor de Corrosión  | Mín. 6.0 g/m <sup>3</sup>               |
| MTBE  | Máx. 5% masa                            |
| Propiedades físicas y químicas                                    |   |
| Punto de ebullición   | 35-220°C                                |
| Densidad  | 0.798 g/mL a 23°C<br>0.811 g/mL a 20°C  |

### 1.2.2 Producción y uso de MTBE.

Como anteriormente se había mencionado, los oxigenantes utilizados en la gasolina pueden ser alcoholes o éteres, sin embargo, la preferencia de utilizar éteres aún con lo que se podría pensar que están en desventaja por ser menos efectivos como aportadores de oxígeno debido a su cadena hidrocarbonada más larga que los alcoholes, es debido a su poder diluyente de las sustancias tóxicas y fotorreactivas que contiene la gasolina, al requerirse aproximadamente el doble de MTBE que de etanol con la misma cantidad de oxígeno en peso (Owen y Coley, 1995).

El oxigenante que se produce principalmente en las refinerías mexicanas es el MTBE, 4400 barriles por día (BPD). El consumo mundial de MTBE en 1992 se estimó en 224 000 BPD, que se incrementó a 419 000 BPD en 1997 y alcanzó 487 000 BPD en 1998. En ese mismo año, la demanda de oxigenantes en Estados Unidos de América (EUA) para la producción de gasolinas reformuladas y oxigenadas fue de 252 000 BPD de MTBE (Tabla 1.2) (Garfias y Díaz, 2003).

Tabla 1.2. Principales países consumidores de MTBE en el mundo durante 1998.

| País      | Miles de Barriles Diarios |
|-----------|---------------------------|
| EUA       | 251.9                     |
| México    | 14.0                      |
| Italia    | 11.1                      |
| Corea     | 10.5                      |
| Taiwan    | 9.0                       |
| Alemania  | 7.6                       |
| España    | 7.5                       |
| Japón     | 6.5                       |
| Venezuela | 6.0                       |

En México, se oxigenan las gasolinas PEMEX-Magna y PEMEX-Premium, las cuales en conjunto, sumaron en 1999 un consumo en el país 513 000 BPD.

Actualmente, tan solo en el valle de México el consumo de MTBE es de aproximadamente 6000 BPD según reportes mencionados por Garfías y Díaz (2003).

### 1.2.3 Características del MTBE.

El MTBE, también conocido como 2-metoxi-2,2- metil propano, metil- 1,1-dimetil etil éter, o metil ter-butil metil éter, es un éter con fórmula estructural  $\text{CH}_3\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ . Generalmente es producido por oxidación catalítica de metanol e iso-butileno. Comercialmente el MTBE tiene de 97 a 99% de pureza y puede contener ter-butil alcohol (TBA), iso-butileno y metanol como impurezas (USEPA, 1996). Es un líquido volátil (251 mm Hg a 25°C), flamable e incoloro.

Tabla 1.3. Propiedades fisicoquímicas del MTBE.

| Propiedad                             | MTBE                             |
|---------------------------------------|----------------------------------|
| Formula molecular condensada          | C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O |
| Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> ) | 88.149                           |
| Octano                                | 110                              |
| Presión de vapor lb/plg <sup>2</sup>  | 8                                |
| Temperatura de ebullición, °C         | 55.2                             |
| Temperatura de fusión, °C             | - 109                            |
| Densidad 20°C (kg L <sup>-1</sup> )   | 0.74                             |
| Estado fisico                         | Líquido incoloro                 |
| Solubilidad, % en volumen             |                                  |
| Agua en oxigenante                    | 1.4                              |
| Oxigenante en agua                    | 4.8                              |

#### 1.2.4 Impacto del MTBE en medio ambiente y en salud.

Diversos estudios se generaron para determinar el efecto de MTBE en la salud a partir de 1992, cuando el personal de algunas estaciones de servicio y garages de Alaska, se quejaban de dolores de cabeza, mareos y náuseas. El Estado de California inició el análisis atmosférico de MTBE en 1996. Encontró que la concentración promedio de MTBE en la atmósfera del Estado era de aproximadamente 2 ppb (ppb se refiere a partes por mil millones), con las mayores concentraciones cercanas a 4 ppb en la costa sur (Garfías y Díaz, 2003).

No hay estudios sobre los efectos de exposición a largo plazo en la salud de humanos, ya que los estudios se han realizado con animales en laboratorio. Los estudios que se han efectuado han sido por inhalación de vapores, más no por la ingestión de agua contaminada. El MTBE se metaboliza rápidamente sea cual fuere la ruta de exposición. Los metabolitos son el formaldehído y el alcohol terbutílico. EPA (Environmental Protection Agency) señala que “aunque útiles para identificar riesgos potenciales, las limitaciones de los estudios no permiten estimar confiablemente el grado de riesgo que el MTBE pudiera representar a los humanos por la contaminación de bajos niveles en el agua potable” (Garfías y Díaz, 2003).

Por lo que respecta a su potencial cancerígeno, EPA concluyó en diciembre de 1997 que “los datos disponibles apuntan hacia un potencial carcinogénico del MTBE a altas dosis, sin embargo, a bajas dosis los datos no respaldan una estimación cuantitativa de riesgo”.

El Instituto de Efectos en la Salud concluyó en febrero de 1996 que son “preocupantes los efectos observados sobre el sistema motor y que a bajas exposiciones existe la posibilidad de afectar funciones complejas del sistema nervioso central”. El MTBE es clasificado como una sustancia neurotóxica (HEI, 1996).

La preocupación actual relacionada con los oxigenantes se adscribe a la contaminación de algunos acuíferos, debido principalmente a fugas de gasolina reformulada con MTBE provenientes de tanques subterráneos y de la tubería de distribución asociada (USEPA, 1993). Pudiera ser que la contaminación en aguas superficiales como lagos y presas se derive del uso de lanchas motorizadas o bien de descargas de agua que arrastran derrames superficiales de gasolina, o de la atmósfera, a causa de la lluvia (Fig. 1.7).

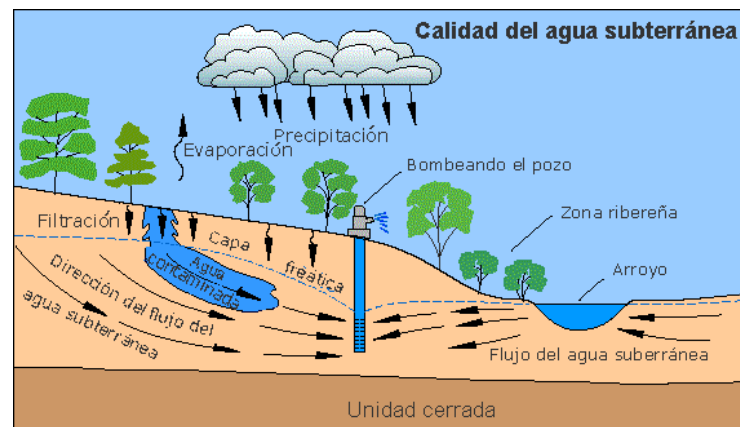


Fig.1.7. Flujo de agua hacia el subsuelo (<http://water.usgs.gov/gotita/earthgwdecline.html>).

Actualmente, según Fayolle y col. (2001), el impacto ambiental del uso masivo de MTBE no se ha estudiado suficiente, excepto su efecto en las emisiones gaseosas después de la combustión de gasolina.

El MTBE es considerado un importante contaminante de aguas subterráneas, debido a su movilidad (Garret y col., 1986; Environment Canada, 1993; Davidson y Parsons, 1996), naturaleza recalcitrante (Moller y Harbin, 1990; Yeh y Novak, 1991; Mormile y col., 1994), y su potencial toxicidad (HEI, 1996).



### 1.2.5 Contaminación de agua por MTBE.

El primer caso de contaminación de acuíferos por MTBE (concentración de MTBE arriba de 600ppb) fue reportada en 1996 en Santa Mónica, California (USEPA, 1999).

El problema de las fugas de los tanques subterráneos es añejo, ya que en una nota publicada en 1993 por Environmental Science and Technology, se informó que más de 170 000 tanques subterráneos tenían fugas en EUA, o sea, más del 37% del total evaluado. Los problemas que presenta el MTBE en las fugas se deben a que, a diferencia de otros hidrocarburos de la gasolina, posee alta solubilidad en agua (Tabla 3), es casi nula su adsorción en el suelo, tiene baja retención en materia orgánica y baja biodegradabilidad (Fayolle y col. 2001). Por lo anterior, se explica que el MTBE sea transportado por lixiviación hacia el agua subterránea.

En California existen 62 600 tanques subterráneos que almacenan petrolíferos. Se sospecha que las fugas en tanques subterráneos de gasolina sean la principal causa de la contaminación en los acuíferos con MTBE.

Las oficinas gubernamentales estadounidenses encargadas del agua están preocupadas por la contaminación con MTBE por el hecho de que es fácilmente detectable a muy bajos niveles y porque su remoción es extremadamente difícil y costosa. Sin embargo, la Agencia de Protección Ambiental de California señala que el MTBE no ha impactado suficientemente los recursos de agua potable superficiales, por encontrarse a concentraciones que son de 5 a 10 veces inferiores al límite propuesto (Garfias y Díaz, 2003).

El MTBE puede ser detectado a muy bajos niveles en el agua, por su olor o por su sabor a trementina, lo cual provoca que el agua contaminada con cantidades pequeñas de MTBE sea rechazada. Los niveles de detección olfatoria de MTBE en diferentes estudios oscilan de 15 a 95 ppb, mientras que los niveles de detección por el sabor van de 39 a 134 ppb. Las diferencias se deben a la sensibilidad de las personas, a la temperatura y al tipo de agua. Los niveles establecidos como límite de MTBE en agua se han generalizado entre 20 y 40 ppb (USEPA, 1999).

En México, en 1996, PEMEX-Refinación implantó el Programa de Modernización de Estaciones de Servicio, mediante la concesión de las Franquicias PEMEX, para que se instalen tanques de doble pared, monitores para la detección de fugas en los depósitos de combustibles,

la operación de dispensarios con sistemas de corte rápido de flujo en mangueras, además de interruptores de emergencia, entre otros.

### 1.3 Eliminación de MTBE.

#### 1.3.1 Eliminación físico química de MTBE.

Debido a las características físicas, esto es, alta solubilidad en agua y baja retención en materia orgánica, las técnicas fisicoquímicas usuales para limpiar acuíferos contaminados (inyección de aire, filtros de carbón activado, etc.) son relativamente ineficientes con respecto al MTBE. Esta es la razón por la cual el proceso de biorremediación puede ser una alternativa de solución (Fayolle y col., 2001).

Varios tratamientos han sido identificados y potencialmente aplicados para la eliminación y destrucción de MTBE. Se han sugerido alternativas para la remediación de contaminación con MTBE en agua subterránea (Davidson, 1997), estos estudios abordan concentraciones de MTBE moderadamente altas (>1000 ppb).

- Proceso de oxidación avanzada.

El proceso de oxidación avanzada (AOPs) consiste en generar un radical hidroxilo altamente reactivo (OH) de la reacción entre el agua y una o más de: ozono (O<sub>3</sub>), luz ultravioleta (UV), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), óxidos como dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>), o la combinación de estos (Dusenbury y Cannon, 1996). Los radicales hidroxilos son utilizados porque tienen el potencial de oxidar completamente compuestos orgánicos a dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Gehring y Eschweiler, 1996). En trabajos de Barreto y col. (1995) a nivel laboratorio, condujeron a determinar la efectiva degradación fotocatalítica de MTBE con TiO<sub>2</sub> como catalizador, con eficiencias de eliminación alrededor del 76%.

- Adsorción.

Varios autores han reportado que el carbón activado granular (GAC) puede ser usado para atrapar moléculas de MTBE contenido en el agua (Davidson y Parsons, 1996; Cherry, 1996; Montgomery, 1996). Este proceso puede soportar rangos menores a 1000 ppb y mayores a 100 gpm. También se han utilizado resinas poliméricas como una alternativa de medio de

adsorción y se puede variar el diámetro de poro. Pero la desventaja de esta técnica es que el MTBE es poco afín a estos soportes y el costo de la implementación de esta técnica es muy elevado.

-Proceso de separación por membrana.

Estos procesos incluyen ósmosis inversa, nanofiltración, microfiltración y ultrafiltración. Los últimos dos procesos remueven solutos de un tamaño de alrededor de 300 nm o más, o  $10^6$  daltons (Sikdar y col., 1990). No se han encontrado aún publicaciones aplicando ósmosis inversa para remover MTBE de agua. Solamente se puede considerar que este proceso es potencialmente removedor de MTBE debido a que puede remover pequeños solutos como iones de cloro y sodio.

-Inyección de aire.

Este proceso se ha probado a nivel modelo, y podría remover 99.78% de MTBE en agua (Butillo y col., 1994), se requieren de altas temperaturas ( $55^{\circ}\text{C}$ ), y de una sección empacada extremadamente alta. El resultado es un efluente de agua que presenta concentraciones reducidas del contaminante, sin embargo, la desventaja de este proceso es que por otra parte, se produce un efluente de aire contaminado. El efluente de agua contiene compuestos volátiles que pueden requerir tratamientos adicionales. Esto se refleja en costos de operación y mantenimiento.

### 1.3.2 Eliminación biológica de MTBE.

Diferentes autores recientemente han reportado la biodegradación de MTBE por microcosmos de diferentes orígenes (Bradley y col., 1999; Bradley y col., 2001; Fortin y col., 2001; Kane y col., 2001; Landmeyer y col. 2001; Park y Cowan, 1997; Salanitro y col., 1994). Además, tres cepas de bacterias fueron aisladas y fueron capaces de crecer con MTBE, dos cepas gram negativas, *Rubrivivax gelatinosus* PM1, (Hanson y col., 1999; Deeb y col., 2001) y *Hydrogenophaga flava* ENV735 (Steffan y col., 2000; Hatzinger y col., 2001), y una gram-positiva, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012 (François y col., 2002). Algunos cultivos capaces de degradar MTBE, se presentan en la tabla 1.4.

La degradación aeróbica de MTBE ha sido observada en laboratorio con consorcios microbianos (Fortin y col., 2001) y con cultivos puros (Hatzinger y col., 2001; François y col., 2002), como única fuente de carbono y energía (Salanitro y col., 1994; Mo y col., 1995; Deeb y col., 2001), o cometabólicamente (Steffan y col., 1997; Hyman y col., 1998; Liu y col., 2001).

*M. austroafricanum* IFP 2012, fue capaz de crecer en presencia de MTBE y ter-amil metil éter (TAME). En contraste, ter-butil éter (ETBE) fue degradado muy lentamente sin producción de biomasa. Durante el crecimiento con MTBE, algunos intermediarios de la vía de degradación fueron detectados, ter-butil formato (TBF), ter-butil alcohol (TBA) 2-hidroxi ácido butírico (HIBA) y acetona (Fig. 1.8). Varias actividades enzimáticas envuelven la vía de degradación del MTBE y fueron estudiadas a nivel fisiológico: una MTBE/TBA monooxigenasa (François y col., 2002), una TBF esterasa y una acetona monooxigenasa (François y col., aceptado para publicación).

El crecimiento de *M. austroafricanum* IFP 2012 con MTBE como única fuente de carbono y energía fue caracterizado por la presencia de una fase lag larga correspondiente a la conversión de MTBE a TBA sin un visible crecimiento de biomasa.

También se ha obtenido un consorcio microbiano (Fortin y col. 2001) degradador de MTBE con una velocidad específica de consumo con un rango de  $7-52 \text{ mg}_{\text{MTBE}} \text{ g}_{\text{biomasa}} \text{ h}^{-1}$ .

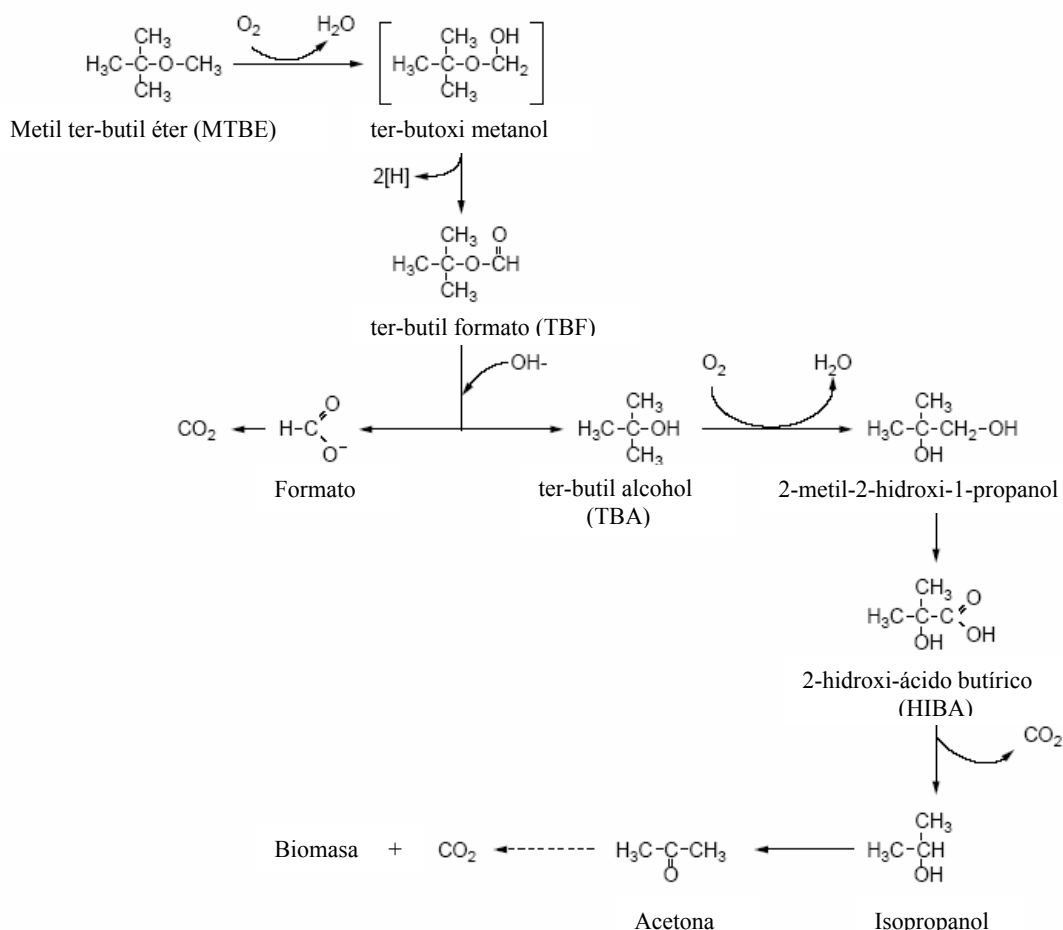


Fig. 1.8. Ruta metabólica propuesta para biodegradación aeróbica de MTBE (Fayolle y col. 2003)

### 1.3.3 Factores que afectan la biodegradación.

La biodegradación de MTBE por *M. austroafricanum* IFP 2012 y por otros microorganismos capaces de crecer con MTBE como única fuente de carbono y energía, está escasamente documentado. El estudio de estas bacterias recientemente aisladas podría llevar a la identificación de las limitaciones de la biodegradación de MTBE.

La molécula de MTBE se caracteriza por la presencia de un enlace éter y un alto impedimento estérico del carbono del grupo ter-butil enlazado al grupo metoxi. Los éteres alquílicos son moléculas estables ( $\Delta G'_0$  de la formación del enlace éter = 360 kJ/mol) (White y col., 1996). La actividad específica de la degradación de MTBE por *M. austroafricanum* IFP 2012 fue de

263  $\mu\text{mol}$  de éter  $\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}_{\text{biomasa}}$  sugiriendo que la oxidación inicial del grupo metoxi no fue responsable por la diferencia del crecimiento cinético observado con MTBE. Fortin y col. (2001) afirman que la presencia del enlace éter no parece ser la causa de la recalcitrancia de la molécula debido a que el estudio que ellos realizaron fue con un consorcio microbiano. A diferencia de Fiorenza y Rifai (2003) que mencionan que la recalcitrancia del MTBE se atribuye a su estructura química, específicamente el enlace éter y el átomo de carbono terciario son los responsables de la dificultad en la biodegradación.

De lo anterior se infiere que hay una alta demanda de energía para la degradación de MTBE que se refleja por la baja eficiencia de producción de biomasa. Fortin y col. (2001) observaron de igual manera un rendimiento bajo de biomasa de un consorcio microbiano degradador de MTBE.

Salanito (1995) sugiere que el lento crecimiento con MTBE es debido a la necesidad de regeneración de cofactores, tales como NADH, que podrían tener influencia en la velocidad de degradación de MTBE, se requieren cofactores reducidos para varios pasos de la oxidación. La presencia simultánea de MTBE y TBA durante el crecimiento con MTBE pudiera generar una competencia entre estos dos compuestos por la misma monooxigenasa. Una ineficiente asimilación de TBA podría ser la razón del bajo rendimiento de biomasa observado en algunos casos (Fayolle y col., 2001).

Tabla 1.4. Comparación de cultivos mixtos y puros capaces de biodegradar MTBE.

| Cepa            | Organismo  | Tipo de metabolismo                | Velocidad de degradación de MTBE   | Notas  | Referencia                               |
|-----------------|--|------------------------------------|--|--|--|
| MC-100, de BC-1 | Cultivo mixto  | Heterotrófico aeróbico             | 34 mg g de cel <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>   |  | Salanitro y col., 1994                   |
| Cultivo UCD     | Cultivo mixto  | Heterotrófico aeróbico             | 0.061 mg de MTBE L <sup>-1</sup> en 2 días   |  | Eweis y col., 1997<br>Eweis y col., 1998 |
| ENV421          | Similar a forma nocardio de bacteria   | Cometabolismo con propano          | 9.2 nmol min <sup>-1</sup> mg proteína <sup>-1</sup>   | Después crece en propano   | Steffan y col., 1997                     |
| JOB5            | <i>Mycobacterium vaccae</i>  | Cometabolismo con propano          | No reportado   |  | Steffan y col., 1997                     |
| ENV425          | Muy relacionado a <i>Nocardia</i> sp.  | Cometabolismo con propano          | 4.6 nmol min <sup>-1</sup> mg proteína celular <sup>-1</sup>   | Después crece en propano   | Steffan y col., 1997                     |
| Aislado 24      | <i>Methylobacterium mesophilicum</i>   | Heterotrófico aeróbico             | 29% de 200 mg mL <sup>-1</sup> en 2 semanas  | Incompleta biodegradación de MTBE                                    | Mo y col., 1997                          |
| Aislado 33      | <i>Rhodococcus</i> sp.   | Heterotrófico aeróbico             | 28% de 200 mg mL <sup>-1</sup> en 2 semanas  | Incompleta biodegradación de MTBE                                    | Mo y col., 1997                          |
| Aislado 41      | <i>Arthrobacter ilicis</i>   | Heterotrófico aeróbico             | 28% de 200 mg mL <sup>-1</sup> en 2 semanas  | Incompleta biodegradación de MTBE                                    | Mo y col., 1997                          |
| ATCC 58400      | <i>Graphium</i> sp. (fungus)   | Cometabolismo con <i>n</i> -butano | 0.6 nmol h <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> en presencia de <i>n</i> -butano y 1.9 nmol h <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> en ausencia de <i>n</i> -butano | Inducción por <i>n</i> -butano requerida para biodegradación de MTBE | Hardison y col., 1997                    |
| PM1             | <i>Rubrivivax gelatinosus</i><br>Miembro de β1 subgrupo de <i>Proteobacteria</i> | Heterotrófico aeróbico             | 0.07, 1.17, y 3.56 g mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> para concentraciones de MTBE de 5, 50, y 500 g mL <sup>-1</sup>                                  | Inoculación densidad de 2 x 10 <sup>6</sup> células mL <sup>-1</sup> | Hanson y col., 1999                      |
|                 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | Cometabolismo con pentano          | 3.9 nmol min <sup>-1</sup> mg proteína <sup>-1</sup>   |  | Garnier y col., 1999                     |
|                 | Cultivo mixto  | Heterotrófico aeróbico             | 5-10 mg MTBE g peso seco <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>   | Aumento celular: 0.1 g peso seco g MTBE <sup>-1</sup>                | Fortin y Deshusses, 1999.                |
|                 | <i>Hydrogenophaga flava</i> F55  | Heterotrófico aeróbico             | 86 nmol min <sup>-1</sup> mg proteína <sup>-1</sup> , 30°C   | Aumento celular: 0.4mg mg MTBE <sup>-1</sup>                         | Hatzinger y col., 2001                   |
|                 | <i>Mycobacterium austroafricanum</i>   | Heterotrófico aeróbico             | 0.6 nmol h <sup>-1</sup> g peso seco <sup>-1</sup> ; 20 nmol min <sup>-1</sup> mg proteína <sup>-1</sup>   | Aumento celular: 0.44 g . g MTBE <sup>-1</sup>                       | François y col., 2002                    |

## Capítulo 2

### OBJETIVOS



## 2.1 Objetivo general

Obtener una emulsión múltiple  $W_1/O/W_2$  estabilizada con polímeros, que en la fase acuosa interna contenga atrapado un consorcio microbiano capaz de degradar metil ter butil éter.

## 2.2 Objetivos particulares

- ◆ Establecer la formulación de la emulsión primaria ( $W_1/O$ ) seleccionando tipo, concentración de emulsificante lipofílico y fracción de fase dispersa adecuados para el sistema cinéticamente estable.
- ◆ Determinar el efecto de la incorporación del consorcio microbiano sobre la estabilidad de la emulsión primaria ( $W_1/O$ ).
- ◆ Verificar el atrapamiento del consorcio microbiano en la emulsión primaria ( $W_1/O$ ).
- ◆ Seleccionar el polímero o la combinación de polímeros, y la concentración que permita la obtención de la emulsión múltiple ( $W_1/O/W_2$ ) cinéticamente estable.
- ◆ Observar el efecto del MTBE sobre la estabilidad de la emulsión múltiple ( $W_1/O/W_2$ ).
- ◆ Determinar el efecto de la incorporación del consorcio microbiano en la estabilidad de la emulsión múltiple ( $W_1/O/W_2$ ).
- ◆ Comprobar la actividad de degradación de MTBE por el consorcio microbiano atrapado en la emulsión múltiple ( $W_1/O/W_2$ ).

Capítulo 3

**HIPÓTESIS**

La formulación adecuada de una emulsión múltiple  $W_1/O/W_2$  utilizando biopolímeros como agentes estabilizantes de la fase acuosa externa y emulsificantes de bajo peso molecular en la fase acuosa interna permitirá:

- a) el entrapamiento de un consorcio microbiano en la fase acuosa interna,
- b) la obtención de una emulsión  $W_1/O/W_2$  estable,
- c) la degradación de MTBE por el consorcio microbiano entrapado en la emulsión.

## Capítulo 4

# JUSTIFICACIÓN

#### 4. Justificación

La gran mayoría del agua potable en el país proviene de reservas de agua subterránea. Debido a esto, es importante mantener dichas reservas libres de agentes contaminantes para garantizar su disponibilidad. La Legislación Mexicana no regula la presencia del MTBE en agua potable, por lo que se consideran los límites establecidos por la EPA (1997) de 20 a 40  $\mu\text{g/L}$ . El MTBE puede ingresar al ambiente por medio de fugas o derrames de gasolina al subsuelo provenientes de tanques de almacenamiento subterráneo en gasolineras y de la tubería de distribución asociada (USEPA, 1993). El MTBE tiene alta solubilidad en agua y debido a esta propiedad, posee una alta afinidad a distribuirse en los mantos acuíferos en vez de retenerse en el contenido orgánico del suelo, lo que en caso de existir fugas, los acuíferos serían impactados directamente. El primer caso de contaminación de acuíferos por MTBE (600  $\mu\text{g/L}$ ) fue reportada en 1996 en Santa Mónica, California (USEPA, 1999). El problema de fugas de tanques subterráneos es añejo, ya que en una nota publicada en 1993 por Environmental Science and Technology, se informó que más de 170 000 tanques subterráneos tenían fugas en EUA, o sea, más del 37% del total evaluado. En México, el MTBE en la gasolina está presente desde 1989, y aún cuando se sabe que es un contaminante potencial, se le ha dado muy poca importancia para investigar el impacto ocasionado en los acuíferos.

El MTBE es considerado un importante contaminante debido a su toxicidad y a que es clasificado como una sustancia neurotóxica (HEI, 1996).

Las oficinas gubernamentales estadounidenses encargadas del agua afirman que el MTBE es fácilmente detectable a muy bajos niveles y su remoción es extremadamente difícil y costosa.

Se han sugerido alternativas para la remediación de contaminación con MTBE en agua subterránea (Davidson, 1997), pero estos estudios abordan concentraciones de MTBE moderadamente altas ( $>1000 \mu\text{g/L}$ ). Las técnicas fisicoquímicas usuales para limpiar acuíferos contaminados (inyección de aire, filtros de carbón activado, etc.) son costosas y relativamente ineficientes para eliminar el MTBE. Esta es la razón por la cual el proceso de biorremediación podría ser particularmente interesante (Fayolle y col., 2001), aunque también presenta algunas desventajas en la práctica, ya que existe una alta demanda de energía para la

degradación de MTBE que se refleja por la baja eficiencia de producción de biomasa (Fortin y col., 2001).

Por todo lo anterior, en el presente trabajo, se pretende contribuir a este problema ecológico por medio de la aplicación del atrapamiento de un consorcio microbiano degradador de MTBE en un sistema de emulsiones múltiples  $W_1/O/W_2$  cinéticamente estables donde se realice un proceso de transporte del contaminante hacia la fase acuosa interna (Fig. 4.1).

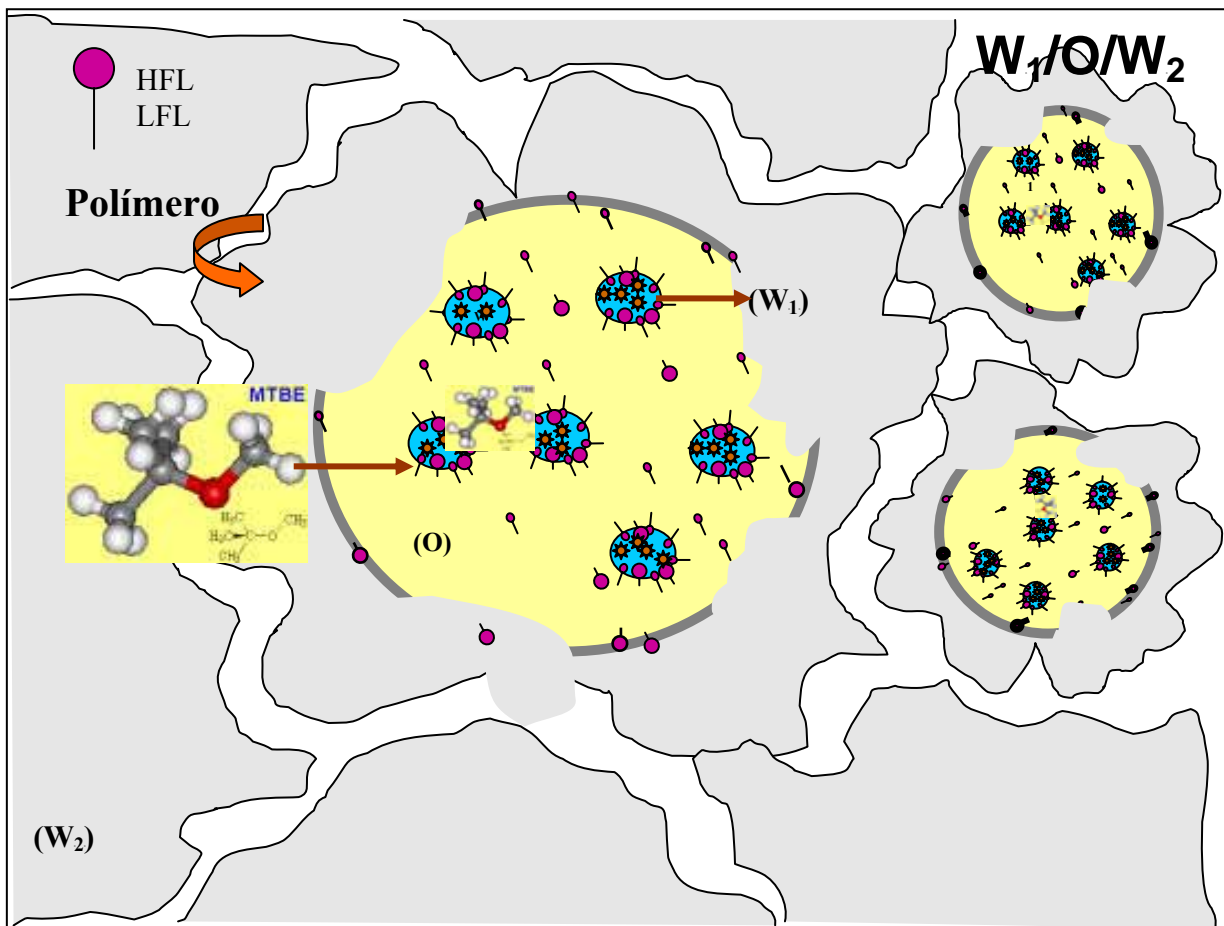


Fig. 4.1. Esquema propuesto para la biodegradación de MTBE por un consorcio microbiano atrapado en una emulsión múltiple  $W_1/O/W_2$  estable. Se indica con  $(W_1)$  a la fase acuosa interna con los microorganismos atrapados;  $(O)$  a la fase oleosa y  $(W_2)$  a la fase acuosa externa con polímero.



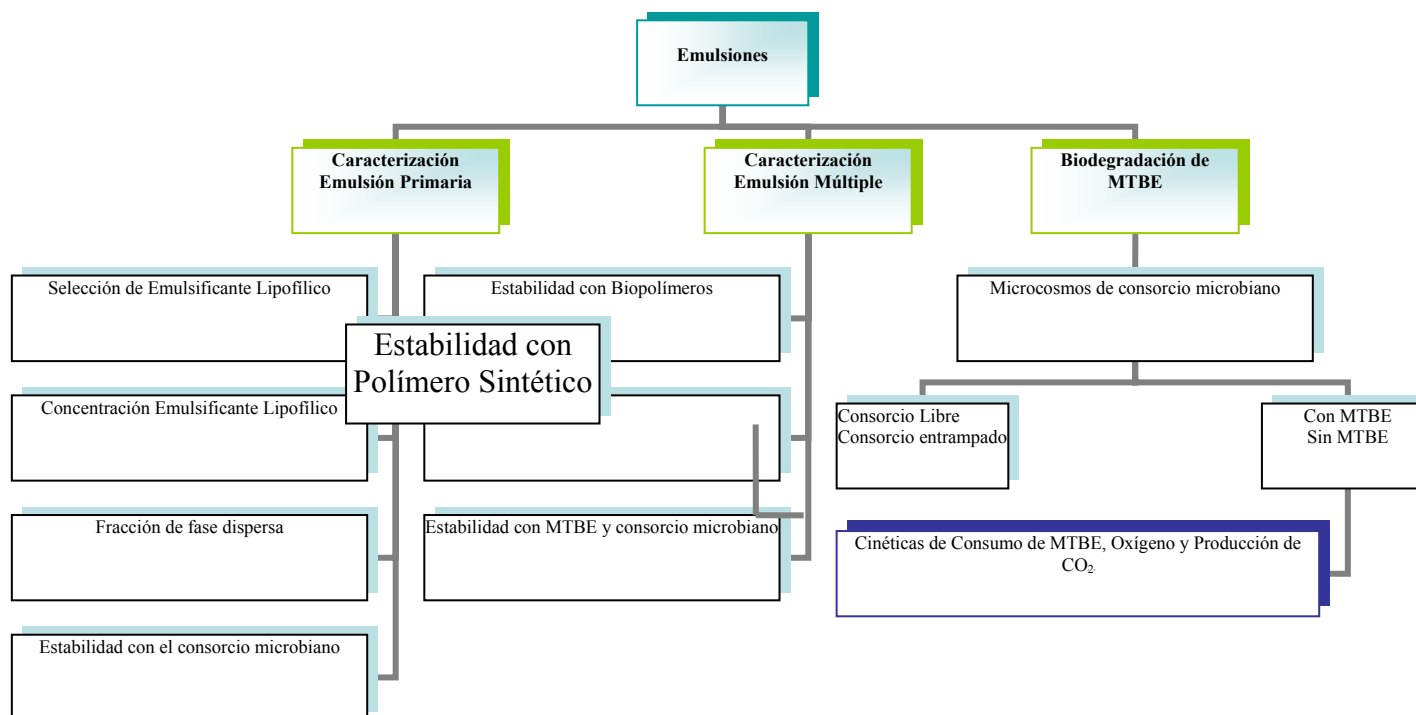
## Capítulo 5

# MATERIALES Y MÉTODOS



## 5.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Los experimentos realizados en el presente trabajo, se ordenaron en tres etapas. Se comenzó con la caracterización de la emulsión primaria (EP) variando el material a utilizar, la concentración y la fracción de la fase dispersa; de esta manera se eligió la formulación que produjo la emulsión más estable a través del tiempo. Caracterizada la emulsión primaria, se procedió a caracterizar la emulsión múltiple (EM), probando su estabilidad con biopolímeros y un polímero sintético; con la formulación más estable, se observó el efecto de la adición de MTBE y el consorcio microbiano, sobre la estabilidad de la emulsión múltiple. Finalmente, se realizaron experimentos en microcosmos para comprobar la biodegradación por parte del consorcio microbiano entrampado en la emulsión múltiple. Estos últimos experimentos se comparados con diferentes testigos para evaluar el comportamiento del consorcio microbiano. Lo antes descrito se resume en el diagrama que se presenta a continuación.



## 5.2 EMULSIONES

### 5.2.1 Materiales

La fase acuosa de la emulsión primaria ( $W_1$ ) estuvo compuesta de medio mineral (MM) (tabla 5.7) para consorcio microbiano degradador de MTBE.

La fase oleosa (O) de las emulsiones fue aceite mineral ligero (Marcol GX, México); este aceite consiste de una mezcla de hidrocarburos de fórmula condensada  $C_2H_6$  y mayores, o hidrocarburos aromáticos cíclicos, con pequeñas concentraciones de benceno, sulfuros y compuestos oxigenados (Budavari y col., 1989).

En la fase oleosa, se probaron dos emulsificantes lipofílicos con base química de monoéster de sorbitán (anexo 4), Span 80 con un HLB de 4.6 y Span 20 con un HLB de 8.1 (Canamex Químicos, México). Ambos son emulsificantes no iónicos y su estructura consta de una larga cadena carbonada.

Se probaron diferentes materiales para la fase acuosa externa de la emulsión múltiple haciendo soluciones con los siguientes polímeros: goma de mezquite (*Prosopis laevigata*) recolectada manualmente en forma de lágrimas, en el Estado de San Luis Potosí, y purificada según Vernon-Carter y Sherman (1981); goma arábiga (*Acacia senegal*) de Sigma-Aldrich, E.U.A. (anexo 4); quitosano (Aldrich Chemicals, E.U.A.) y ácido poliacrílico –polímero sintético– (Pemulen TR-1 de Noveon Inc., Ohio, E.U.A.). El ácido poliacrílico o ácido 2- propenoico tiene una fórmula base de  $C_3H_4O_2$  (Budavari y col., 1989).

Se utilizó metil ter-butyl éter (98%,  $\rho=0.740$  g/mL) de Aldrich Chemicals, E.U.A.; y albúmina sérica bovina (96%) de Sigma (E.U.A.), para la curva patrón de proteína.

### 5.2.2 Medición de índice de refracción.

Este experimento se utilizó para comprobar la solubilidad del contaminante (MTBE) en las diferentes fases que componen la emulsión (agua, aceite y emulsificante lipofílico). Se realizó una curva con diferentes concentraciones de MTBE (0, 65, 195, 585, 670 ppm) y se leyó en el refractómetro de Abbe (Baush & Lomb, E.U.A.) (anexo 1).

### 5.2.3 Formación de emulsiones

Las emulsiones primarias  $W_1/O$ , se homogeneizaron a 8000 rpm durante 10 minutos en un homogenizador Silverson L4R (Silverson Machines, Ltd., Waterside, Chesham. Bucks., Inglaterra), adicionando la fase acuosa muy lentamente a la fase oleosa con emulsificante (Sherman, 1968), el proceso de agitación se mantuvo a una temperatura de 35°C aproximadamente en baño de hielo.

Una vez formada la emulsión, se tomó 1 mL y se diluyó en 9 mL de aceite mineral, para verificar que la emulsión fuera del tipo agua en aceite (W/O). Paralelamente, se tomaron muestras para determinar el diámetro de los glóbulos en un Sistema Analizador de Imágenes (Microscopio óptico Olympus BX 45 y Cámara Digital Olympus C-3030 Olympus optical CO Ltd, Japón; y Software Image-Pro Plus versión 4.5, Media Cybernetics, Inc.), seleccionando al azar un número determinado de glóbulos (Sherman, 1968). Las muestras se observaron con el objetivo de 100x y se tomaron fotografías al momento de preparación de las emulsiones, a las 24 horas y posteriormente cada tercer día durante el periodo en que se mantuvo la emulsión estable. Las unidades experimentales se realizaron por duplicado y con dos repeticiones por unidad experimental.

Para formar las emulsiones múltiples  $W_1/O/W_2$ , se utilizó el método de las dos etapas (Sosa-Fragoso, 2004; Rodríguez-Huezo y col., 2004), que consistió en reemulsificar a la emulsión primaria  $W_1/O$  en la fase acuosa externa conteniendo el polímero a probar, y se homogeneizó por 10 min. Una vez formada la emulsión múltiple, se realizó un análisis morfológico calculando el diámetro de los glóbulos internos y externos a través del tiempo con las ecuaciones 5.1 y 5.2 respectivamente por medio del sistema analizador de imágenes arriba descrito (Sherman, 1968).

$$D_{3,2} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad \text{Diámetro volumétrico superficial medio} \quad (\text{Ecuación 5.1})$$

$$D_{4,3} = \sqrt[3]{\frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i}} \quad \text{Diámetro volumétrico medio} \quad (\text{Ecuación 5.2})$$

Donde  $n_i$  es la gota  $i$ , y  $d_i$  es el diámetro de la gota  $i$ .

Los diámetros de los glóbulos de la emulsión primaria o de los glóbulos internos de la emulsión múltiple se calcularon con el diámetro volumétrico superficial medio ( $D_{3,2}$ ) debido a que está relacionado con el área superficial de los glóbulos expuestos a la fase continua por unidad de volumen de la emulsión (ecuación 1); y los glóbulos externos de la emulsión múltiple se calcularon con el diámetro volumétrico medio ( $D_{4,3}$ ) que indica el número de glóbulos por unidad de volumen de la emulsión (ecuación 5.2). Estos dos parámetros se utilizaron debido a que las emulsiones obtenidas son polidispersas, esto es, que presentaron glóbulos de tamaño variado y por lo tanto, los resultados se deben expresar en términos de diámetro medio volumétrico superficial ( $D_{3,2}$ ) y volumétrico ( $D_{4,3}$ ) de los glóbulos (McClements, 1999), los cuales fueron utilizados como variables de respuesta en los experimentos.

Con estos cálculos, se determinaron las cinéticas de coalescencia de los glóbulos de las emulsiones primarias y múltiples (ecuación 5.3) como parámetro para evaluar su estabilidad en el tiempo (v. gr.  $1 \times 10^{-3}$  inestable,  $1 \times 10^{-7}$  estable,  $1 \times 10^{-12}$  súper estable) (Sherman, 1968).

$$N_t = \frac{6 \phi * 10^{12}}{\pi (D_m)^3} \quad (\text{Ecuación 5.3})$$

$$N_t = N_o \exp^{(-Ct)} \quad (\text{Ecuación 5.4})$$

$$\ln N_t = \ln N_o - Ct \quad (\text{Ecuación 5.5})$$

Donde  $\phi$  es la fracción de la fase dispersa volumétrica;  $N_t$ , es el número de glóbulos/cm<sup>3</sup> después del tiempo  $t$ ;  $10^{12}$  es un factor de conversión de cm<sup>3</sup> a  $\mu\text{m}^3$ ;  $D_m$  es el diámetro medio del glóbulo ya sea  $D_{3,2}$  o  $D_{4,3}$ ;  $N_o$ , es el número original de glóbulos por unidad de volumen; y  $Ct$  la velocidad de coalescencia de los glóbulos de la emulsión. Con las ecuaciones 5.4 y 5.5, se obtuvo el valor de  $Ct$  ( $\text{s}^{-1}$ ) graficando  $\ln N_t$  contra  $t$ .

Con los diámetros calculados de los glóbulos internos y externos de las emulsiones múltiples, se determinó como otro parámetro de estabilidad de la emulsión múltiple en el tiempo, la relación  $D_{3,2}/D_{4,3}$  obteniendo diversos valores ubicándolos dentro de los rangos mostrados en

la tabla 5.1, y este parámetro indicó el tipo de estabilidad correspondiente a la emulsión formulada, si la relación tiende a cero y se mantiene constante en el tiempo, la emulsión es altamente estable, ya que indica que el área superficial de las gotas internas en relación al tamaño volumétrico de las gotas externas se mantiene constante a través del tiempo (Sosa-Fragoso, 2004).

*Tabla 5.1. Valores de los rangos de la Relación  $D_{3,2}/D_{4,3}$  que indican el tipo de estabilidad en una emulsión.*

| Estabilidad | Relación $D_{3,2}/D_{4,3}$ |
|-------------|----------------------------|
| Baja        | 1-0.5                      |
| Intermedia  | 0.49-0.35                  |
| Alta        | 0.34-0                     |

(Sosa-Fragoso, 2004)

### 5.3 CARACTERIZACIÓN DE LA EMULSIÓN PRIMARIA $W_1/O$

#### 5.3.1 Selección del tipo de emulsificante lipofílico en la emulsión primaria $W_1/O$

Se formularon emulsiones  $W_1/O$  y se probaron dos emulsificantes lipofílicos Span 20 y Span 80, disueltos en la fase oleosa en una concentración de 10% (p/p) en base al peso total de la emulsión (200g), con una  $\phi$  de 0.3 (tabla 5.2), se homogeneizó la emulsión en un homogenizador Silverson L4R a 8000 rpm durante 10 minutos manteniéndose la temperatura a 30°C. Las emulsiones se observaron al microscopio en un periodo de tiempo de 21 días; por medio del sistema analizador de imágenes se determinó el diámetro volumétrico superficial medio  $D_{3,2}$  de los glóbulos de la emulsión que se tomó como criterio para evaluar el tipo de emulsificante que formara una emulsión con un tamaño de glóbulo lo más pequeño posible (Garti, 1997). Por medio de análisis estadístico se eligió el emulsificante lipofílico que proporcionó el menor tamaño de glóbulo y por lo tanto, la mayor estabilidad en la emulsión  $W_1/O$ .

Tabla 5.2. Formulación de emulsiones  $W_1/O$  con diferente tipo de emulsificante lipofílico

| Tipo emulsificante lipofílico | Fase Dispersa      | Fase Continua                        |
|-------------------------------|--------------------|--------------------------------------|
| Span 20                       | Medio mineral 60 g | Aceite mineral 120 g<br>Span 20 20 g |
| Span 80                       | Medio mineral 60 g | Aceite mineral 120 g<br>Span 80 20 g |

### 5.3.2 Concentración de emulsificante lipofílico en la emulsión primaria $W_1/O$

Garti y Aserín (1996), afirman que la concentración del emulsificante es un factor importante en la formación y estabilidad de una emulsión, además, mencionan que debe ser agregado en exceso. Debido a esto, se formularon emulsiones primarias  $W_1/O$  con diferentes concentraciones del emulsificante lipofílico seleccionado en el experimento anterior (0.5, 1, 2, 4, 8, 10, 16 y 30%) en base al peso total de la emulsión (200g), con una  $\phi$  de 0.2 (tabla 5.3), se homogeneizó la emulsión en un homogenizador Silverson L4R a 8000 rpm durante 10 minutos manteniéndose la temperatura a 30°C. Las emulsiones se observaron al microscopio en un periodo de tiempo de 14 días y por medio del sistema analizador de imágenes se determinó el diámetro volumétrico superficial medio  $D_{3,2}$  de los glóbulos de la emulsión como variable de respuesta. Los datos se analizaron estadísticamente y se eligió la concentración de emulsificante lipofílico que proporcionó el menor tamaño de glóbulo.

Tabla 5.3. Formulación de emulsiones  $W_1/O$  con diferentes concentraciones de emulsificante lipofílico.

| Componentes (g)          | Concentración de emulsificante lipofílico (%) |     |     |     |     |     |     |     |
|--------------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                          | 0.5   | 1   | 2   | 4   | 8   | 10  | 16  | 30  |
| Aceite mineral           | 159   | 158 | 156 | 152 | 144 | 140 | 128 | 100 |
| Emulsificante lipofílico | 1   | 2   | 4   | 8   | 16  | 20  | 32  | 60  |
| Medio mineral            | 40  | 40  | 40  | 40  | 40  | 40  | 40  | 40  |

### 5.3.3 Fracción de la fase dispersa en la emulsión primaria W<sub>1</sub>/O

La concentración de los glóbulos en una emulsión es usualmente descrita en términos de fracción de la fase dispersa en volumen –  $\phi$  – que es igual a la relación del volumen de los glóbulos de la emulsión y el volumen total de la emulsión. La estabilidad en la emulsión también fue evaluada variando la  $\phi$  (0.1, 0.2, 0.3 y 0.4) (Dickinson y McClements, 1996 y McClements, 1999). Se formularon emulsiones W<sub>1</sub>/O y se probaron diferentes  $\phi$ , se homogeneizó la emulsión en un homogenizador Silverson L4R a 8000 rpm durante 10 minutos manteniéndose la temperatura a 30°C. Las emulsiones se observaron al microscopio en un periodo de tiempo de 14 días; con el sistema analizador de imágenes se determinó el diámetro volumétrico superficial medio D<sub>3,2</sub> de los glóbulos de la emulsión para seleccionar la  $\phi$  que brindara la cinética de coalescencia más lenta en los glóbulos de la emulsión por medio de análisis estadístico.

### 5.3.4 Emulsión primaria W<sub>1</sub>/O con el consorcio microbiano degradador de MTBE

Los experimentos anteriores permitieron obtener una emulsión primaria estable en ausencia de microorganismos y se utilizó como testigo o prueba abiótica. Con la misma formulación que se utilizó para el testigo (tabla 5.4), se agregó el consorcio microbiano para evaluar su efecto en la estabilidad de la emulsión a través del tiempo (14 días). Para poder llegar a la concentración deseada de microorganismos (50 mg<sub>proteína</sub>/L, cuantificada por el método de Lowry, 1951 -anexo 2-), se tomaron 80 mL de medio mineral con el consorcio microbiano de los matraces de procultivo (descritos más adelante), se centrifugó a 9000 rpm a 20°C por 20 minutos. El consorcio microbiano fue resuspendido en 60 mL de medio mineral fresco y fue utilizado como fase acuosa ( $\phi$  de 0.3) y se dispersó en la fase oleosa que contenía 8% de Span 80 en un homogenizador Silverson L4R a 8000 rpm durante 10 minutos manteniéndose la temperatura a 30°C, para formar 200 g de emulsión. Las emulsiones se observaron al microscopio en un periodo de tiempo de 14 días; con el sistema analizador de imágenes se determinó el diámetro volumétrico superficial medio D<sub>3,2</sub> de los glóbulos de la emulsión para observar el efecto de la presencia del consorcio microbiano sobre la estabilidad de la emulsión

en el tiempo a través del cálculo de la cinética de coalescencia de la emulsión. Los resultados se analizaron estadísticamente. La emulsión se tiñó por el método de Gram (Madigan y col. 1999) para situar al consorcio microbiano y observar si la tinción se realizaba en el interior de los glóbulos (anexo 7) y confirmar el entrapamiento.

#### 5.4 CARACTERIZACIÓN DE LA EMULSIÓN MÚLTIPLE $W_1/O/W_2$

##### 5.4.1 Estabilización de la emulsión múltiple con biopolímeros y combinación de biopolímeros.

Se formularon emulsiones múltiples múltiples  $W_1/O/W_2$  (200g) con diferentes biopolímeros. Se probaron los biopolímeros goma arábica (GA) y goma de mezquite (GM) en una concentración de 10% en peso basados en el peso de la fase acuosa (Sosa-Fragoso, 2004). También se realizaron combinaciones de cada una de las gomas con quitosano en una concentración de este último de 0.4% (Q), disolviendo completamente el quitosano previamente en una solución acidificada de ácido acético (1%), posteriormente se incorporó la goma correspondiente manteniendo la mezcla en agitación continua hasta obtener una solución homogénea (Ruíz-Ramos, 2004). Las emulsiones múltiples se realizaron redispersando la emulsión primaria ( $W_1/O$ ) obtenida en la primera etapa de la experimentación (tabla 5.4) con fase dispersa de 0.3, incorporándola lentamente a la solución acuosa con biopolímeros (fase continua) a una velocidad de agitación de 5000 rpm en homogeneizador Silverson LR 4 por 10 min (tabla 5.5). Una vez formada la emulsión múltiple, se realizó un análisis morfológico en el sistema analizador de imágenes, calculando el diámetro de los glóbulos internos ( $D_{3,2}$ ) y externos ( $D_{4,3}$ ) a través del tiempo (28 días). Los datos se analizaron estadísticamente y se eligió el biopolímero o combinación de biopolímeros que proporcionó el menor tamaño de glóbulo en la emulsión a través del tiempo.

Tabla 5.4. Formulación de emulsión primaria  $W_1/O$  para formar emulsión múltiple  $W_1/O/W_2$ .

| Fase Dispersa      | Fase Continua                        |
|--------------------|--------------------------------------|
| Medio mineral 60 g | Aceite mineral 124 g<br>Span 80 16 g |



Tabla 5.5. Formulación de emulsiones múltiples con diferentes tipos de biopolímeros y mezclas de biopolímeros.

| Componentes (g)                        | Biopolímeros |      |        |        |
|--|--------------|------|--------|--------|
|  | (GA)         | (GM) | (GA-Q) | (GM-Q) |
| <i>Fase dispersa (W<sub>1</sub>/O)</i> | 60           | 60   | 60     | 60     |
| <i>Fase continua</i>                   |              |      |        |        |
| Agua                                   | 126          | 126  | 124.04 | 124.04 |
| Goma Mezquite                          | --           | 14   | --     | 14     |
| Goma Arabiga                           | 14           | --   | 14     | --     |
| Quitosano                              | --           | --   | 0.56   | 0.56   |
| Ac. Acético                            | --           | --   | 1.4    | 1.4    |

#### 5.4.2 Caracterización de emulsiones múltiples con polímero sintético

Se experimentó con un polímero sintético –PS– (ácido poliacrílico) con distintos porcentajes (0.025, 0.05, 0.1, 0.2 y 0.4%) en base al peso total de la emulsión (200g) (Noveon Inc., 2001). Se prepararon soluciones acuosas con las distintas concentraciones de PS hasta su total disolución para formar las emulsiones múltiples, manteniendo la mezcla en agitación continua para incorporar lentamente la emulsión primaria (W<sub>1</sub>/O) seleccionada en la primera parte de la experimentación (tabla 5.4), se determinó el pH de la emulsión y se utilizó NaOH (18%) para ajustar el pH a 7 (tabla 5.6). Posteriormente, se agitó a 1000 rpm por 10 min en un agitador Caframo.

Las emulsiones se observaron al microscopio en un periodo de tiempo de 42 días; con el sistema analizador de imágenes se calculó el diámetro de los glóbulos internos (D<sub>3,2</sub>) y externos (D<sub>4,3</sub>) de la emulsión múltiple. Se calculó la cinética de coalescencia de los glóbulos de la emulsión y la relación D<sub>3,2</sub>/D<sub>4,3</sub>, como parámetros de estabilidad.

Los datos se analizaron estadísticamente y se eligió la concentración del polímero sintético que proporcionó el menor cambio en el diámetro de los glóbulos en la emulsión a través del tiempo.

Tabla 5.6. Formulación de emulsiones múltiples con diferentes concentraciones de PS.

| Componentes (g)                        | Concentración PS (%) |       |       |       |       |
|--|----------------------|-------|-------|-------|-------|
|  | 0.025                | 0.05  | 0.1   | 0.2   | 0.4   |
| <i>Fase dispersa (W<sub>1</sub>/O)</i> | 60                   | 60    | 60    | 60    | 60    |
| <i>Fase continua</i>                   |                      |       |       |       |       |
| Agua                                   | 139.95               | 139.9 | 139.8 | 139.6 | 139.2 |
| Polímero sintético                     | 0.05                 | 0.1   | 0.2   | 0.4   | 0.8   |

#### 5.4.3 Efecto de la adición de MTBE en la estabilidad de la emulsión múltiple formada con biopolímero y polímero sintético

Se colocó un volumen de 10 mL de las emulsiones múltiples estabilizadas con GM (tabla 5.5) y con el polímero sintético en botellas serológicas de 125 mL con válvulas mininert, se les adicionó 2  $\mu$ L de MTBE y se observó físicamente el cambio en la apariencia de la emulsión así como el cambio morfológico en los glóbulos de la emulsión múltiple por medio del sistema analizador de imágenes.

#### 5.4.4 Efecto de la incorporación del consorcio microbiano en la estabilidad de la emulsión múltiple.

Se preparó una emulsión primaria (W<sub>1</sub>/O) según el apartado 5.3.4 con el consorcio entrampado, y se dispersó en una fase acuosa con el polímero y concentración seleccionado según los experimentos descritos en el apartado 5.4.2, para formar una emulsión múltiple, se adicionó MTBE, y se observó el efecto del consorcio microbiano sobre la estabilidad de la emulsión múltiple a través del tiempo (14 días). Se utilizó un testigo sin microorganismos como prueba abiótica.

Las emulsiones se observaron al microscopio, con el sistema analizador de imágenes se determinó el diámetro D<sub>3,2</sub> y D<sub>4,3</sub> de los glóbulos de la emulsión para observar el efecto de la presencia del consorcio microbiano sobre la estabilidad de la emulsión múltiple en el tiempo a través del cálculo de la cinética de coalescencia de la emulsión. Los resultados se analizaron estadísticamente.

## 5.5 BIODEGRADACIÓN DE MTBE

### 5.5.1 Consorcio microbiano

El consorcio microbiano fue obtenido de sitios contaminados con gasolina, este consorcio fue propagado en la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa (UAM-I) en el laboratorio de emisiones gaseosas en un reactor agitado (fig. 5.1) con un volumen de operación de 1.5 L (López y col., 2004). El reactor se encuentra a temperatura ambiente y se mantiene con agitación de 130 rpm. El consorcio microbiano fue capaz de consumir MTBE como única fuente de carbono, en una concentración de 140 mg/L.



*Fig. 5.1. Reactor agitado que contiene al consorcio microbiano degradador de MTBE.*

### 5.5.2 Medio de cultivo para el consorcio microbiano

El consorcio microbiano que se utilizó para el presente trabajo (López y col., 2004), se encontraba suspendido en medio mineral estéril (tabla 5.7) para proporcionar una fuente de nutrientes necesarios para llevar a cabo la biodegradación de MTBE. La composición del medio mineral incluyó compuestos importantes que contienen Azufre, Nitrógeno, Fósforo, Magnesio, Potasio y elementos traza. El pH del medio mineral se ajustó a 7. El medio fue cambiado cada 20 días para el mantenimiento del consorcio microbiano.

Tabla 5.7. Composición de medio mineral utilizado por el consorcio microbiano para la degradación de MTBE

| <b>Compuesto</b>                    | <b>Concentración<br/>g/L<sub>(agua)</sub></b> | <b>Elementos Traza</b>                              |   |
|-------------------------------------|---|---|---|
|                                     |   | <b>Compuesto</b>                                    | <b>Concentración<br/>g/L<sub>(agua)</sub></b> |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>     | 2   | FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O                | 0.2   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>     | 1   | ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 1.44  |
| MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O | 0.5   | MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O                 | 0.8411  |
| CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O | 0.1   | CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                | 0.2621  |
| YNB*                                | 0.1   | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 0.0620  |
| Trazas                              | 5 (mL/L <sub>(agua)</sub> )                   | NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                | 0.09  |
| KNO <sub>3</sub>                    | 2.3   | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0.49  |
| Ajustar a pH 7 con perlas de NaOH   |   |   |   |

\*YNB (Siglas en inglés de Yeast Nitrogen Base)

### 5.5.3 Preinóculo

Antes de realizar la inoculación del consorcio microbiano al sistema experimental (microcosmos) y llevar a cabo las cinéticas de consumo de MTBE, se efectuó la propagación de biomasa en un matraz de procultivo de capacidad de 1 L en condiciones estériles (Fig. 5.2). En dicho matraz se colocaron 400 mL de medio mineral y se inoculó el consorcio microbiano proveniente del reactor (aprox. 2g.), se agregaron 150 µL de MTBE al matraz y se aireó y alimentó con MTBE dos veces por semana. Se mantuvo en agitación de 130 rpm a temperatura constante de 30°C. El cambio de medio mineral se realizó cada 20 días, centrifugando cada vez 100 mL de medio con biomasa a 9000 rpm durante 30 min a una temperatura de 25°C. Posteriormente la biomasa fue resuspendida en 400 mL de medio mineral fresco en el matraz de procultivo.



Fig. 5.2. Propagación de biomasa en un matraz de procultivo de 1 L.

#### 5.5.4 Microcosmos

Para determinar la actividad del consorcio microbiano en las condiciones experimentales a probar se emplearon microcosmos. Los microcosmos consistieron en frascos serológicos de 125 mL sellados con válvulas Mininert (Sypelco, Sigma-Aldrich Canadá LTD, Oakville, ON, Canadá), a cada frasco se agregaron 10 mL de medio mineral para el caso de los testigos o blancos y para el experimento del consorcio microbiano entrampado, 10 mL de emulsión múltiple (Fig. 5.3). Todos los microcosmos tuvieron una concentración de biomasa inicial de  $50 \text{ mg}_{\text{proteína}}/\text{L}$  cuantificada por el método de Lowry (1951). Para llevar a cabo la determinación de consumo de MTBE, se agregaron a los microcosmos  $2 \text{ }\mu\text{L}$  de MTBE (correspondientes a  $148 \text{ mg}_{\text{MTBE}}/\text{L}$  ó  $1.46 \text{ mg}_{\text{MTBE}}/\text{botella}$ ). Cada experimento se realizó por duplicado. Los ensayos se realizaron en condiciones controladas de temperatura a  $30^\circ\text{C}$  y agitación constante a 130 rpm.

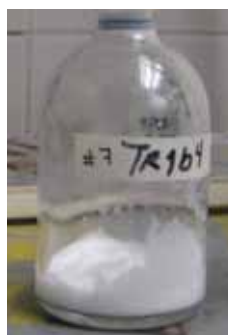


Fig. 5.3. Microcosmos con 10 mL de emulsión múltiple  $W_1/O/W_2$ .

#### 5.5.5 Pruebas de actividad del consorcio microbiano en microcosmos

Se elaboraron curvas patrón de MTBE en condiciones abióticas tanto en la emulsión múltiple como en medio mineral en concentraciones de MTBE de 0.37 a  $1.83 \text{ mg}_{\text{MTBE}}/\text{botella}$  –ver anexo 3–, previo a las pruebas de actividad del consorcio microbiano entrampado en la emulsión múltiple  $W_1/O/W_2$  (tabla 5.6), se cuantificó el MTBE por cromatografía de gases (técnica descrita más adelante), y se graficó el área bajo la curva (ABC) contra  $\text{mg}_{\text{MTBE}}/\text{botella}$ , y de esta manera se interpolaron en la curva los resultados obtenidos en los experimentos realizados.

Se realizaron cinéticas de consumo de MTBE y de producción de CO<sub>2</sub> del consorcio microbiano entrampado en la emulsión múltiple (W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub>), para observar la actividad del consorcio en estas condiciones, además, se siguió una cinética de consumo de MTBE del consorcio microbiano libre en medio mineral como control positivo (Control positivo MM). En estas cinéticas se determinó el comportamiento del consorcio microbiano en la degradación de MTBE.

Paralelamente a los microcosmos arriba descritos, se realizaron dos microcosmos, uno con el consorcio entrampado en la emulsión múltiple (Control negativo EM) y otro con el consorcio libre (Control negativo MM), pero, a diferencia de los anteriores, sin adicionar MTBE, con el propósito de observar la producción de CO<sub>2</sub> en el tiempo.

En la tabla 5.8, se muestran los experimentos en microcosmos realizados en el presente trabajo.

*Tabla 5.8. Microcosmos para las cinéticas de consumo de MTBE y producción de CO<sub>2</sub>*

| <b>Microcosmos</b>      | <b>MTBE (μL)</b> |
|-------------------------|------------------|
| Consortio entrampado EM | 2                |
| Control positivo MM     | 2                |
| Control negativo EM     | 0                |
| Control negativo MM     | 0                |

EM=Emulsión múltiple; MM= Medio mineral

#### 5.5.6 Determinación de velocidad de reacción de MTBE consumido en microcosmos

La velocidad de reacción indica la cantidad de MTBE consumido por unidad de tiempo por unidad de proteína. Esta velocidad se obtiene de los experimentos realizados en los microcosmos, donde se grafica el consumo de MTBE contra el tiempo. Los datos experimentales de degradación de MTBE se ajustaron con el modelo de Gompertz, que tiene tres parámetros (ecuación 5.6), y determina la velocidad de consumo del contaminante.

$$Y = \alpha \exp(-\beta \exp^{-kx}) \quad (\text{Ecuación 5.6})$$

Donde  $Y$  es la cantidad de sustrato consumido;  $\alpha$  es la máxima cantidad de sustrato consumido (mg sustrato/microcosmos);  $-\beta$  es el incremento del consumo de MTBE cuando el tiempo se incrementa indefinidamente;  $\kappa$  es la velocidad de consumo del sustrato (L/tiempo) y  $x$  es el tiempo.

Para obtener la velocidad máxima de consumo de MTBE, se realiza la derivación del modelo de Gompertz ( $Y$  con respecto a  $x$ ) obteniéndose la ecuación 5.7:

$$V_{\max} = 0.368 \alpha \kappa \quad (\text{Ecuación 5.7})$$

La velocidad máxima de consumo de sustrato se expresa en  $\text{mg}_{\text{MTBE consumido}}/\text{h}$ , y dividiéndola entre la cantidad de proteína cuantificada inicialmente, la tasa de reacción se ve reflejada en función de la proteína y se expresa en  $\text{mg}_{\text{MTBE consumido}}/\text{g}_{\text{proteína}}\text{h}$ .

## 5.6 Métodos de análisis en microcosmos

### 5.6.1 Cuantificación de MTBE

La concentración de MTBE se cuantificó en la fase gaseosa de los microcosmos (headspace), por medio de cromatografía de gases (Perkin Elmer Instruments Autosystem XL, E.U.A.) con un detector FID (flame ionization detector), con columna capilar, modelo HP-5 5% PH ME silicón de 30m, diámetro de 250  $\mu\text{m}$  y película de 0.25  $\mu\text{m}$ , con un flujo constante de 2 mL/min, con presión de 7.22 PSI y velocidad de 26 cm/s. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: temperatura de la columna, 100°C; temperatura del detector, 220°C; temperatura del inyector, 200°C; flujo de hidrógeno de 40 mL/min; flujo de aire de 400 mL/min; y, como gas acarreador, Nitrógeno con flujo de 50 mL/min.

Estos análisis se realizaron a las 24 h de inyectado el MTBE, y fueron monitoreados durante el periodo de incubación de los microcosmos, hasta la degradación parcial o total del contaminante. Se tomaron muestras de 100  $\mu\text{L}$  de la fase gaseosa del frasco (headspace), con

una micro- jeringa para gases (VICI Precision Sampling, Inc. Pressure-Lok ®, Alltech, E.U.A.) de 250  $\mu$ L de capacidad.

La eficiencia de degradación de MTBE fue estimada usando las mediciones de MTBE en la fase gaseosa a través del tiempo. Como regla, en un envase cerrado con volúmenes fijos de líquido y espacio de cabeza, el contenido de especies químicas volátiles en el sistema, la fase gaseosa es linealmente proporcional a su contenido total en el sistema. Así, el porcentaje de agotamiento de las especies químicas en la fase gaseosa es idéntico al porcentaje del agotamiento total sobre la biodegradación en la fase líquida (Moslemy y col., 2002).

### 5.6.2 Cuantificación de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>

El dióxido de carbono y el oxígeno, fueron cuantificados por medio de cromatografía de gases (Gow-Mac Series 550, E.U.A.), con una columna Alltech CTR1 (concéntrica de 6' X ¼ exterior y 6 X 118 interior, Alltech Inc., Kentucky, E.U.A.) y detector de conductividad térmica, como gas acarreador se utilizó Helio, con flujo de 65 mL/min, con presión de 40 PSI. Las condiciones de operación fueron: temperatura de la columna, 40°C; temperatura del detector, 150°C; y temperatura del inyector, 30°C; se ajustó el voltaje a 115 mA. Se tomaron muestras de la fase gaseosa del frasco a las 24 h de inyectado el MTBE, y cada 24 h, de un volumen de 200  $\mu$ L con una micro-jeringa para gases (VICI Precision Sampling, Inc. Pressure-Lok ®, Alltech Inc., Kentucky, E.U.A.) de 250  $\mu$ L de capacidad.

### 5.7 Diseño experimental

Para efecto de análisis estadístico, se evaluó el efecto en la estabilidad de la aplicación de varios factores en las emulsiones a través del tiempo, cada factor fue analizado independientemente (tipo de emulsificante, concentración de emulsificante, fracción de la fase dispersa, presencia de microorganismos, comparación entre biopolímero y polímero sintético) con sus respectivos niveles. Todos los experimentos se efectuaron por duplicado y para cada unidad experimental se efectuaron dos repeticiones en el transcurso del experimento.



Los datos se analizaron usando un diseño en bloques completos al azar, donde el tiempo fue bloqueado (ecuación 5.8) debido a que éste es un factor que se conoce de antemano que provoca una inestabilidad en la emulsión, y sólo se pretendió observar el efecto del tratamiento en la estabilidad de la emulsión.

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \rho_j + \varepsilon_{ij} \quad (\text{Ecuación 5.8})$$

$$i = 1, 2, \dots, t \quad j = 1, 2, \dots, r$$

Se utilizó el paquete estadístico NCSS 2000 y PASS 2000 (2001) para el análisis de los resultados. Si el análisis de varianza encontró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), las medias se compararon por la prueba de Tukey (Kuehl, 2001).

## Capítulo 6

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 6.1 CARACTERIZACIÓN DE EMULSIÓN PRIMARIA

### 6.1.1 Tipo de emulsificante lipofílico

Los emulsificantes empleados son predominantemente lipofílicos, la parte hidrofílica se ancla en la fase acuosa y la parte lipofílica se proyecta en la fase oleosa. La composición de la fase acuosa (Tabla 5.7) y el tipo de aceite empleado puede influir de manera importante en la formación de la emulsión.

Los resultados mostraron que el diámetro de los glóbulos de las emulsiones primarias empleando el emulsificante Span 20, se incrementó de manera súbita en menos de 24 horas, de modo que después de 20 días, sólo se observan pocos glóbulos y de tamaño cercano a 30  $\mu\text{m}$ , recordando que un tamaño grande de glóbulo provoca que la emulsión sea inestable, con este comportamiento, se derivó la separación de las fases; por otro lado, la emulsión primaria formulada con Span 80, proporcionó estabilidad significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) al Span 20, notándose cambios mínimos a través del tiempo; con Span 80, se tuvo un diámetro de glóbulo medio de  $3.83 \pm 2.4 \mu\text{m}$ . En la figura 6.1 se distingue el incremento de los diámetros de los glóbulos, mismos que fueron utilizados para el cálculo de la cinética de coalescencia de ambas emulsiones: Span 20 fue de  $7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  y para Span 80 de  $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ .

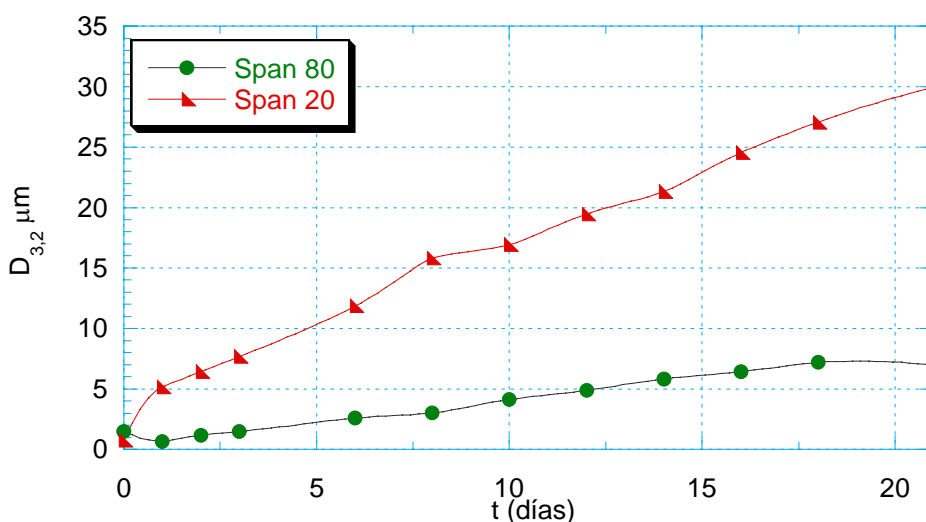


Fig. 6.1. Comportamiento del diámetro de los glóbulos de la emulsión primaria con dos diferentes tipos de emulsificantes lipofílicos.

### 6.1.2 Concentración del emulsificante Span 80

La importancia del conocimiento de la óptima concentración del emulsificante lipofílico conduce a una adecuada estabilización de la emulsión (Csóka y Erős, 1997).

Se experimentó con diferentes concentraciones de Span 80, para observar su efecto en la estabilidad de la emulsión. La Fig. 6.2, ilustra el comportamiento de los diámetros  $D_{3,2}$  de los glóbulos las emulsiones primarias a través del tiempo, encontrándose diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las distintas concentraciones (Tabla 6.1). En los porcentajes más bajos utilizados de Span 80 (0.5-4%), se advirtió un fenómeno de sedimentación, apareciendo una porción de fase oleosa en la parte superior de la emulsión  $W_1/O$  dentro de los primeros 5 días de haberse formulado la emulsión.

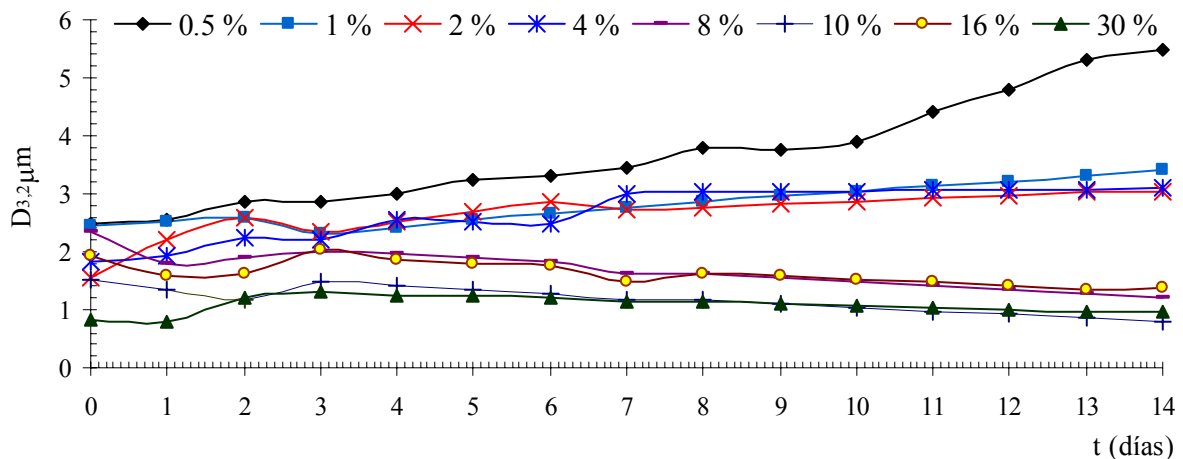


Fig. 6.2. Comportamiento de los glóbulos de la emulsión primaria con diferentes concentraciones de Span 80 a través del tiempo

Los diámetros  $D_{3,2}$  de los glóbulos de las emulsiones primarias que fueron más estables fueron con las concentraciones de Span 80 más altas (8 a 30%), pero como no existió diferencia ( $P > 0.05$ ) entre estas concentraciones, se decidió utilizar la concentración de 8%, considerando el criterio de costo-beneficio de material (Tabla 6.1). Los resultados de este experimento confirman lo reportado por otros investigadores (Frenkel y col., 1983), que con el incremento de la concentración del emulsificante lipofílico, la estabilidad de la emulsión incrementa.

Tabla 6.1. Comparación de medias de los glóbulos de la emulsión primaria  $D_{3,2}$  formulada con Span 80.

| Concentración | $D_{3,2}$ ( $\mu\text{m}$ ) |
|---------------|-----------------------------|
| 0.5           | 3.019 <sup>a</sup>          |
| 1             | 2.584 <sup>ab</sup>         |
| 2             | 2.242 <sup>abc</sup>        |
| 4             | 2.212 <sup>abc</sup>        |
| 8             | 1.822 <sup>bcd</sup>        |
| 10            | 1.155 <sup>cd</sup>         |
| 16            | 1.678 <sup>bcd</sup>        |
| <b>30</b>     | 1.052 <sup>d</sup>          |

<sup>a,b,c,d</sup> Los tratamientos con diferente superíndice tuvieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) utilizando la técnica de Tukey.

### 6.1.3 Fracción de la fase dispersa ( $\phi$ ).

Una vez probado el tipo y concentración de emulsificante lipofílico que mejor estabilizó la emulsión primaria se probó el efecto de la fracción de la fase dispersa en la estabilidad de la emulsión primaria, ya que se ha reportado que es un factor importante que afecta las propiedades funcionales de la emulsión como apariencia, textura, estabilidad y costo (McClements, 1999).

Los resultados mostraron (Tabla 6.2) un comportamiento estable en el tiempo con las diferentes fracciones de la fase dispersa, no encontrándose diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos.

Tabla 6.2. Cinética de coalescencia de los glóbulos de la emulsión primaria formulada con diferentes fracciones de fase dispersa.

| Fracción de fase dispersa | Cinética de coalescencia $\text{s}^{-1}$ |
|---------------------------|--|
| <b>0.1</b>                | $4 \times 10^{-7}$                       |
| <b>0.2</b>                | $1 \times 10^{-6}$                       |
| <b>0.3</b>                | $7 \times 10^{-7}$                       |
| <b>0.4</b>                | $4 \times 10^{-7}$                       |

Por lo general, una mayor concentración de fase dispersa, requiere mayor concentración de emulsificante y proporciona mayor viscosidad a la emulsión primaria  $W_1/O$ . Para efecto de

formulación de emulsiones múltiples  $W_1/O/W_2$ , esa situación no es favorable, debido a que una concentración de emulsificante mayor, aumenta la probabilidad de que las moléculas de éste migren a la interfase externa desestabilizando la emulsión  $W_1/O/W_2$ . Además, una mayor viscosidad de la emulsión  $W_1/O$  requiere de mayor energía durante la segunda etapa de emulsificación para lograr una distribución homogénea de la emulsión  $W_1/O$  (McClements, 1999).

Por lo anterior, se descartó la  $\phi$  de 0.4 y se optó por manejar una fracción de 0.3, para proporcionar mayor área de contacto superficial de la emulsión  $W_1/O$  con la fase continua que contendrá el contaminante.

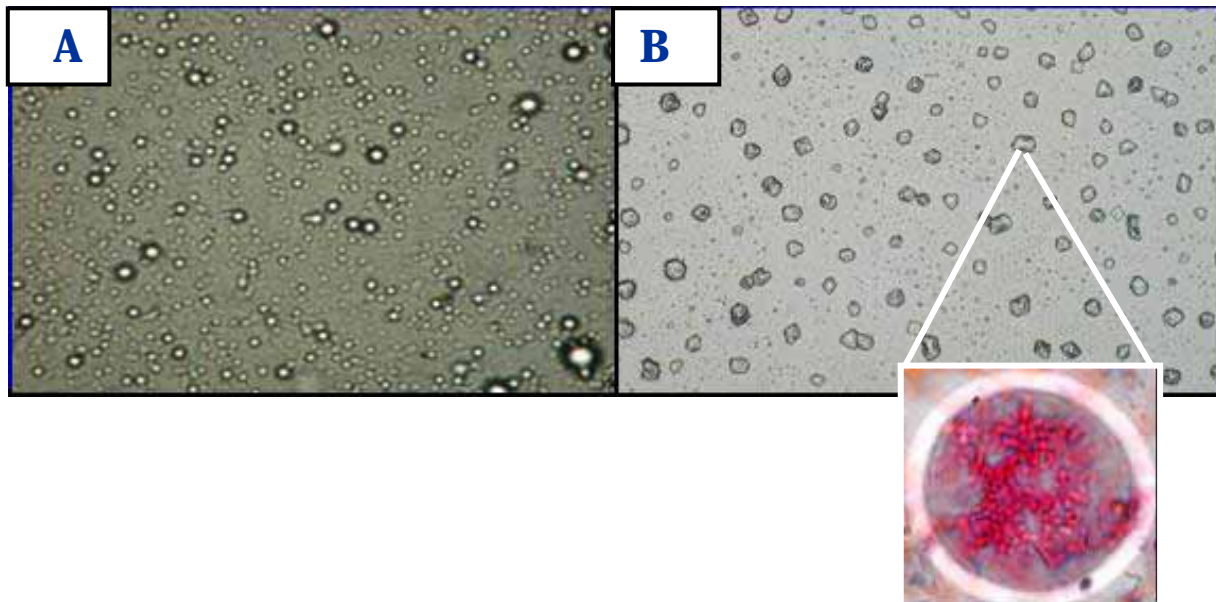
#### 6.1.4 Estabilidad de la emulsión primaria $W_1/O$ conteniendo el consorcio microbiano degradador de MTBE

Fue importante realizar este experimento debido a que según McClements (1999), las propiedades de una emulsión son afectadas en el tiempo por efectos microbiológicos, por ejemplo, el crecimiento de tipos específicos de bacterias. Por lo que si se adicionan intencionalmente microorganismos se debe probar el efecto de su adición en la estabilidad de la emulsión en el tiempo. Los resultados mostraron que no existe efecto en la adición del consorcio microbiano ( $P > 0.05$ ) en la estabilidad de la emulsión, según la cinética de coalescencia que para la prueba abiótica fue de  $6 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  y para la prueba biótica tuvo un valor de  $9 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ . Los diámetros medios  $D_{3,2}$  de los glóbulos de las emulsiones biótica y abiótica en 14 días fueron de  $1.86 \pm 0.21$  y  $1.71 \pm 0.32$  respectivamente.

#### 6.1.5 Tinción de Gram en la emulsión primaria $W_1/O$ .

A la emulsión primaria con el consorcio microbiano en el interior se le realizó una tinción de Gram, para que, de esta forma, se ubicara el sitio donde se localizaban los microorganismos; la Fig. 6.3 muestra que la tinción se realizó en el interior de los glóbulos y además los microorganismos se tiñeron de un color rojizo, lo que indica que son microorganismos Gram

(-). Con esto se puede inferir que la mayoría de los microorganismos quedan atrapados en los glóbulos de la emulsión primaria.



*Fig. 6.3 A) Emulsión primaria con microorganismos sin tinción de Gram, observada al microscopio óptico con un aumento de 100x; B) Emulsión primaria con microorganismos observada al microscopio óptico con un aumento de 100x teñida por el método de Tinción de Gram.*

## 6.2 CARACTERIZACIÓN DE EMULSIÓN MÚLTIPLE $W_1/O/W_2$

6.2.1 Caracterización de emulsiones múltiples con biopolímeros y combinación de biopolímeros.

Según la teoría de solubilización (Frenkel y col., 1983), el segundo emulsificante, el cual produce la emulsión múltiple  $W_1/O/W_2$  puede ser capaz de solubilizar al primero. Como resultado de este proceso, la cantidad de emulsificante adsorbido en la interfase  $W_1/O$  disminuye, lo cual puede conducir a la ruptura de la capa lipídica y a la inversión de la emulsión  $W_1/O/W_2$ .

La goma arábiga logró formar únicamente la emulsión múltiple por sólo 12 h, notándose la separación de las fases lo que indicó un rompimiento de la emulsión múltiple, esto pudo deberse a que probablemente la GA no pudo adsorberse en el aceite mineral y no ocurrió una formación de una capa interfacial, lo cual provocó que las gotas de aceite se acercaran entre sí; con la combinación de goma arábiga y quitosano, se formó la emulsión múltiple, aunque se incrementó el diámetro de los glóbulos rápidamente observándose también un rompimiento de la emulsión múltiple en menos de 6 días, el quitosano proporcionó sólo un retardo en el acercamiento de las gotas de aceite, pero no evitó la coalescencia de las mismas.

Los valores de la cinética de coalescencia de los glóbulos de las emulsiones formuladas con goma arábiga fueron mayores a los glóbulos de las emulsiones formuladas con goma de mezquite (Tabla 6.3). Lo que se indica con las cinéticas de coalescencia es un crecimiento de los glóbulos internos y externos a través del tiempo.

El número de glóbulos de la emulsión múltiple y su área superficial incrementa con el aumento del radio de la emulsión  $W_1/O$ . Existe una relación entre el área superficial y el hinchamiento de los glóbulos de aceite (Matsumoto y col., 1985). El fenómeno del rompimiento de los glóbulos de las emulsiones múltiples viene explicado por la teoría osmótica, que declara que existe un gradiente osmótico entre ambos lados de la capa oleosa. Esto causa el hinchamiento de las gotas internas de la fase acuosa, lo cual conduce al rompimiento de la capa oleosa resultando en la unificación de las fases acuosas interna y externa.

Tabla 6.3. Cinética de coalescencia de los glóbulos de la emulsión múltiple formada con biopolímeros.

| Tipo Goma   | Internos ( $s^{-1}$ ) | Externos ( $s^{-1}$ ) |
|-------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>GA</b>   | --                    | --                    |
| <b>GA-Q</b> | $2 \times 10^{-6}$    | $3 \times 10^{-6}$    |
| <b>GM</b>   | $3 \times 10^{-7}$    | $2 \times 10^{-7}$    |
| <b>GM-Q</b> | $3 \times 10^{-7}$    | $6 \times 10^{-7}$    |

La emulsión formada únicamente con goma de mezquite conservó diámetros de glóbulos internos y externos más uniformes durante el tiempo con respecto a las demás formulaciones. Se puede observar en las figuras 6.4 y 6.5 que la mezcla de goma de mezquite con quitosano en la emulsión, no proporciona un incremento en la estabilidad, debido a que forma glóbulos



externos que van de 8 a 16 $\mu\text{m}$  y los formados únicamente con goma de mezquite se encuentran en alrededor de 8 $\mu\text{m}$  en todo el periodo observado.

La goma de mezquite es una macromolécula que actuó efectivamente como estabilizante en la formación de la emulsión múltiple, debido a que logró adsorberse en la interfase O/W por medio de su fracción proteica y de esta manera formó una capa interfacial, que brindó una fuerza repulsiva a los glóbulos de aceite que se acercaban entre sí por movimiento browniano.

Por lo que en base a este experimento se eligió a la emulsión múltiple formada con goma de mezquite como biopolímero estabilizante.

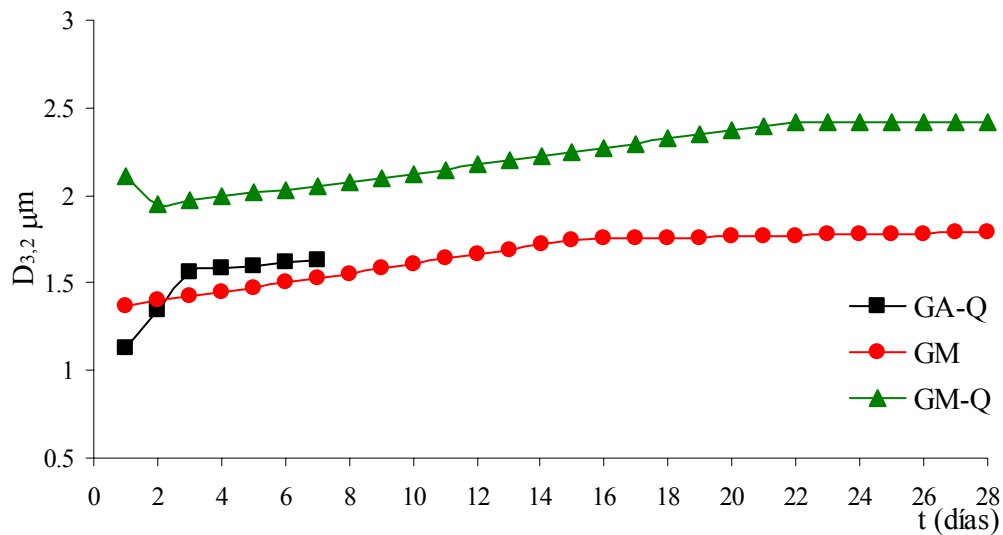


Fig. 6.4. Diámetro de glóbulos internos a través del tiempo en emulsiones múltiples formadas con biopolímeros.

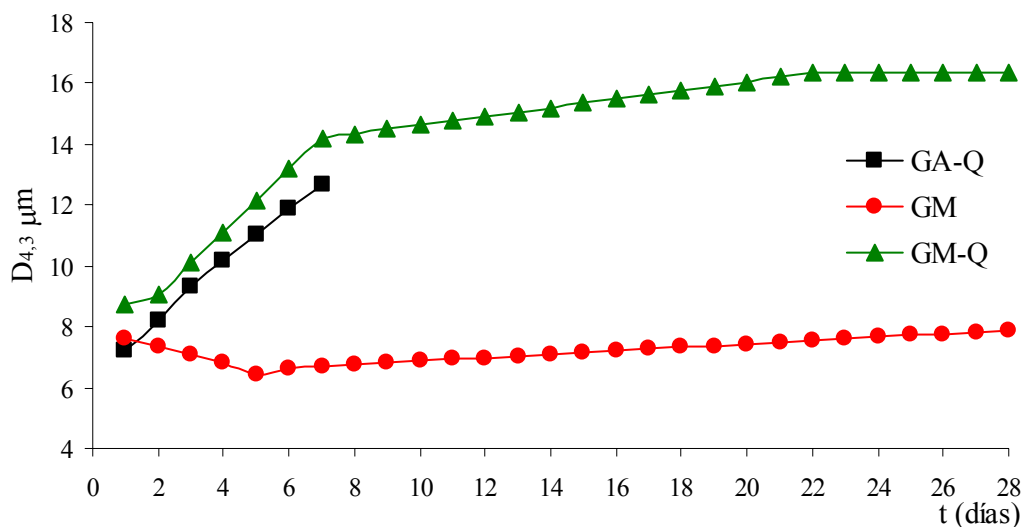


Fig. 6.5. Diámetro de glóbulos externos a través del tiempo en emulsiones múltiples formadas con biopolímeros

En la Fig. 6.6 se aprecia el cambio morfológico de las emulsiones múltiples formadas con los biopolímeros; en particular, se puede observar que la goma arábica no estabiliza la emulsión múltiple, y en menos de 24 h, sólo se notan emulsiones primarias O/W. La combinación de GA-Q, contribuye a que los glóbulos de las emulsiones múltiples conserven su estructura interna, aunque el tamaño de los glóbulos aumenta significativamente con respecto a los iniciales. En las emulsiones formuladas con GM y GM-Q se aprecian los glóbulos de la emulsión múltiple, siendo con la combinación de GM-Q en donde el diámetro de los glóbulos es mayor, lo que implica más susceptibilidad a la inestabilidad de la emulsión múltiple.

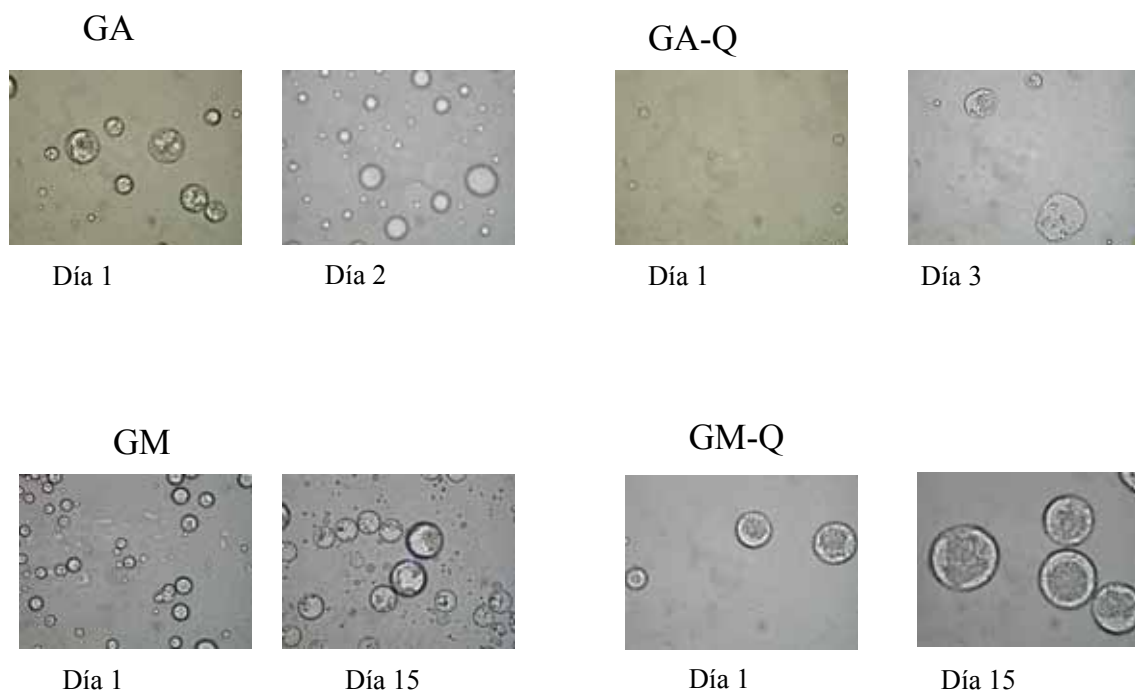


Fig. 6.6 Microfotografías de los glóbulos de las emulsiones múltiples a diferentes tiempos.

La relación entre  $D_{3,2}/D_{4,3}$  puede usarse como indicativo de la estabilidad de la emulsión múltiple  $W_1/O/W_2$ . Las relaciones mostradas en la tabla 6.4 indican que las emulsiones que se encontraron dentro del rango (0-0.34) por más tiempo, y que corresponde a emulsiones clasificadas como de alta estabilidad fueron las formuladas con GM y GM-Q debido a que el tamaño medio de los glóbulos en la emulsión primaria fueron muy pequeños en comparación con los glóbulos de la emulsión múltiple. Esto coincide con lo reportado por Dickinson (2003), que afirma que para obtener una emulsión múltiple estable es necesario que el tamaño del glóbulo de la emulsión múltiple sea mayor al obtenido en la emulsión primaria, además de conservarse esa relación a través del tiempo.

Tabla 6.4. Valores de la relación  $D_{3,2}/D_{4,3}$  de las emulsiones múltiples formadas con biopolímeros.

| t (días) | GA   | GA-Q | GM   | GM-Q |
|----------|------|------|------|------|
| 1        | 0.09 | 0.16 | 0.18 | 0.24 |
| 7        | --   | 0.13 | 0.23 | 0.14 |
| 28       | --   | --   | 0.23 | 0.15 |

### 6.2.2 Caracterización de emulsiones múltiples con polímero sintético (ácido poliacrílico) a distintas concentraciones.

Con el polímero sintético (PS) se observó que a mayor concentración se logra obtener una emulsión cinéticamente estable; observándose en la mayoría de los tratamientos que los glóbulos externos fueron disminuyendo su diámetro. Los valores negativos de las cinéticas de cambio en el tamaño de los glóbulos mostrados en la tabla 6.5 reflejan este comportamiento; esto se puede deber a la expulsión de los glóbulos internos (fase acuosa interna) hacia la fase acuosa externa, pudiendo haber coalescido, y uniéndose a la fase afín. Las emulsiones con concentraciones más bajas de polímero sintético (0.025 y 0.05) formaron una emulsión múltiple con menor duración, con respecto a las de mayor concentración. Es importante tener una velocidad lenta del cambio de los glóbulos tanto internos como externos para asegurar una estabilidad en la emulsión; la emulsión múltiple formada con 0.2% de polímero sintético presenta este comportamiento.

*Tabla 6.5. Cinética de cambio en el tamaño de los glóbulos de la emulsión múltiple formada con distintas concentraciones de polímero sintético.*

| TR1 % | Internos (s <sup>-1</sup> ) | Externos (s <sup>-1</sup> ) |
|-------|-----------------------------|-----------------------------|
| 0.025 | <b>1x10<sup>-6</sup></b>    | <b>-7x10<sup>-6</sup></b>   |
| 0.05  | <b>2x10<sup>-7</sup></b>    | <b>-5x10<sup>-7</sup></b>   |
| 0.1   | <b>4x10<sup>-7</sup></b>    | <b>-3x10<sup>-7</sup></b>   |
| 0.2   | <b>2x10<sup>-7</sup></b>    | <b>-3x10<sup>-7</sup></b>   |
| 0.4   | <b>1x10<sup>-6</sup></b>    | <b>-2x10<sup>-8</sup></b>   |

La emulsión múltiple formada con 0.2% de polímero sintético conservó un tamaño de glóbulo interno y externo más uniforme durante el tiempo con respecto a las demás concentraciones como se puede observar en las figuras 6.7 y 6.8. Por lo que se sugiere esta concentración de PS para la estabilización de la emulsión múltiple, de acuerdo al comportamiento mostrado.

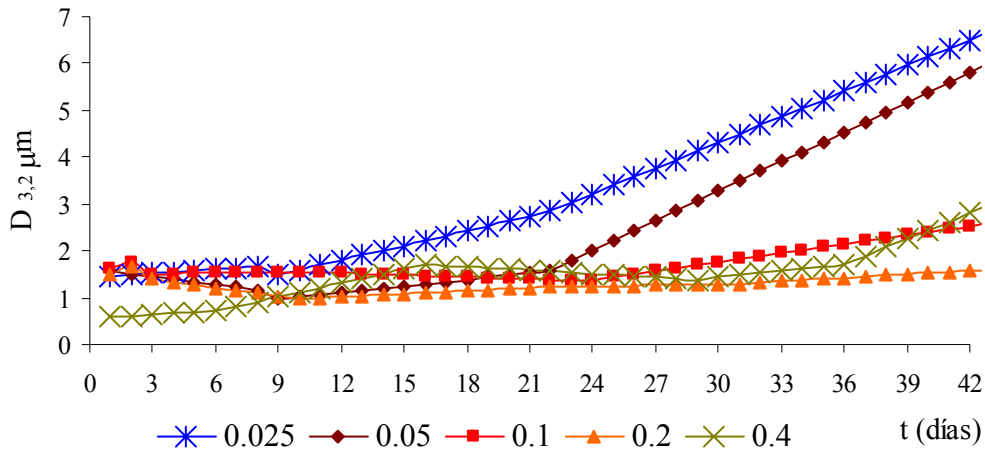


Fig. 6.7. Diámetro de glóbulos internos a través del tiempo en emulsiones múltiples formadas con distintas concentraciones de polímero sintético

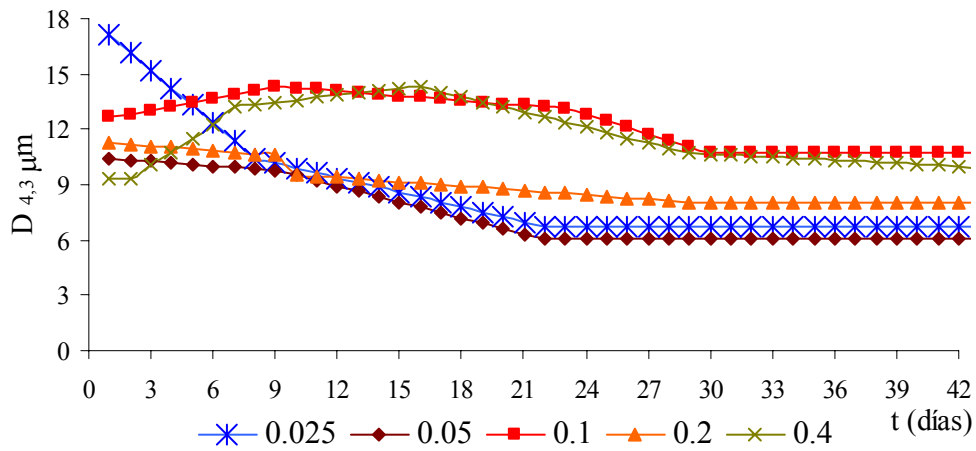


Fig. 6.8. Diámetro de glóbulos externos a través del tiempo en emulsiones múltiples formadas con distintas concentraciones de polímero sintético

En la figura 6.9 se nota claramente el cambio morfológico de las emulsiones múltiples formadas con el polímero sintético a distintas concentraciones; con los porcentajes de polímero sintético más bajos (0.025 y 0.05%) inicialmente se formaron emulsiones múltiples, sin embargo, a través del tiempo sólo mostraron emulsiones primarias del tipo O/W. En general, se puede apreciar un comportamiento estable en las concentraciones más altas de polímero sintético (0.1-0.4%), de acuerdo a la permanencia de la emulsión múltiple observada a través del tiempo.

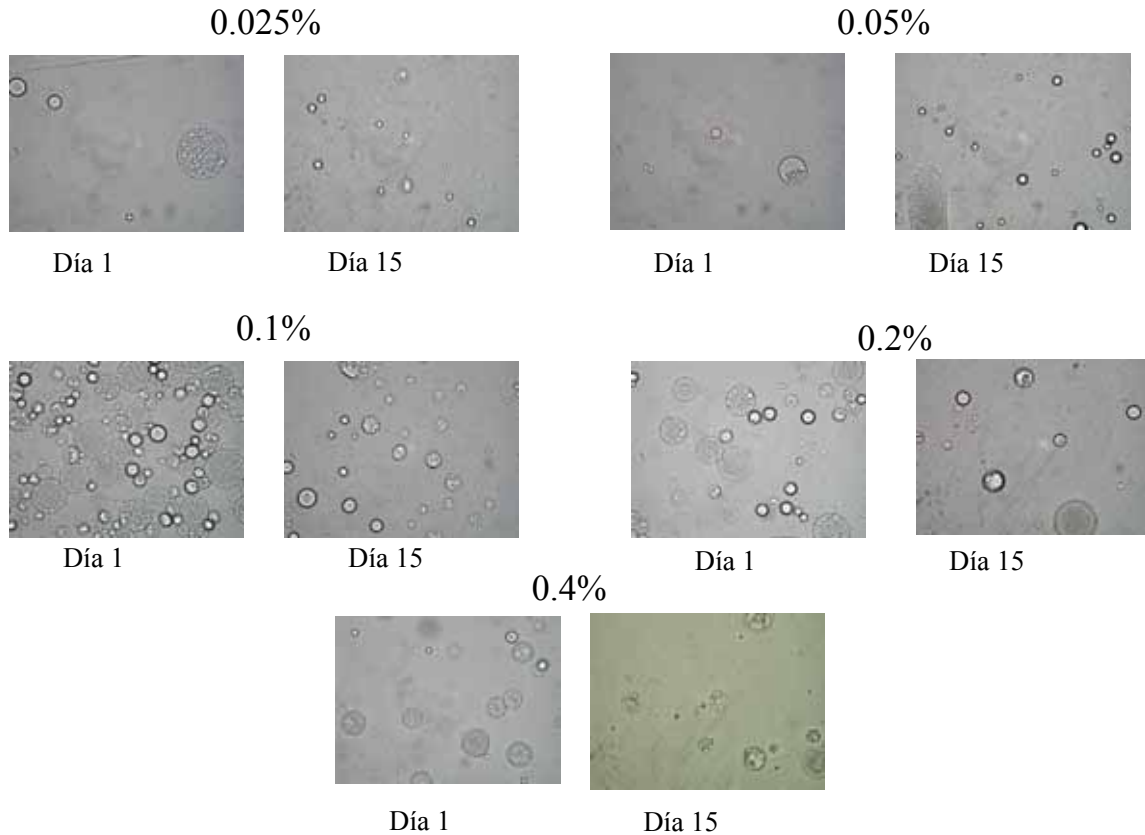


Fig. 6.9. Microfotografías de los glóbulos de las emulsiones múltiples formadas con polímero sintético observadas en diferentes tiempos.

De acuerdo a la relación de los glóbulos internos y externos  $D_{3,2}/D_{4,3}$  calculada para confirmar la estabilidad de la emulsión, la tabla 6.6 indica que finalmente, después de 42 días en que se observó la emulsión, la concentración de 0.2 y de 0.4% conservan el valor más cercano a cero, asegurando con esto, que son las emulsiones de mayor estabilidad a través del tiempo con un diámetro promedio de glóbulo externo de  $8.98 \pm 1.13$  y  $11.76 \pm 1.6$   $\mu\text{m}$  respectivamente, sin embargo, se decidió optar por la concentración de 0.2% debido a que la viscosidad de la emulsión con esta concentración de PS fue menor en comparación con la emulsión con 0.4%, la viscosidad que presentó esta emulsión fue mayor, lo que podría representar un problema de aplicación a futuro.

Tabla 6.6. Valores de la relación  $D_{3,2}/D_{4,3}$  de las emulsiones múltiples formadas con distintas concentraciones de polímero sintético

| t (días) | 0.025% | 0.05% | 0.1% | 0.2% | 0.4% |
|----------|--------|-------|------|------|------|
| 1        | 0.08   | 0.15  | 0.13 | 0.13 | 0.07 |
| 9        | 0.15   | 0.10  | 0.11 | 0.09 | 0.07 |
| 22       | 0.43   | 0.26  | 0.10 | 0.14 | 0.12 |
| 43       | 0.99   | 0.99  | 0.25 | 0.20 | 0.30 |

### 6.3 Comparación de emulsiones múltiples formadas con biopolímero y polímero sintético.

#### 6.3.1 Estabilidad de emulsiones múltiples formadas con biopolímero y polímero sintético.

Los resultados mostraron (Fig. 6.10) que la goma de mezquite y el polímero sintético (0.2%) brindan estabilidad a la emulsión múltiple, sin embargo, se compararon estos dos polímeros, encontrándose diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la estabilidad proporcionada a la emulsión múltiple por parte de los polímeros utilizados. La relación  $D_{3,2}/D_{4,3}$  más baja es la mostrada con el polímero sintético, por lo que se decidió utilizar este último debido a que los glóbulos internos coalescen aproximadamente a la misma velocidad que los externos proporcionando un parámetro de estabilidad en la emulsión múltiple formada.

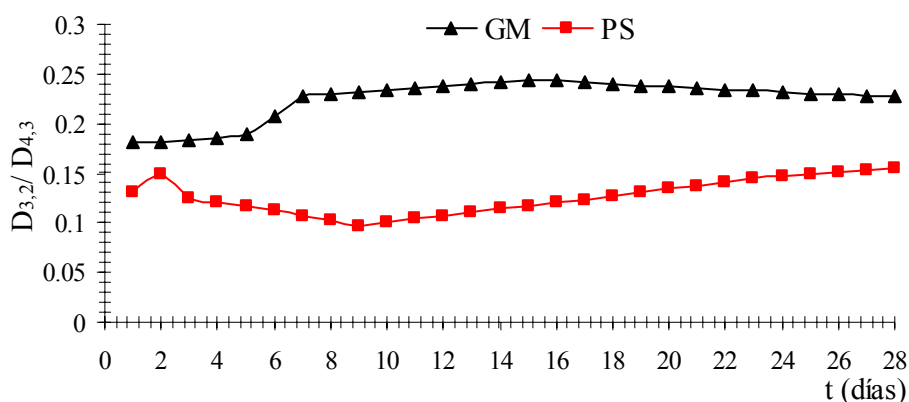


Fig. 6.10. Relación  $D_{3,2}/D_{4,3}$  de las emulsiones múltiples formadas con goma de mezquite y polímero sintético.

La formulación propuesta, es estable en el tiempo, lo cual concuerda con lo reportado por Allouche y col., (2003) quienes afirman que el uso de una mezcla anfifílica compuesta de un emulsificante lipofílico y un polímero hidrofílico permite hacer una emulsión múltiple  $W_1/O/W_2$  en el proceso de emulsificación de dos etapas. Específicamente, muestran como las fases acuosas interna y externa presentan cambios en la estabilidad de acuerdo con la formulación, composición y la viscosidad del aceite afectando las propiedades de la emulsión.

### 6.3.2 Efecto de la adición de MTBE en la estabilidad de la emulsión múltiple formada con biopolímero y polímero sintético

A las emulsiones múltiples formadas con goma de mezquite y con polímero sintético se les adicionó MTBE para evaluar su efecto en la estabilidad. Los resultados mostraron (Fig. 6.11) que el MTBE provoca una separación de fases causado por un fenómeno de cremado en la emulsión múltiple formada con goma de mezquite, de manera que en las microfotografías sólo se observa una emulsión del tipo O/W. Este fenómeno puede atribuirse a una reacción de tipo químico entre los componentes de la emulsión y el MTBE, provocando la desorción de la GM en la interfase O/W provocando el rompimiento de la emulsión múltiple inmediatamente.

Con respecto a la adición de MTBE en la emulsión múltiple estabilizada con el polímero sintético, los glóbulos de la emulsión múltiple se conservan, indicando que no causa ningún efecto en la estabilidad de esta emulsión; por esta razón, se eligió la formulación de la emulsión múltiple estabilizada con polímero sintético para observar el comportamiento de biodegradación de MTBE por el consorcio microbiano entrampado en la emulsión múltiple estable.



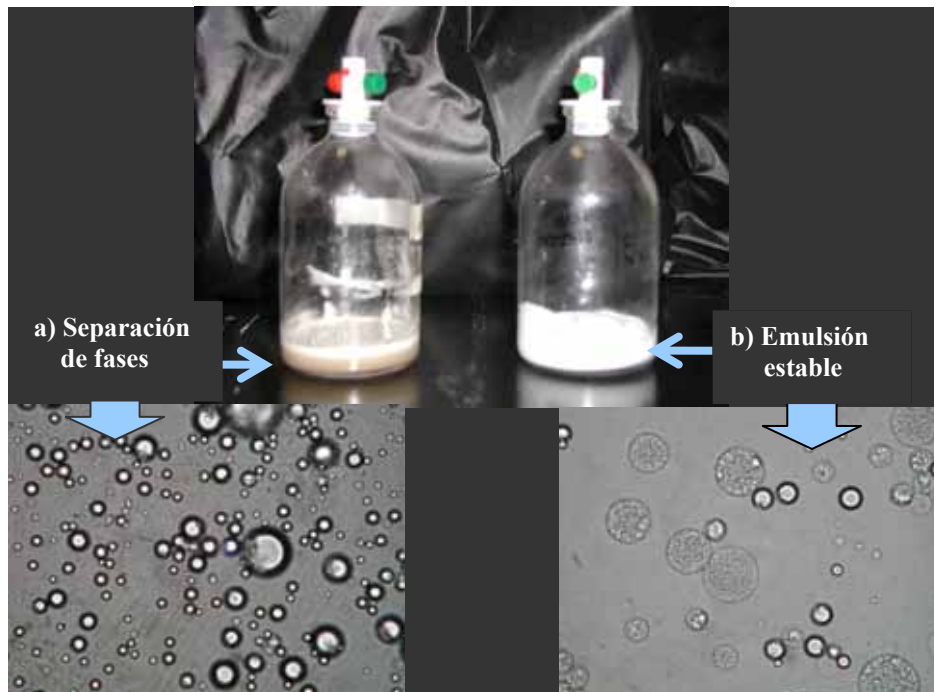


Fig. 6.11. Efecto de la adición de MTBE en la estabilidad de emulsiones múltiples a) Separación de fases de emulsión formulada con goma de mezquite b) Permanencia de la emulsión múltiple formulada con polímero sintético.

### 6.3.3 Efecto de la presencia del consorcio microbiano en la estabilidad de la emulsión múltiple.

Habiendo obtenido una emulsión múltiple cinéticamente estable y con estabilidad en presencia de MTBE, se prosiguió a entrapar al consorcio microbiano en la emulsión múltiple (biótica) y observar el efecto en la estabilidad. Se comparó la emulsión múltiple biótica con una emulsión múltiple sin microorganismos (abiótica) y no se encontró diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) en la cinética de cambio en el tamaño de los glóbulos internos ( $D_{3,2}$ ) y externos ( $D_{4,3}$ ) de las emulsiones (Tabla 6.7), ya que ambas conservan el tamaño de sus diámetros ( $D_{3,2}$  y  $D_{4,3}$ ) en el tiempo.

Tabla 6.7. Cinética de cambio en el tamaño de los glóbulos de la emulsión primaria y múltiple conteniendo el consorcio microbiano.

| Emulsión | Internos ( $s^{-1}$ ) | Externos ( $s^{-1}$ ) |
|----------|-----------------------|-----------------------|
| Abiótica | $2 \times 10^{-7}$    | $3 \times 10^{-7}$    |
| Biótica  | $4 \times 10^{-7}$    | $1 \times 10^{-6}$    |

La morfología de las emulsiones múltiples abiótica y biótica se pueden observar en la figura 6.12.

Por otro lado, si se observa el tamaño de los glóbulos externos de la emulsión múltiple, se puede apreciar (Fig. 6.13) que en la emulsión que contiene a los microorganismos casi se duplica el diámetro  $D_{4,3}$  ( $18.14 \pm 1.47 \mu\text{m}$ ) con respecto a la emulsión que no contiene microorganismos ( $9.41 \pm 1.09 \mu\text{m}$ ), encontrándose diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el diámetro de los glóbulos externos ( $D_{4,3}$ ) de ambas pruebas, esto puede ser debido a la inherente presencia del consorcio microbiano, lo que para efecto de este trabajo conviene debido a que por glóbulo externo de emulsión múltiple se contienen más glóbulos internos donde se encuentran los microorganismos.

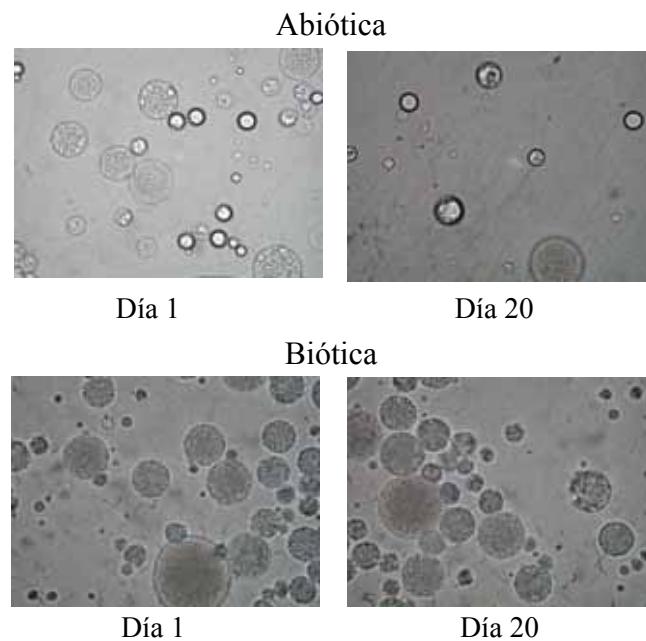


Fig. 6. 12. Microfotografías de los glóbulos de las emulsiones múltiples formadas con polímero sintético observadas en diferentes tiempos.

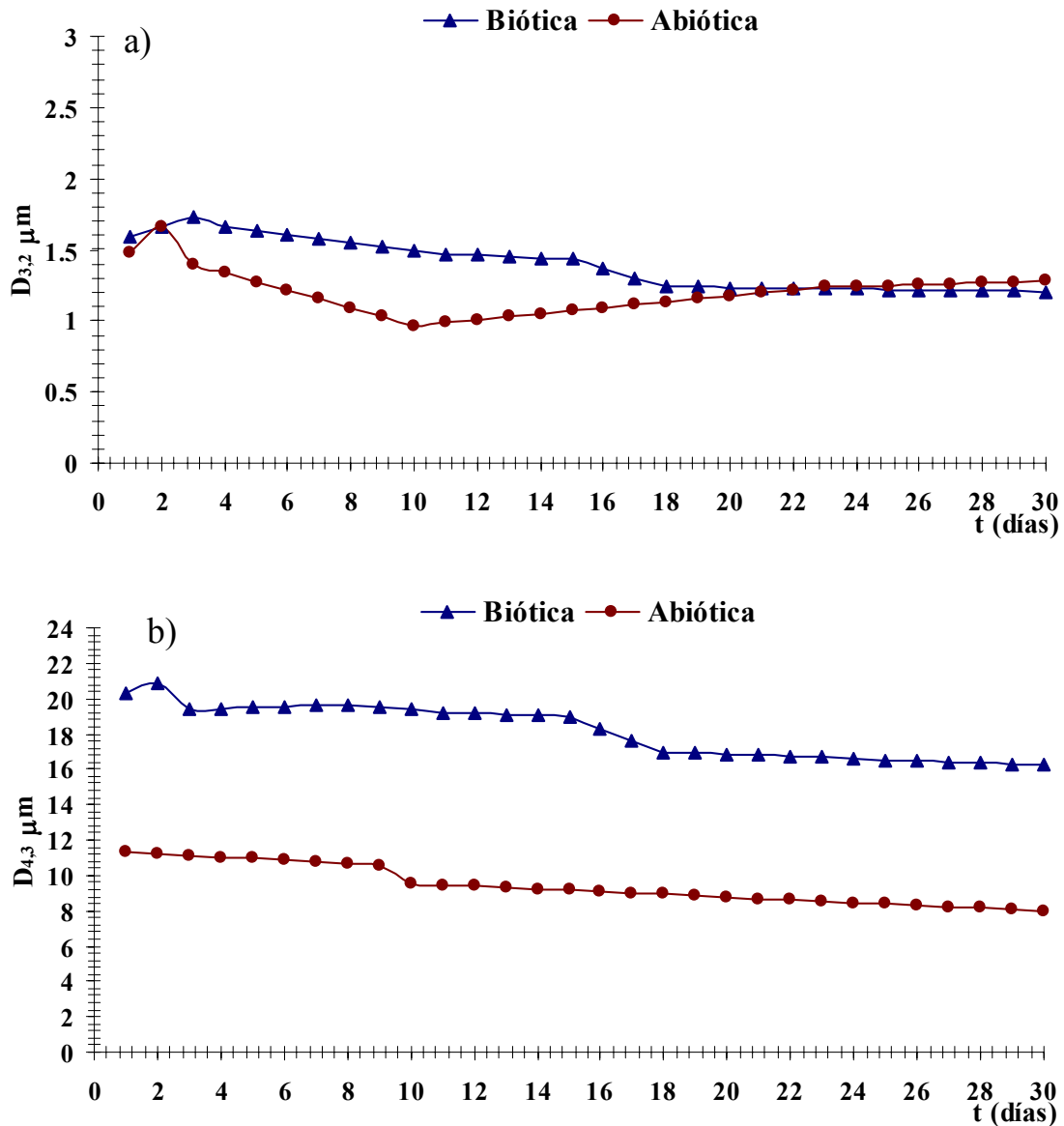


Fig. 6.13. Comparación de diámetros de a) glóbulos internos y b) glóbulos externos a través del tiempo en emulsiones múltiples bióticas y abióticas.

En virtud de que el objetivo del presente trabajo fue el de desarrollar una técnica para entrapar un consorcio microbiano viable para degradar MTBE, fue necesario observar la actividad degradativa del consorcio entrampado en la emulsión múltiple, para lo cual se realizaron los experimentos descritos más adelante.

## 6.4 Estudios cinéticos de la oxidación biológica de MTBE

### 6.4.1 Actividad del consorcio microbiano en medio mineral.

El estudio realizado en los microcosmos por el consorcio microbiano que se inoculó en el sistema (50 mg/L proteína), determinó su comportamiento en cuatro ciclos. Un ciclo comprende desde el primer día que se adiciona MTBE en el sistema hasta que se consume total o parcialmente por el consorcio microbiano en un mismo sistema experimental (microcosmos).

De los cuatro ciclos experimentados, sólo se representan a los últimos tres en la figura 6.14a, debido a que el primer ciclo mostró un comportamiento diferente, probablemente al periodo de adaptación que sufrió el consorcio microbiano en el microcosmos. Posteriormente, en los subsecuentes tres ciclos, se apreció un comportamiento similar entre ellos en cuanto a la biodegradación de MTBE.

En los ciclos observados, la biodegradación se llevó a cabo en aproximadamente 5 días, con una tasa de degradación de  $0.08 \pm 0.04 \text{ mg}_{\text{MTBE}} \text{mg}_{\text{proteína}}^{-1} \text{h}^{-1}$ , que se encuentra dentro del rango encontrado por un consorcio microbiano reportado por Fortin y col. (2001) que presentó una tasa de degradación de  $0.013\text{--}0.04 \text{ mg}_{\text{MTBE}} \text{mg}_{\text{proteína}}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Estos resultados, utilizados como control positivo (MM) evidenciaron que el consorcio microbiano podría ser inoculado al sistema experimental de emulsión múltiple para su entrapamiento y observar su comportamiento en tales condiciones. Así mismo, en la figura 6.14b, se observa la producción de  $\text{CO}_2$ , que indica la biodegradación de MTBE, donde el valor final obtenido de  $\text{CO}_2$  corresponde al  $75.57 \pm 7.47\%$  respecto al valor de  $\text{CO}_2$  teórico; el porcentaje de carbono no mineralizado puede atribuirse a la presencia de compuestos de degradación de MTBE intermediarios, así como a la producción de biomasa que no fueron cuantificados en este estudio.

Por otro lado, se realizaron experimentos para comparar la producción de  $\text{CO}_2$ , cuando en el microcosmos se agregaba MTBE y en ausencia de MTBE (control negativo MM), encontrando en este último que la producción de  $\text{CO}_2$  es mínima debida únicamente a la respiración endógena (Tabla 6.8), y, con la presencia de MTBE, se aprecia un aumento

significativo en la producción de CO<sub>2</sub>, debido a la fuente de carbono adicionada (MTBE) (Fig. 6.15).

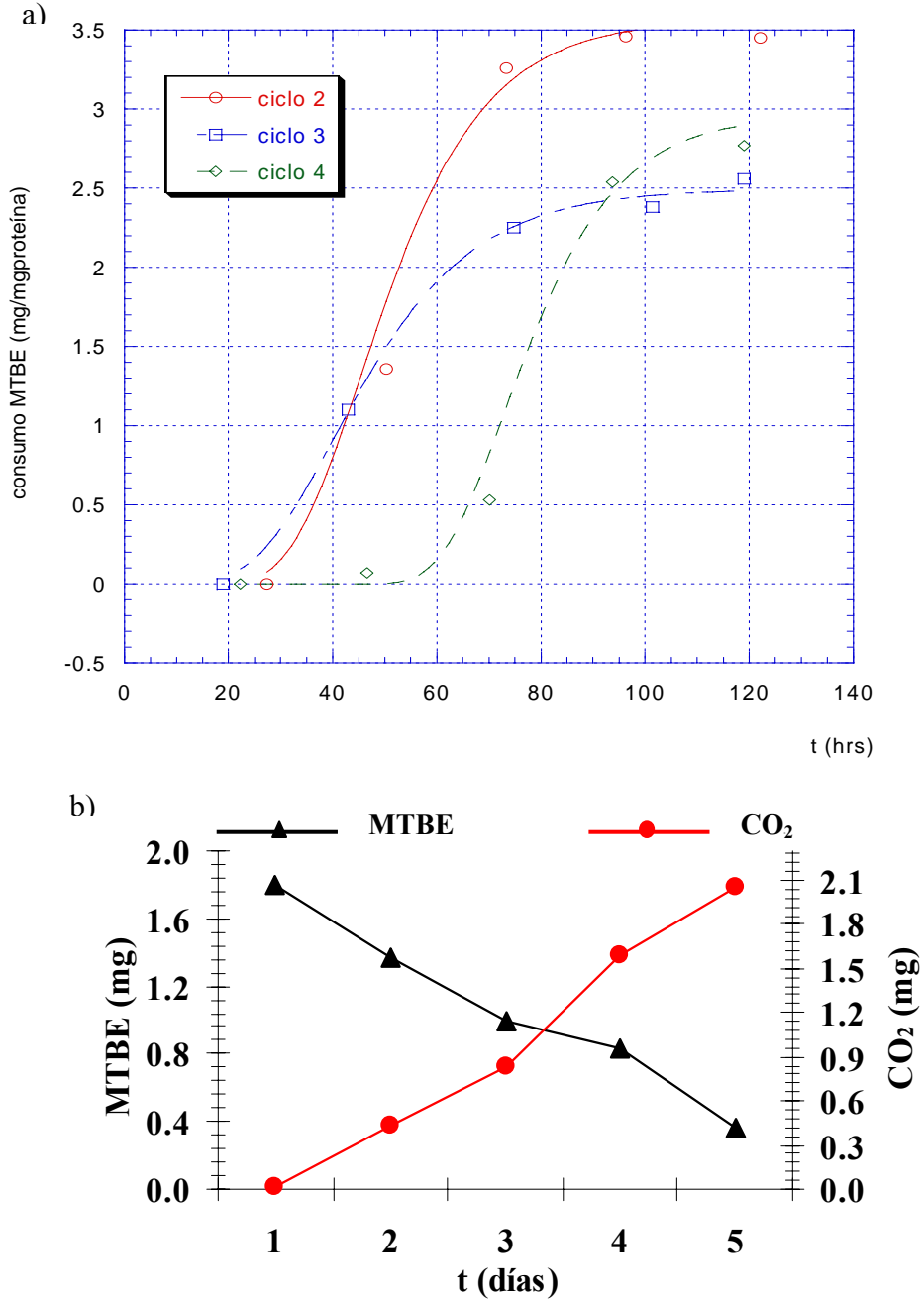


Fig. 6.14. a) Consumo de MTBE y b) producción de CO<sub>2</sub> del consorcio microbiano en medio mineral.

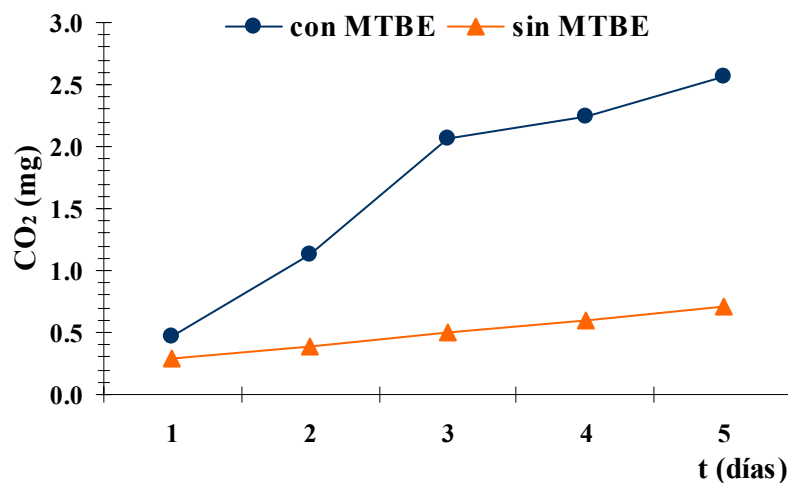


Fig.6.15. Producción de CO<sub>2</sub> del consorcio microbiano en medio mineral, en presencia y en ausencia de MTBE.

#### 6.4.2 Biodegradación de MTBE por el consorcio microbiano entrampado en la emulsión múltiple.

Se probó la biodegradación de MTBE por el consorcio microbiano entrampado en la emulsión, se determinó su comportamiento en un ciclo observado (Fig. 6.16). El consumo de MTBE se llevó a cabo en aproximadamente 12 días. El MTBE no se agotó totalmente al cabo del ciclo de duración del experimento debido probablemente a las condiciones de adaptación del consorcio microbiano, o a una fuente alterna de carbono proveniente de algún componente de la emulsión. La tasa de degradación fue de  $0.012 \pm 0.04 \text{ mg}_{\text{MTBE}} \text{mg}_{\text{proteína}}^{-1} \text{h}^{-1}$ . La tasa de degradación obtenida por el consorcio microbiano entrampado en la emulsión múltiple es comparable con las tasas de degradación reportadas por Fortin y col. (2001) en un consorcio microbiano libre que tuvieron un rango de  $0.013\text{--}0.04 \text{ mg}_{\text{MTBE}} \text{mg}_{\text{proteína}}^{-1} \text{h}^{-1}$ .

Los resultados mostraron que el consorcio microbiano entrampado en una emulsión múltiple puede ser capaz de degradar  $60.7 \pm 5.1\%$  MTBE en tales condiciones. En otras palabras, la cantidad inicial de MTBE fue de 1.46 mg y finalmente se llegó a una cantidad de 0.57 mg de MTBE en el microcosmos.

En lo referente a la producción de CO<sub>2</sub>, los resultados indicaron que el consorcio microbiano tiene actividad respiratoria y se confirmó que el MTBE es consumido y que no solamente está

disuelto en las diferentes fases de la emulsión. Al experimentar con un control negativo (EM), en el cual se entrampó al consorcio microbiano en la emulsión múltiple, y no se adicionó MTBE (Tabla 6.9), se pudo apreciar la producción de  $\text{CO}_2$  en presencia y ausencia de MTBE, notándose una ligera ventaja en producción de  $\text{CO}_2$  con la adición de MTBE que se atribuyó al consumo de este contaminante (Fig. 6.17).

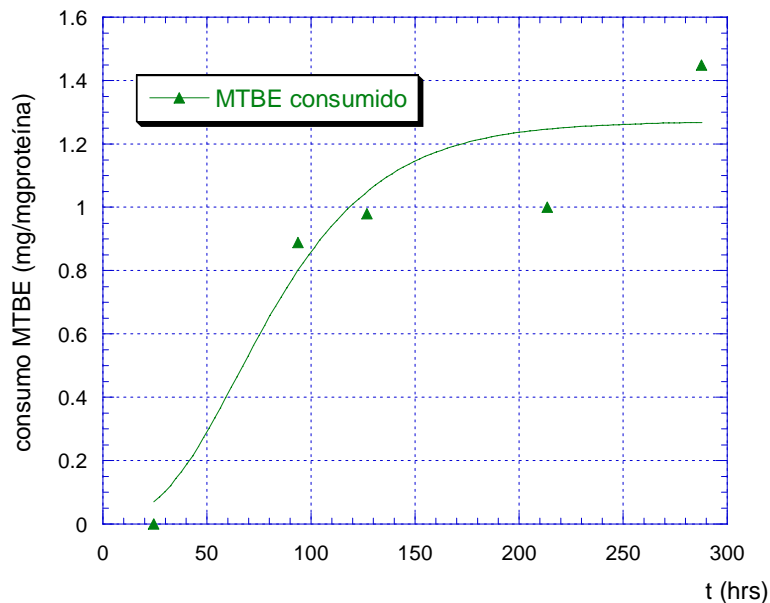


Figura 6.16. Biodegradación de MTBE del consorcio microbiano entrampado en la emulsión.

Estos resultados sugieren que algún componente de la emulsión es degradado por el consorcio microbiano como fuente alterna de carbono (Fig. 6.17). Esto concuerda con lo referido por Stocking y col. (2000) ya que afirman que la presencia de más compuestos orgánicos fácilmente biodegradables en el sistema puede inhibir la biodegradación de MTBE o posiblemente promover la biodegradación cometabólica.

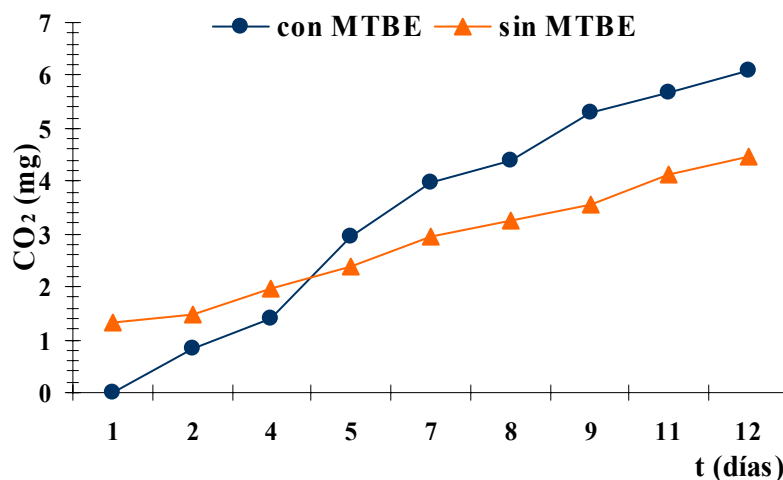


Fig.6.17. Producción de  $CO_2$  del consorcio microbiano entrampado en la emulsión múltiple, en presencia y en ausencia de MTBE.

Se pretendió en un principio que los componentes de la emulsión no fueran biodegradables por el consorcio microbiano para aumentar la eficiencia de degradación del MTBE; sin embargo, los resultados de producción de  $CO_2$  demostraron lo contrario, y, para revelar con precisión cual o cuales compuestos eran degradados por el consorcio microbiano, se decidió realizar experimentos adicionales mostrados en la siguiente sección.

Los resultados sintetizados en la tabla 6.8 muestran el impacto que tuvo el entrampamiento del consorcio microbiano comparado con el consorcio microbiano libre en medio mineral en las tasas de degradación de MTBE. La velocidad de consumo de MTBE se vio disminuida en el microcosmos con la emulsión, así mismo en el porcentaje de MTBE consumido.

En condiciones estándar (reactor y matraz procultivo), el consorcio microbiano es aireado constantemente cuando está en el reactor, y cada 72 hrs cuando se encuentra en un matraz procultivo. En los microcosmos con el consorcio entrampado, la cinética se siguió durante casi 300 hrs sin suministrar fuente de oxígeno, por lo que pudo verse afectada la degradación de MTBE. Esto concuerda con lo reportado por Sun y col. (1996) y por Tang y Sun (1997) que demostraron la dependencia de la degradación de MTBE sobre una adecuada concentración de oxígeno molecular. Los estudios realizados en biorreactores por estos autores, indicaron que los cultivos degradadores de MTBE son sensibles a condiciones de baja concentración de oxígeno.



Los resultados obtenidos en los experimentos cinéticos de este trabajo confirman la necesidad de tener una buena oxigenación y distribución de los nutrientes en el sistema para garantizar capacidades altas de eliminación de contaminantes (Devinny y col., 1999; Morales y col., 1998; Morgenroth y col., 1996).

No obstante que el porcentaje de consumo de MTBE fue de  $60.7 \pm 5.1$ , se pueden reconocer las ventajas que podría brindar el entrapamiento del consorcio microbiano en el sistema de emulsión múltiple como: protección de estrés biótico (depredación por protozoarios y bacteriófagos) (Smit y col., 1996), protección de estrés abiótico (efectos inhibitorios de compuestos tóxicos) (Cassidy y col., 1997), suministro de aditivos nutricionales co-encapsulados e incremento de distancias de transporte en el medio a tratar (Trevors y col., 1993).

El entrapamiento de los microorganismos pudo proveer una barrera protectora, la cual pudo tener un efecto limitante en la difusión de MTBE, reduciendo la biodisponibilidad de este compuesto en el interior de la emulsión múltiple donde se encontraban los microorganismos (Moslemy y col., 2002).

*Tabla 6.8. Comportamiento de las principales variables de los microcosmos en medio mineral y en sistema de emulsión múltiple en presencia de MTBE*

|   | Control positivo<br>MM | Consortio entrapado +<br>MTBE |
|---|------------------------|-------------------------------|
| MTBE consumido (mg)   | $1.55 \pm 0.26$        | $0.89 \pm 0.074$              |
| % MTBE consumido  | $96.14 \pm 4.50$       | $60.7 \pm 5.1$                |
| O <sub>2</sub> consumido (mg)   | $2.84 \pm 0.25$        | $4.91 \pm 0.47$               |
| CO <sub>2</sub> producido (mg)  | $2.24 \pm 0.27$        | $6.44 \pm 0.19$               |
| Coefficiente respiratorio   | $0.57 \pm 0.04$        | $0.76 \pm 0.05$               |
| Tasa de degradación de MTBE (mg<br>mgprot <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) | $0.08 \pm 0.04$        | $0.0124 \pm 0.04$             |

Coefficiente respiratorio (C. R.) = moles CO<sub>2</sub>/ moles O<sub>2</sub>

*Tabla 6.9. Comportamiento de las principales variables de los microcosmos en medio mineral y en sistema de emulsión múltiple en ausencia de MTBE*

|                                | Control negativo MM | Control negativo EM |
|--------------------------------|---------------------|---------------------|
| O <sub>2</sub> consumido (mg)  | $0.50 \pm 0.13$     | $3.37 \pm 0.02$     |
| CO <sub>2</sub> producido (mg) | $0.14 \pm 0.00034$  | $4.45 \pm 0.09$     |
| Coefficiente respiratorio      | $0.16 \pm 0.004$    | $0.81 \pm 0.04$     |

La capacidad de formular emulsiones múltiples donde estén entrampados microorganismos, es la clave para poder tener aplicaciones de biorremediación a mayor escala. Los presentes resultados establecen el papel que desempeñan los parámetros operacionales más importantes de un proceso de emulsificación  $W_1/O/W_2$  para el entrampamiento de microorganismos. El método aquí utilizado y propuesto es simple, además, ya que las emulsiones pueden ser producidas en equipos a mayores escalas, este proceso podría tener potencial para aplicaciones en campo. Por otra parte, los materiales utilizados en la emulsión múltiple, pueden ser recuperados y reusados, disminuyendo los costos operacionales, si se aprovecha la inminente inestabilidad de la emulsión separando los compuestos de la emulsión del agua (fase acuosa externa) descontaminada, después del proceso de biodegradación.

#### 6.4.3. Pruebas de consumo y de competencia de los componentes de la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ en los microcosmos.

Se realizaron experimentos en microcosmos para observar el comportamiento del consorcio microbiano con cada uno de los materiales de la emulsión múltiple con respecto a la producción de  $CO_2$ . La primera prueba fue la de consumo, donde se colocó en cada microcosmos 10 mL de medio mineral, el consorcio microbiano y cada uno de los compuestos de la emulsión (Tabla 6.10), con la finalidad de observar que compuesto era degradado por el consorcio microbiano. Se compararon los resultados contra dos blancos, uno con MTBE (+) y otro sin MTBE (-).

*Tabla 6.10. Contenido en microcosmos para la prueba de consumo de compuestos de emulsión.*

| <i>Microcosmos</i>      | MTBE ( $\mu$ L) | % compuesto |
|-------------------------|-----------------|-------------|
| Control +               | 2               | --          |
| Control -               | 0               | --          |
| Span 80                 | 0               | 0.2         |
| Polímero Sintético (PS) | 0               | 0.1         |
| Goma de Mezquite (GM)   | 0               | 0.2         |
| Aceite Mineral (AM)     | 0               | 0.2         |

La segunda prueba fue de inhibición de consumo de MTBE por la presencia de los compuestos de la emulsión múltiple, donde se colocó en cada microcosmos 10 mL de medio mineral, el consorcio microbiano y cada uno de los compuestos de la emulsión (Tabla 6.11), además, 2  $\mu$ L de MTBE, con la finalidad de observar que compuesto inhibía la degradación de MTBE por el consorcio microbiano. Se compararon los resultados contra dos blancos, uno con MTBE (+) y otro sin MTBE (-).

*Tabla 6.11. Contenido en microcosmos para la prueba de inhibición de consumo de MTBE por compuestos de emulsión.*

| <i>Microcosmos</i>      | MTBE ( $\mu$ L) | % compuesto |
|-------------------------|-----------------|-------------|
| Control +               | 2               | --          |
| Control -               | 0               | --          |
| Span 80                 | 2               | 0.2         |
| Polímero Sintético (PS) | 2               | 0.1         |
| Goma de Mezquite (GM)   | 2               | 0.2         |
| Aceite Mineral (AM)     | 2               | 0.2         |

Los resultados en la prueba de consumo mostraron que el emulsificante lipofílico Span 80 es fácilmente biodegradado por el consorcio microbiano y fue utilizado como fuente de carbono, reflejándose en la producción de CO<sub>2</sub> que se aprecia en la figura 6.18. Por lo que respecta a la goma de mezquite y aceite mineral, también son biodegradados por el consorcio microbiano, aunque comparando con el Span 80, son más difícilmente asimilables, por la compleja estructura que presentan. En contraste, con el polímero sintético no se observó producción de CO<sub>2</sub>, esto quiere decir que no es asimilable por el consorcio microbiano.

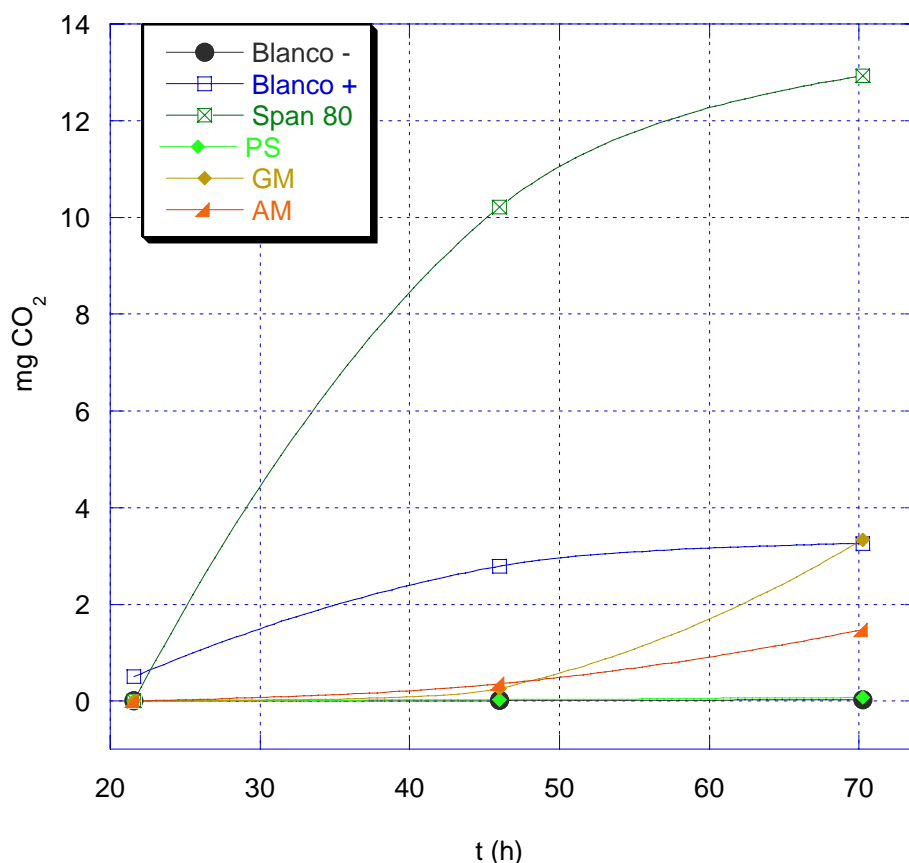


Fig. 6.18. Prueba de consumo de los compuestos de la emulsión múltiple por el consorcio microbiano en microcosmos.

Los resultados en la prueba de competencia de consumo de MTBE con los compuestos de la emulsión no mostraron cambio en el consumo de Span 80 por el consorcio microbiano, esto puede deberse a que prefiere consumir el Span 80 que el MTBE, ya que no se observa un incremento en la producción de CO<sub>2</sub> cuando hay presencia de MTBE, inhibiendo el consumo de este último. Por otra parte, se puede advertir en la goma de mezquite y aceite mineral, que la presencia de MTBE promueve su consumo, que, inicialmente en la prueba de consumo no se apreció un consumo significativo, y, con MTBE, incrementa la producción de CO<sub>2</sub>, contribuyendo probablemente a un cometabolismo de estos compuestos. Por lo tanto, en la formulación de la emulsión podemos señalar que el Span 80 y el aceite mineral son consumidos por el consorcio microbiano. Por último, con el polímero sintético y MTBE, se observa una producción de CO<sub>2</sub>, que se sugiere que sea debido a la presencia de MTBE, debido a que cuando no se encuentre este último, como se pudo observar en la prueba de

consumo, no se degrada el polímero sintético, no obstante, si comparamos este resultado con el blanco +, se puede apreciar que la producción de  $\text{CO}_2$ , es menor, esto puede explicarse por la probable inhibición de consumo de MTBE en presencia de polímero sintético (Fig. 6.19).

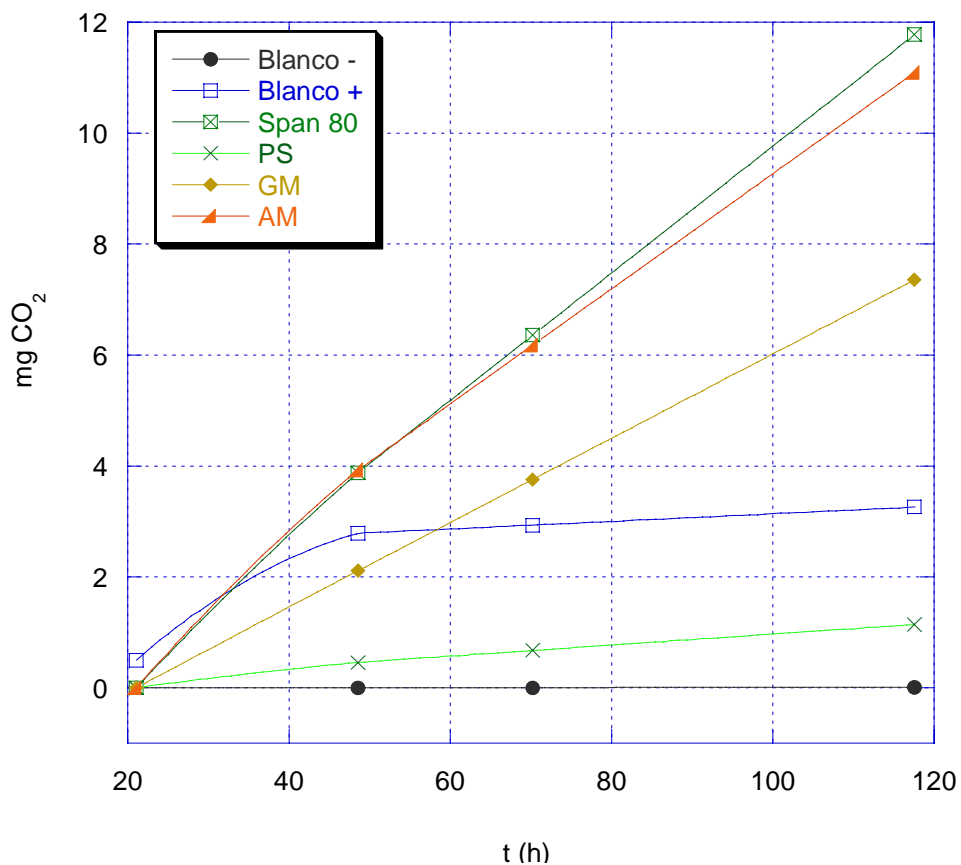


Fig. 6.19. Prueba de inhibición de los compuestos de la emulsión múltiple por el consorcio microbiano en microcosmos.

## Capítulo 7

# CONCLUSIONES

## 7.1 Conclusiones

El desarrollo de una emulsión múltiple cinéticamente estable para encapsular un consorcio microbiano degradador de MTBE pudo obtenerse por medio de los cambios en las condiciones de emulsificación y la elección adecuada de los materiales.

Los resultados indicaron que el diámetro medio del glóbulo varía en función del tipo y concentración del emulsificante y la fracción de la fase dispersa, más no varía con la presencia del consorcio entrampado en la emulsión primaria  $W_1/O$ .

Las condiciones de estabilidad de la emulsión  $W_1/O$  compuesta por medio mineral, aceite mineral y Span 80, fueron: [Span 80] = 8%,  $\phi = 0.3$ ,  $t = 10$  min, vel. de agitación: 8000rpm.

La GM (10%) y el PS (0.2%) formaron una emulsión  $W_1/O/W_2$  estable en ausencia de MTBE. La adición de MTBE en las emulsiones múltiples estables obtenidas, ocasionó un rompimiento en la emulsión formulada con GM, y en la formulación con PS no hubo efecto en la estabilidad, por lo que se eligió esta última.

La presencia del consorcio microbiano en la emulsión múltiple  $W_1/O/W_2$  no afectó significativamente la estabilidad de la emulsión.

El consorcio microbiano entrampado en la emulsión múltiple  $W_1/O/W_2$  fue capaz de degradar  $60.7 \pm 5.1\%$  de MTBE con una velocidad máxima de consumo de  $0.012 \pm 0.04$   $\text{mg}_{\text{MTBE}}/\text{mg}_{\text{prot}} \text{ hr}$ . Se encontró que en ausencia de MTBE, el consorcio microbiano entrampado en la emulsión  $W_1/O/W_2$  produjo  $\text{CO}_2$ , las pruebas mostraron que consumió el Span 80.

El MTBE no se agotó probablemente a que algunos materiales utilizados son biodegradables y el consorcio microbiano lo tomó como fuente de carbono alterna, lo que impidió la degradación total del MTBE.

Finalmente, el estudio realizado en esta tesis contribuyó a la revelación de la aplicación de las emulsiones múltiples para el entrampamiento de un consorcio microbiano viable en esas condiciones y que conserva la actividad de degradación del MTBE.

## 7.2 Recomendaciones

Explorar el uso de diferentes emulsificantes lipofílicos que no interfieran con el consumo del MTBE para aumentar la eficiencia de degradación por el consorcio microbiano.

Establecer el tiempo en que las fases de la emulsión múltiple se separan y determinar si es posible la recuperación y el reuso de los materiales en la emulsión.



## Capítulo 8

# BIBLIOGRAFÍA

- Adhikari, K., Mustapha, A., Grün, I. U. y Fernando L. 2000. Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. *Journal Dairy Science*. 83, 1946-1951.
- Allouche, J., Tyrode, E., Sadtler, V., Choplin, L. y Salager, J. 2003. Single and two step emulsification to prepare a persistent multiple emulsion with a surfactant – polymer mixture. *Ind. Eng. Chem. Res.* 42:3982-3988.
- Audet, P. y Lacroix, C. 1989. Two-phase dispersion process for the production of biopolymer gel beads: effect of various parameters on bead size and their distribution. *Process Biochem.* 12:217-226.
- Balázs, J., Erős, I., Tacsí, M., Péter, I. 1988. Drug-containing multiple emulsions. *Act Phys. Chem. (Szeged)* 34:121-133.
- Barreto, R. D., Gray, K. A. y Anders, K. 1995. Photocatalytic degradation of Methyl-Tert-Butyl Ether in TiO<sub>2</sub> slurriers: a proposed reaction scheme. *Water Research*. 28 (5):1243-1248.
- Bergenthal, G. 1997. Physicochemical aspects of emulsifier functionality. En: *Food Emulsifiers and Their Applications*, Hasenhuettl, G. L. y Hartel, R. W. (Eds.), Chapman and Hall, New York, chap. 6. pp. 147-172.
- Beristain, C. I., Azuara, E., y Vernon-Carter, E. J. 2002. Effect of water activity on the stability to oxidation of spray-dried encapsulated orange peel oil using mesquite gum (*Prosopis juliflora*) as wall material. *Journal of Food Science*. 67: 206-211.
- Bradley, P. M., Landmeyer, J. M. y Chapelle, F. H. 1999. Aerobic mineralization of MTBE and ter-butyl alcohol by Stream-Bed sediment microorganisms. *Environ. Sci. Technol.* 33:1877-1879.
- Bradley, P. M., Landmeyer, J. M. y Chapelle, F. H. 2001. Widespread potential for microbial MTBE degradation in surface-water sediments. *Environ. Sci. Technol.* 35:658-662.
- Budavari, S., editor; Maryadele, J. O. Neil, associate editor; Ann Smith, assistant editor; Heckelman, P. E., editorial assistant. 1989. *The Merck Index an encyclopedia of Chemicals, drugs and biological*. 11<sup>a</sup> ed. Merck & Co. Inc. USA.
- Butillo, J. V., Pulido, A. D., Reese, N. M. y Lowe, M. A. 1994. Removal efficiency of MtBE in water: confirmation of a predictive model through applied technology. Proceedings of API/NGWA Petroleum Hydrocarbons and Organic Chemicals in Groudwater: Prevention, Detection, and Remediation. 91-105, November 2-4. Houston, Texas.
- Cahn, R. P., Li, N. N. y Minday, R. M. 1978. Removal of ammonium sulfide from wastewater by liquid membrane process. *Environmental Science and Technology*. 12 (9):1051-1058.

- Cassidy, M. B., Shaw, K. W., Lee, H., Trevors, J. T. 1997. Enhanced mineralization of pentachlorophenol by  $\kappa$ -carrageenan-encapsulated *Pseudomonas* sp. UG30. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47:108-113.
- Charcosset, C., Limayem, I. y Fessi, H. 2004. The membrane emulsification process –a review-. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79:209-218.
- Cherry, P. 1996. Alisto Engineering, ACS Orange County Chapter. Committee on MtBE, September 17. Cal. State Fullerton.
- Cobb, R. M. K. 1946. *Emulsion Technology*. H. Bennett, ed. Chemical Pub. Co., New York. pp. 7-32.
- Csóka, I. y Erős, I. 1997. Stability of multiple emulsions I. Determination of factors influencing multiple drop breakdown. *Intern. J. of Pharm.* 156:119-123.
- Damodaran, S. 1989. Interrelationship of molecular and functional properties of food proteins. In *Food Proteins*. Kinsella, J. E. y Soucie, W. G. (Eds.) American Chemical Society, Champaign, IL., chap. 3.
- Damodaran, S. 1996. Amino acids, peptides and proteins. En: *Food Chemistry*. 3rd ed. Fennema, O. R. (Ed.), Marcel Dekker, New York. pp. 321.
- Davidson, J. A. 1997. MtBE Fate and transport –the latest data. Workshop on fate, transport and remediation of MtBE – 7<sup>th</sup> Annual West Coast Conference on Contaminated Soils and Groundwater, March 10-13, 1997, Mandalay Bay Resort, Oxnard, CA.
- Davidson, J. A. y Parsons. 1996. Remediating MtBE with current and emerging technologies. Proceedings of the API/NGWA 1996 Petroleum Hydrocarbons and Organical Chemicals in Groundwater: Prevention, Detection, and Remediation. Houston, Texas.
- Deeb, R. A., Hu, H. Y., Hanson, J. R., Show, K. M. y Álvarez-Cohen, L. 2001. Substrate interactions in BTEX and MTBE mixtures by an MTBE-degrading isolate. *Environ. Sci. Technol.* 35:312-317.
- Devanny, J.S., Deshusses, M.A., Webster, T.S. 1999. Biofiltration for air pollution control. CRC Lewis Publishers, E.U.A. pp. 300.
- Diario Oficial de la Federación, 2 de Diciembre de 1994. México.
- Díaz, M. N., Alfaro, B. J. y Garza, U. H. 2001. Método analítico para detectar hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua potable. *Ciencia UANL.* 4 (4):420-425.

- Dickinson, E. 1988. The role of hydrocolloids in stabilizing particulate dispersions and emulsions. En: G. O. Phillips, D. J. Wedlock & P. A. Williams (Eds.). *Gums and stabilizers for the food industry*. Oxford, UK: IRL Press. 4:249-263.
- Dickinson, E. 1992. *Introduction to Food Colloids*, Oxford University Press, Oxford.
- Dickinson, E. 1993. Protein-polysaccharide interactions in food colloids. In E. Dickinson & P. Walstra, *Food colloids and polymers: stability and mechanical properties*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry. pp. 77-93.
- Dickinson, E. 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*. 17:25-39.
- Dickinson, E. y McClements, D. J. 1995. *Advances in Foods Colloids*. Chapman & Hall, London.
- Dickinson, E. y McClements, D.J. 1996. *Advances in Food Colloids*. Blackie Academic & Professional, Glasgow.
- Dowding, P. G., Goodwin, J. W. y Vincent, B. 2001. Production of porous suspension polymer beads with a narrow size distribution using a cross-flow membrane and a continuous tubular reactor. *Colloids Surf. A*. 180:301-309.
- Dusenbury, J. S. y Cannon, F. S. 1996. Advanced oxidant reactivity pertaining to granular activated carbon beds for air pollution control. *Carbon*. 34 (12):1577-1589.
- Erős, I., Balázs, J., Csóka, I., Mustafa, Sz. 1990. Investigation of the stability of drug containing multiple phase emulsions. *Act Phys. Chem. (Szeged)*. 36:16-26.
- Environment Canada. 1993. Priority Substances List – Methyl tertiary-Butyl Ether, Canadian Environmental Protection Act. Government of Canada. Health and Welfare Canada.
- Environmental Science and Technology. 1993. Bulletin. 27:210.
- Eweis, J. B., Chang, D. P., Schroeder, E. D., Scow, K. M., Morton, R. L., y Caballero, R. C.. 1997. Presented at the Air and Waste Management Association 90th Annual Meeting and Exhibition, Toronto, Ontario, Canada. AWMA, Washington, D.C.
- Eweis, J. B., Schroeder, E. D., Chang, D. P. Y., y Scow, K. M.. 1998. Biodegradation of MTBE in a pilot-scale biofilter. En: G. B. Wickramanayake and R. E. Hinchee (Ed.). *Natural attenuation: chlorinated and recalcitrant compounds*. Battelle Press, Columbus, Ohio. p. 341–346.

- Fayolle, F., Vandecasteele, J.-P. y Monot, F. 2001. Microbial degradation and fate in the environment of methyl tert-butyl ether and related fuel oxygenates. A mini review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:339-349.
- Fayolle, F., François, A., Garnier, L., Godefroy, D., Mathis, H., Piveteau, P. y Monot, F. 2003. Limitations in MTBE biodegradation. *Oil & Gas Science and Technology-Rev. IFP.* 58 (4):497-504.
- Fiorenza, S. y Rifai, H. S. 2003. Review of MTBE Biodegradation and bioremediation. *Bioremediation Journal.* 7 (1):1-35.
- Florence, A. T. y Whitehill, D. 1981. Some features of breakdown in water-in-oil-in-water multiple emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* 79, 243-256.
- Fortin, N. Y. y Deshusses, M. A. 1999. Treatment of methyl tert-butyl ether vapors in biotrickling filters. 1. Reactor startup. Steady-state performance, and culture characteristics. *Environ. Sci. Technol.* 33:2980-2986.
- Fortin, N. Y., Morales, M., Nakagawa, Y., Focht, D. D., Deshusses, M. A. 2001. Methyl tert-butyl ether (MTBE) degradation by a microbial consortium. *Environmental Microbiology.* 3 (6): 407-416.
- François, A., Mathis, H., Godefroy, D., Piveteau, P., Fayolle, F. y Monot, F. 2002. Biodegradation of methyl tert-butyl ether and other fuel oxygenates by a new strain, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2754-2762.
- François, A., Garnier, A., Mathis, H., Fayolle, F. y Monot, F. Roles of tert-butyl formate, tert-butyl alcohol and acetone in the regulation of methyl tert-butyl ether degradation by *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. Accepted for publication in *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
- Fredheim, G. E., y Christensen, B. E. 2003. Polyelectrolyte complexes: Interactions between lignosulfonate and chitosan. *Biomacromolecules.* 4: 232-239.
- Frenkel, M., Shwartz, R., Garti, N. 1983. Multiple emulsions I. Stability: inversion, apparent and weighed HLB. *J. Colloid Interface Sci.* 94:174-178.
- Garfías, F. J. 1993. "Notas de interés ambiental publicadas en el extranjero durante 1992". INE, SEDESOL.
- Garfías F. J. y Díaz, G. L. 2003. Gasolinas Oxigenadas, La experiencia mexicana. Fondo de Cultura Económica. México. Pp. 185.

- Garnier, P. M., Auria, R., Augur, C. y Revah, S. 1999. Cometabolic biodegradation of methyl *t*-butyl ether by *Pseudomonas aeruginosa* grown on pentane. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:498-503.
- Garti, N. 1997. Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications – review article-. *Lebensm Wiss u. Technol.* 30:222-235.
- Garti, N. y Aserín, A. 1996. *Microencapsulation, methods and industrial applications*. Simon Benita (Ed.), Marcel Dekker Inc. Nueva York.
- Garret, P., Marcel, M., y Lowry, J. D. 1986. MTBE as a Groundwater contaminant. Proceedings of API/NGWA 1986 Petroleum Hydrocarbons and Organic Chemicals in Groudwater: Prevention, Detection, and Remediation. Houston, Texas.
- Gehring, P. y Eschweiler, H. 1996. The use of radiation-induced advanced oxidation for water reclamation. *Water Science and Technology.* 34 (7-8): 343-349.
- Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Peniche, C., e Higuera-Ciapara, I. 2000. Chitin and chitosan. In G. Doxastakis y V. Kiosseoglou (Eds.), *Novel Macromolecules in Food Systems*. Amsterdam: Elsevier. Pp. 265-308
- Hanson J. R., Ackerman, C. E. y Scow, K. M. 1999. Biodegradation of Methyl *tert*-Butyl Ether by a Bacterial Pure Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (11): 4788–4792.
- Hardison, L. K., Curry, S. S., Ciuffetti, L. M., y Hyman, M. R. 1997. Metabolism of diethyl ether and cometabolism of methyl *tert*-butyl ether by a filamentous fungus, a *raphium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3059–3067.
- Hasenhuettl, G. L. 1997. Overview of food emulsifiers. En: *Food Emulsifiers and Their Applications*. Hasenhuettl, G. L. y Hartel, R. W., (Eds.). Chapman and Hall, New York.
- Hatate Y., Uemura, Y., Ijichi, K., Kato, Y., Hano, T., Baba, Y. y Kawano, Y. 1995. Preparation of GPC packed polymer vedas by a SPG membrane emulsifier. *J. Chem. Eng. Japan.* 28:656-659.
- Hatzinger, P. B., McClay, K., Vainberg, S., Tugusheva, M., Condee, C. W. y Steffan, R. J. 2001. Biodegradation of methyl- *tert*-butyl ether by a pure bacterial culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5601-5607.
- HEI. 1996. The Potential Health effects of oxygenates added to gasoline. A review of the current literature. A especial report of institute's oxygenation evaluation committee. (Health Effects Institute).
- <http://water.usgs.gov/gotita/earthgwdecline.html>. La ciencia del agua para escuelas. Flujo de agua subterránea/disminución. Consulta en internet (10/10/05)

- Hyman, M., Kwon, P., Williamson, K. y O'Reilly, K. 1998. Cometabolism of MTBE by alkane-utilizing microorganisms. En: *Natural Attenuation of MTBE*. Wickrimanayake, G.B. y R.E. Hinchee (Eds.). Battelle Press. Columbus Ohio. pp. 321-326.
- Instituto Mexicano del Petróleo. 1996. Informe a la Asamblea de Representantes del Distrito Federal. México.
- Kane, S. R., Beller, H. R., Legler, T. C. Koester, C. J., Pinkart, H. C., Halden, R. U. y Happel, A. M. 2001. Aerobic biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by aquifer bacteria from leaking underground storage tank sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5824-5829.
- Kenyon, M. M. 1995. Modified starch, maltodextrin, and corn syrups as wall materials for food encapsulation. En: S. G. Risch y G. A. Reineccius (Eds.). *Encapsulation and controlled release of food ingredients*. ACS symposium series 590, Washington DC: American Chemical Society. pp. 42-50.
- Kim, K. S., Chol, S. J. y Ihm, S. K. 1983. Simulation of phenol removal from wastewater by liquid membrane emulsion. *Eng. Chem. Fundam.* 22:167-172.
- Kitagawa, T., Nishikawa, Y., Frankenfeld, J. W. y Li, N. N. 1977. Wastewater treatment by liquid membrane process. *Environmental Science and Technology*. 11 (6): 602-605.
- Kiyoyama, S., Ueno, H., Shiomori, K. Kawano, Y. y Hatate, Y. 2001. Preparation of cross-linked microcapsules entrapping inorganic salt by in-situ polymerization in (W/O/W) emulsion system. *Journal of Chemical engineering of Japan*. 34 (1): 36-42.
- Knaebel, D. B., Stormo, K.E., Crawford, R. L. 1996. Immobilization of bacteria in macro- and microparticles. En: Sheehan D. (Ed.). *Bioremediation Protocols*. Humana Press., Inc., Totowa, New Jersey. pp.67-78.
- Kobayashi, I., Yasuno, M., Iwamoto, S., Shono, A., Satoh, K., y Nakajima, M. 2002. Microscopic observation of emulsion droplet formation from a polycarbonate membrane. *Colloids Surf A*. 207:185-196.
- Kolot, F. B. 1981. Microbial carriers-strategy for selection-Part 1. *Process Biochem.* 8 (9):2-9.
- Kuehl, R. O. 2001. Diseño de experimentos. Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. Thomson Learning. 2ª. Ed. México. p. 666.
- Lee S.-T., Rhee S. K., Lee G. M. 1994. Biodegradation of pyridine by freely suspended and immobilized *Pimelobacter* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41:652-657.
- Landmeyer, J. E., Chapelle, F. H., Herlong, H. H. y Bradley, P. M. 2001. Methyl *tert*-butyl ether biodegradation by indigenous aquifer microorganisms under natural and artificial oxic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 35:1118-1126.

- Leenen, E. J. T. M., Dos Santos, V. A. P., Grolle, K. C. F., Trmper, J., Wijffels, R. H. 1996. Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewater treatment. *Water Res.* 30:2985-2996.
- Li, N. N. 1968. U.S. Patent 3, 410, 794.
- Li, N. N., Cahn, R. P. y Shrier, A. L. 1973 U. S. Patent 3, 779, 907.
- Lin, T. J., Kurihara, H. y Ohta, H. 1975. Effects of phase inversion and surfactant location on the formation of O/W emulsions. *Japanese Society of Cosmetic Chemistry.* 26:121-139.
- Liu, C. Y., Speitel, G. E. Jr., y Georgiou G. 2001. Kinetics of methyl *t*-butyl ether cometabolism at low concentrations by pure cultures of butane-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2197-2201.
- López, A., Peña, I. G., Morales, M. y Revah, S. 2004. Caracterización cinética y propagación de consorcios microbianos capaces de degradar metil ter-butyl éter (MTBE). Comisión Nacional de Microbiología. México.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Missouri. J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. 1999. *Brock, Biología de los microorganismos.* 8ª edición revisada. Prentice Hall Iberia. España. Pp. 1064.
- Manavella, C. H. y Venencio, M. 1995. Influencia de los sedimentos pampeanos en la obra de recarga artificial de acuífero en la ciudad de Sunchales, Provincia de Santa Fe. Memorias del 2º Simposio Sobre Aguas Subterráneas y Perforación de Pozos en el Paraguay. Paraguay. Pp. 137-148.
- Matsumoto, S. 1987. W/O/W-type emulsions in non-ionic surfactants, science series. En: Schick, M. J. (Ed.), *Nonionic Surfactants: Physical Chemistry.* Marcel Dekker. 23:549-600.
- Matsumoto, S., Koh, J., Michura, A. 1985. Preparation of W/O/W emulsions in edible form on the basis of phase inversion technique. *J. Dispos. Sci. Technol.* 6:507-521.
- Mayers, R. A. 1986. *Handbook of Petroleum Refining Processes.* Mc Graw Hill Book Co.
- McClements, D. J. 1999. *Food emulsions. Principles, practice, and techniques.* CRC Press. USA. pp. 378.
- McLoughlin, A. J. 1994. Controlled release of immobilized cells as a strategy to regulate ecological competence of inoculate. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 51:1-45.



- Mo, K., Lora C. O., Wanken, A. E., y Kulpa, C. F. 1995. Biodegradation of methyl *t*-butyl ether by pure bacterial cultures. Abstract, 95<sup>th</sup> ASM General Meeting. 95: 408.
- Mo, K., Lora, C. O., Wanken, A. E., Javanmardian, M., Yang, X. y Kulpa, C. F. 1997. Biodegradation of methyl *t*-butyl ether by pure bacterial cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47:69–72.
- Moller, H. y Harbin, E. 1990. Solubility and degradability of the gasolina additive MtBE and gasolina compounds in water. p. 445-448. En: F. Arendt, M. Hinsenveld y van den Brink W. J. (ed.), *Contaminated Soil*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Montgomery W. 1996. Treatment of alternatives for MtBE in groundwater. *Applied Research Department technology transfer note # 11*, September.
- Morales, M., Revah, S., Auria, R. 1998. Start up and gaseous ammonia addition on a biofilter for elimination of toluene vapors. *Biotechnol. Bioeng.* 60(4): 483-491.
- Morgenroth, E., Schroeder, E.D., Chang, D.P.Y., Scow, K.M. 1996. Nutrient limitation in a compost biofilter degrading hexane. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 46: 300-308.
- Mormile, M. R., Liu, S. y Suflita, J. M. 1994. Anaerobic biodegradation of gasoline oxygenates: Extrapolation of information to multiple sites and redox conditions. *Environmental Science and Technology.* 28
- Moslemy P., Guiot, S. R., Neufeld, R. J. 2002. Production of size-controlled gellan gum microbeads encapsulating gasoline-degrading bacteria. *Enzyme and microbial Technology.* 30:10-18.
- Mulley, B. A. y Marland, J. S. 1970. Multiple-drop formation in emulsions. *Journal of Pharmaceutics and Pharmacology.* 22: 243-245.
- Myers, D. 1991. Surfaces, Interfaces, and Colloids. Principles and applications. New York: VCH Publishers, Inc. pp. 246-249.
- Nagashima, S., Ando, S., Makino, K., Tsukamoto, T. y Ohshima, H. 1998a. Size dependence of polymer composition in the surface layer of poly(acrylamide-co-acrylic acid) hydrogel microspheres. *J. Colloid Interface Sci.* 197:377-382.
- Nagashima, S., Ando, S., Tsukamoto, T., Ohshima, H. y Makino, K. 1998b. Preparation of monodisperse poly (acrylamide-co-acrylic acid) hydrogel microspheres by a membrane emulsification technique and their size-dependent surface properties. *Colloid Surf. B.* 11:47-56.

- Nagashima, S., Koide, M., Ando, S., Makino, K., Tsukamoto, T. y Ohshima, H. 1999. Surface properties of monodisperses poly(acrylamide-co-acrylic acid) hydrogel microspheres prepared by a membrane emulsification technique. *Colloid Surf. A*. 153:221-227.
- NCSS 2000 y PASS 2000. 2001. Paquete estadístico. Copyright © by Jerry Hintze. E.U.A. All Rights Reserved.
- Nilsson, K., Birnmaum, S., Flygare, S., Linse, L., Schröder, U., Jeppsson, U., Larsson, P.-O., Mosbach, K., Brodelius, P.1983. A general method for the immobilization of cells with preserved viability. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17:319-326.
- Noveon Inc. 2001. The speciality chemicals innovation. Pemulen ® Copyright. Cleveland, Ohio. <http://www.personalcare.noveoninc.com/literature/Foreign/cp27.pdf>. Consulta en Internet (06/01/05)
- Odencrantz, J. y González, J. M. 1997. Consecuencias del MTBE para la remediación de sitios con tanques de gasolina subterráneos. *Tri-S Environmental Inc.* Pp. 1-11.
- Omi S., Katami, K., Taguchi, T., Kaneko, K. e Iso, M. 1995. Synthesis of uniform PMMA microspheres employing modified SPG (Shirasu Porous Glass) emulsification technique. *J. Appl. Polym. Sci.* 57:1013-1024.
- Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Ponce-Alquicira, E., y Vernon-Carter, E. J. 2003. Mesquite gum: fractionation and characterization of the gum exuded from *Prosopis laevigata* obtained from plant tissue culture and wild trees. *Carbohydrate Polymers.* 54:323-327.
- Owen, K., y Coley, T. 1995. *Automotive Fuels Reference Book*. 2ª Edition. SAE.
- Park, K. y Cowan, R. M. 1997. Effects of oxygen and temperature on the biodegradation of MTBE. In: *Preprints of extended abstracts, ACS National Meeting. Am Chem. Soc., Div. Environ. Chem.* Washington D.C. 37:421-424.
- Pérez-Alonso, C., Báez-González J. G., Beristain, C. I., Vernon-Carter, E. J., y Vizcarra-Mendoza, M. G. 2003. Estimation of activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules. *Food Carbohydrates.* 53, 197-203.
- Pérez-Orozco, J. P., Beristain, C. I., Espinosa-Paredes, G., Lobato-Calleros, C., y Vernon-Carter, E. J. 2004. Interfacial shear rheology of interacting carbohydrate polyelectrolytes at the water-oil interface using an adapted conventional rheometer. *Carbohydrate Polymers.* 57(1):45-54.
- Petróleos Mexicanos. 1996. Memoria de Labores México. p. 60.

- Plashchina, I. G., Mrachkovskaya, T. A., Danilenko, A. N., Kozhevnikov, G. O., Starodubrovskaya, N., Yu, Braudo, E. E. y Schwenke, K. D. 2001. Complex formation of faba bean legumin with chitosan: surface activity and emulsion properties complexes. En: E. Dickinson, y R. Miller (Eds.). *Food colloid fundamentals of formulations*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. pp. 293-302.
- Raghuraman, B. J., Tirmizi, N. P. y Wiencek, J. M. 1994. Emulsion liquid membranes for wastewater treatment: Equilibrium models for some typical metal-extract systems. *Environ. Sci. Technol.* 28 :1090-1098.
- Raghuraman, B. J., Tirmizi, N. P., Kim, B. S. y Wiencek, J. M. 1995. Emulsion liquid membrane for wastewater treatment: equilibrium models for lead- and cadmium-di-2-ethylhexyl phosphoric acid systems. *Environ. Scwi. Technol.* 29: 979-984.
- Renard, D., Boué, F., y Lefebvre, J. 1997. Protein-polysaccharide mixtures: structure and effect of shear studied by small-angle neutron scattering. En: E. Dickinson, y B. Bergenståhl (Eds.). *Food colloids: proteins, lipids and polysaccharides*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. pp.305-315.
- Rodríguez-Huezo, M. E., Pedroza-Islas, R., Prado-Barragán, L. A., Beristain, C. I. y Vernon-Carter, E. J. 2004. Microencapsulation by spray-drying of multiple emulsions containing carotenoids. *J. Food Sci.* 69:E351-E359.
- Ruiz-Ramos, J.O., J.P. Pérez-Orozco, E. Bosquez-Molina y E.J. Vernon-Carter. 2004. Interacciones goma de mesquite-quitosano y fase dispersa en emulsiones aceite-en-agua y su efecto en la permeabilidad de las películas. XXV Encuentro Nacional AMIDIQ. Resúmenes (ALI-21). 4-7 Mayo. Puerto Vallarta, México.
- Salager, J. L. 2002. Surfactantes. Cuaderno FIRP 300 A. Versión # 2. Laboratorio FIRP. Escuela de Ingeniería Química, Universidad De Los Andes Mérida 5101 Venezuela.
- Salager, J. L y Fernández, A. 2004. Surfactantes Catiónicos y otros. Cuaderno FIRP N° 304PP. Laboratorio FIRP, Escuela de Ingeniería Química, Universidad De Los Andes, Mérida 5101 Venezuela.
- Salanitro, J. P. 1995. Understanding the limitations of microbial metabolism of ethers used as fuel octane enhancers. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:337-340.
- Salanitro, J. P., Diaz, L. A., Williams, M. P., y Wisniewski, H. L. 1994. Isolation of a bacterial culture that degrade methyl *t*-butyl ether. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2593–2596.
- Schmitt, C., Sánchez, C., Despond, S., Renard, D., Robert, P., y Hardy, J. 2001. Structural modification of  $\beta$ -lactoglobulin as induced by complex coacervation with Acacia gum. En: E. Dickinson, B. Dickinson, y B. Bergenståhl (Eds.). *Food colloids: proteins, lipids and polysaccharides*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. pp. 323-331.

- Schröder, V. y Schubert, H. 1999. Influence of emulsifier and pore size on membrane emulsification. *Spec. Publ-R Soc. Chem.* 227:70-80.
- Shahidi, F., Anchchi, J.K. y Jeon, Y-J. 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Food Science and Technology* 10:37-51.
- Sherman, P. 1968. *Emulsion Science*. Pergamon Press, London. Pp. 332-334.
- Shinoda, K. y Kunieda, H. 1983. Phase properties of emulsions: PIT and HLB. In: Becher, P. (Ed.) *Encyclopedia of Emulsion Technology*. New York: Marcel Dekker. 1:337-366.
- Sholmo, M., Moshe, F., Garti, N. y Rodney, K. 1984. Multiple emulsions II: HLB shift caused by emulsifier migration to external interface. *Journal of Colloid and Interface Science* 97, 374-379.
- Sikdar, S. K., Bier, M. y Todd, P. (Eds.). 1990. *Strategies to minimize fouling in the membrane processing of biofluids*. Proceedings of frontiers in biochemistry II. Boulder, CO. Published by ACS, Washington D. C.
- Smit, E., Lee, H., Trevors, J. T. y van Elsas, J. D. 1996. Interaction between a genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* and bacteriophage  $\phi$ R2 $\phi$  in soil: effect of nutrients, alginate encapsulation, and the wheat rhizosphere. *Microb. Ecol.* 31:125-140.
- Sosa-Fragoso, J. 2004. Desarrollo de emulsiones múltiples W/O/W estables conteniendo colorantes hidro y lipo dispersables como precursores de microencapsulados. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa. México.
- Steffan, R. J., McClay, K., Vainberg, S., Condee, C. W. y Zhang, D. 1997. Biodegradation of the gasoline oxygenates methyl *tert*-butyl ether, ethyl *tert*-butyl ether, and *tert*-amyl methyl ether by propane-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4216-4222.
- Steffan, R. J., Vainberg, S., Condee, C. W., McClay, K. y Hatzinger, P. B. 2000. Biotreatment of MTBE with a new bacterial isolate. In: Wickramanayake, G. B. Gavaskar A. R., Alleman B. C. y Magar V. S. (Eds.). *Biorremediation and phytoremediation of chlorinated and recalcitrant compounds*, Batelle, Columbus, Ohio. pp. 165-173.
- Stocking, A. J., Deeb, R. A., Flores, A. E., Stringfellow, W., Talley, J., Brownell, R., Kavanaugh, C. 2000. Bioremediation of MTBE: a practical perspective. *Kluwer Academic Publishers.* 11:187-201.
- Sun, P. T., Salanitro, J. P. y Kilkenny, S. T. 1996. Fate and biokinetics of methyl *t*-butyl ether in activated sludge systems and its engineering significance. En: 51<sup>st</sup> Purdue Industrial Waste Conference Proceedings. Ann Arbor Press, Inc., Chelsea, MI. pp. 507-524.

- Tang, W. T. y Sun, P. T. 1997. Field evaluation of biological and non biological treatment technologies to remove MTBE/oxygenates from petroleum product terminal wastewaters. Shell Development Company, Houston TX. American Petroleum Institute, Washington, D.C. Publication number 4655.
- Teramoto, M., Takihana, H., Shibutani, M., Yuasa, T., Miyake, Y. y Teranishi, H. 1981. Extraction of amine by W/O/W emulsion system. *Journal of Chemical engineering of Japan*. 14 (2):122-128.
- Thevenet, F. 1995. Acacia gums: Natural encapsulation agent for food ingredients. En: S. G. Risch y G. A. Reineccius (Eds.). *Encapsulation and controlled release of food ingredients*. ACS symposium series 590, Washington DC: American Chemical Society. pp. 51-59.
- Trevors, J. T., van Elsas, J. D., Lee, H. y van Overbeek, L. S. 1992. Use of alginate and other carriers for encapsulation of microbial cells for use in soil. *Microb Releases*. 1:61-69.
- Trevors, J. T., van Elsas, J. D., Lee, H. y Wolters, A. C. 1993. Survival of alginate-encapsulated *Pseudomonas fluorescens* cells in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:637-643.
- USEPA. 1993. Assessment of potential health risks of gasoline oxygenated with methyl tertiary butyl ether (MtBE). Office of Research and Development EPA/600/R-93/206, November 1993. Washington D.C. U.S.A.
- USEPA. 1996. Review of Health Advisory for MtBE. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C. U.S.A.
- USEPA. 1999. Achieving Clean Air and Clean Water: the Report of the Blue Ribbon Panel on Oxygenates in Gasoline. US Government Printing Office. EPA/420/R-99/021. Washington D.C. U.S.A.
- Vernon-Carter, E. J., Beristain, C.I. y Pedroza-Islas, R. 2000. Mesquite gum (*Prosopis gum*) En: G. Doxastakis, y V. Kiosseoglou (Eds.). *Novel Macromolecules in Food Systems*. Amsterdam: Elsevier. pp. 217-238.
- Vernon-Carter, E. J., Pedroza-Islas, R. y Beristain, C. I. 1998. Stability of capsicum annum oleoresin-in-water emulsions containing *Prosopis* and *Acacia* gums. *Journal of Texture Studies*. 29:553-567.
- Vernon-Carter, E. J. y Sherman, P. 1981. Rheological properties and applications of mesquite tree (*Prosopis juliflora*). Gum I. Rheological properties of aqueous mesquite gum solutions. *J. Texture studies*. 11:339-349.

- Villagómez-Zavala, D.L. 1992. Evaluación de la formación, propiedades y estabilidad de emulsiones múltiples incorporando polímeros naturales como emulsificantes. Tesis de Maestría. Universidad Iberoamericana.
- Vladislavljević, G. T. y Schubert, H. 2002. Preparation and analysis of oil-in-water emulsions with a narrow droplet size distribution using Shirasu-porous-glass (SPG) membranes. *Desalination*. 144:167-172.
- Weir S. C., Dupuis, S. P., Providenti, M. A. Lee, H., Trevors, J. T. 1995. Nutrient-enhanced survival of and phenanthrene mineralization by alginate-encapsulated and free *Pseudomonas* sp. UG14Lr cells in creosote-contaminated soil slurries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:946-951.
- Wen, L. y Papadopoulos, K.D. 2001. Effects of osmotic pressure on water transport in  $W_1/O/W_2$  emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 235:398-404.
- White, G. F., Russel, N. y Tidswell, E. 1996. Bacterial scission of ether bonds. *Microbiol. Rev.* 60:216-232.
- Yeh, C. K. y Novak, J. T. 1991. Anaerobic biodegradation of oxygenates in the subsurface. Proceedings API/NGWA Petroleum Hydrocarbons and Organic Compounds in Groudwater: Prevention, Detection, and Remediation. Houston Texas.

Capítulo 9

ANEXOS

## Anexo 1. Índice de Refracción

Se realizó este experimento con la intención de verificar la solubilidad del MTBE en los diferentes compuestos que constituyen a la emulsión primaria. Al medir el índice de refracción del MTBE (98% pureza) se obtuvo un valor de 1.3695, de esta manera, al realizar soluciones con diferentes concentraciones de este compuesto, se pudo observar que el índice de refracción aumentó con la concentración de MTBE en agua y disminuyó en el aceite mineral al aumentar la concentración de MTBE; además, el surfactante en una concentración de 8%, no tiene efecto en el índice de refracción de aceite mineral con MTBE, advirtiéndose que no impide la solubilidad del MTBE en el aceite mineral (Fig. 9.1).

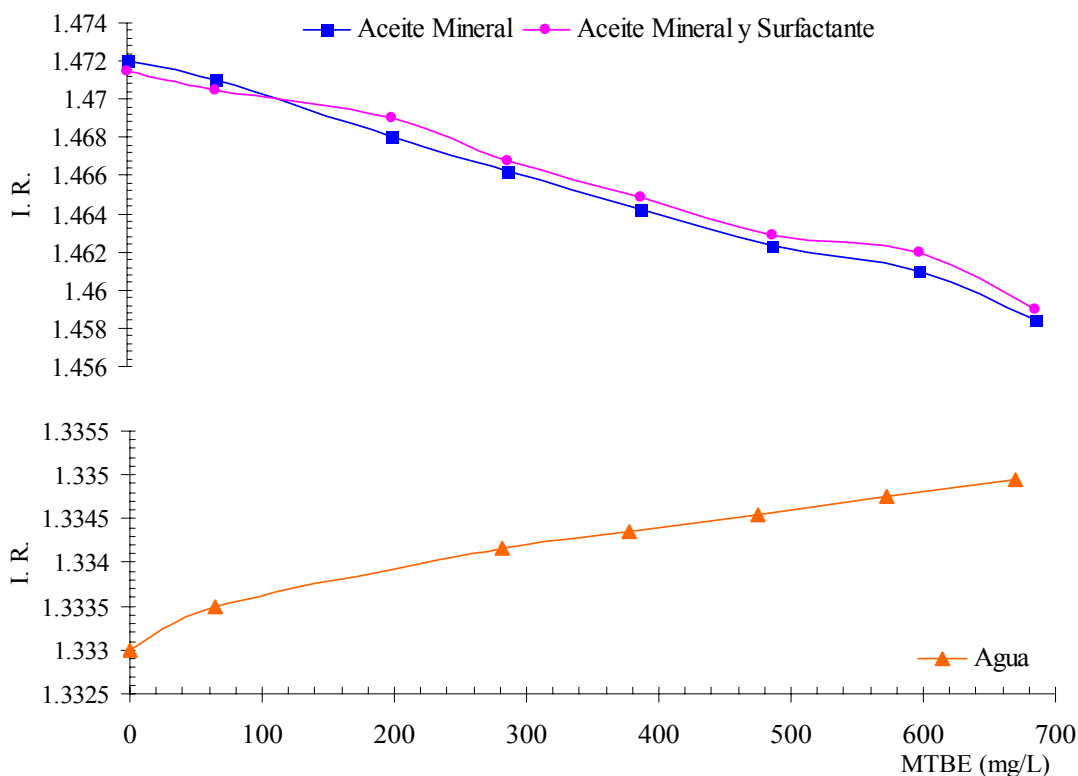


Fig. 9.1. Diferentes concentraciones de MTBE disuelto en agua, aceite mineral y aceite mineral con Span 80.



## Anexo 2. Determinación de Proteína por el método de Lowry

Se utilizaron las siguientes soluciones:

- NaOH 10 M
- Solución A: Diluir 20g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en 1L de NaOH 0.1N.
- Solución B: Diluir 1g de  $\text{CuSO}_4$ /100 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada
- Solución C: Diluir 2g de Tartrato de Na y K en 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.
- Seroalbúmina bovina: Disolver 0.03g de seroalbúmina en 100mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.
- Reactivo Folin-Ciocalteu (Hycel de México)

Se realizó la curva estándar con la solución de seroalbúmina bovina con diferentes diluciones (tabla 9.1).

*Tabla 9.1. Concentraciones para la realización de la curva estándar.*

| TUBO | Seroalbumina | $\text{H}_2\text{O}$ destilada (mL) | [mg/L] |
|------|--------------|-------------------------------------|--------|
| 0    | 0            | 1                                   | 0      |
| 1    | 0.2          | 0.8                                 | 60     |
| 2    | 0.4          | 0.6                                 | 120    |
| 3    | 0.6          | 0.4                                 | 180    |
| 4    | 0.8          | 0.2                                 | 240    |
| 5    | 1.0          | 0                                   | 300    |

Se colocó 1mL de la muestra en cada tubo, se adicionó 0.1 mL de NaOH 10N se agitó en un vórtex y se calentaron durante 30 min a una temperatura de  $90^\circ\text{C}$ . Se preparó una solución al momento, tomando 1mL de la solución B más 1 mL de la solución C y se aforó a 50 mL con la solución A. Se adicionaron 5 mL de esta solución a los tubos, se agitaron en vórtex y se dejaron reposar 30 min. en la obscuridad. Se colocó 1mL de reactivo de Folin a los tubos, se agitaron vigorosamente y se dejaron reposar en obscuridad por 2 hrs. Se midió la absorbancia a 750nm en un espectrofotómetro (Spectronic Genesis2).

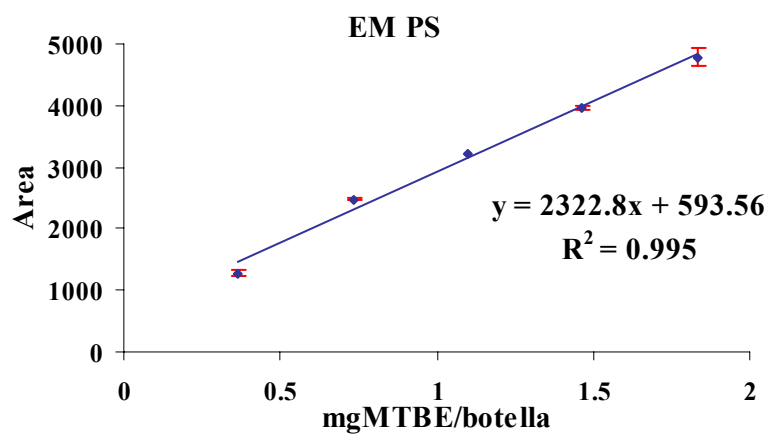
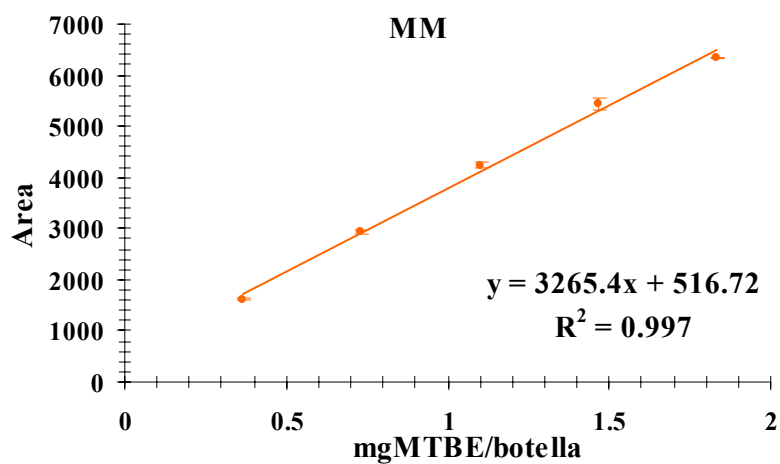
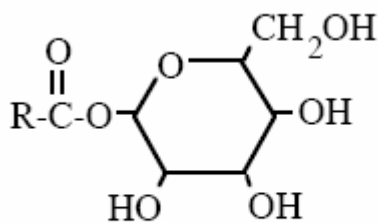
**Anexo 3. Curvas Patrón de MTBE en medio mineral y en emulsión múltiple con polímero sintético**

Fig. 9.2. Curvas patrón de diferentes concentraciones de MTBE en medio mineral y de emulsión múltiple (EM) con polímero sintético (PS)

Anexo 4. Estructuras químicas de algunos emulsificantes empleados en este trabajo.



Monoéster de sorbitan

Fig. 9.3. Monoéster de sorbitán -Span 20 o Span 80- (Salager, 2002)

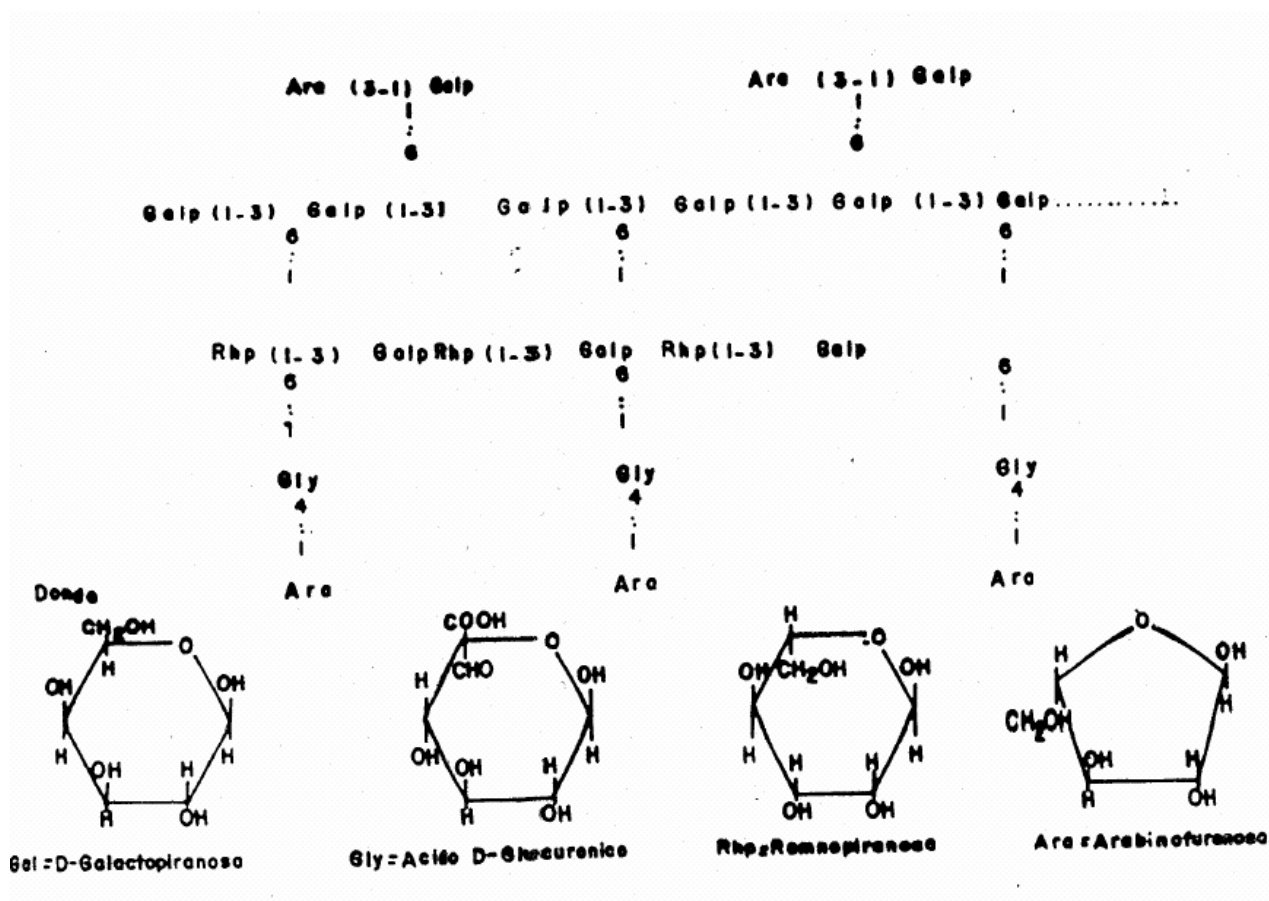


Fig. 9.4. Estructura de la goma de mezquite.

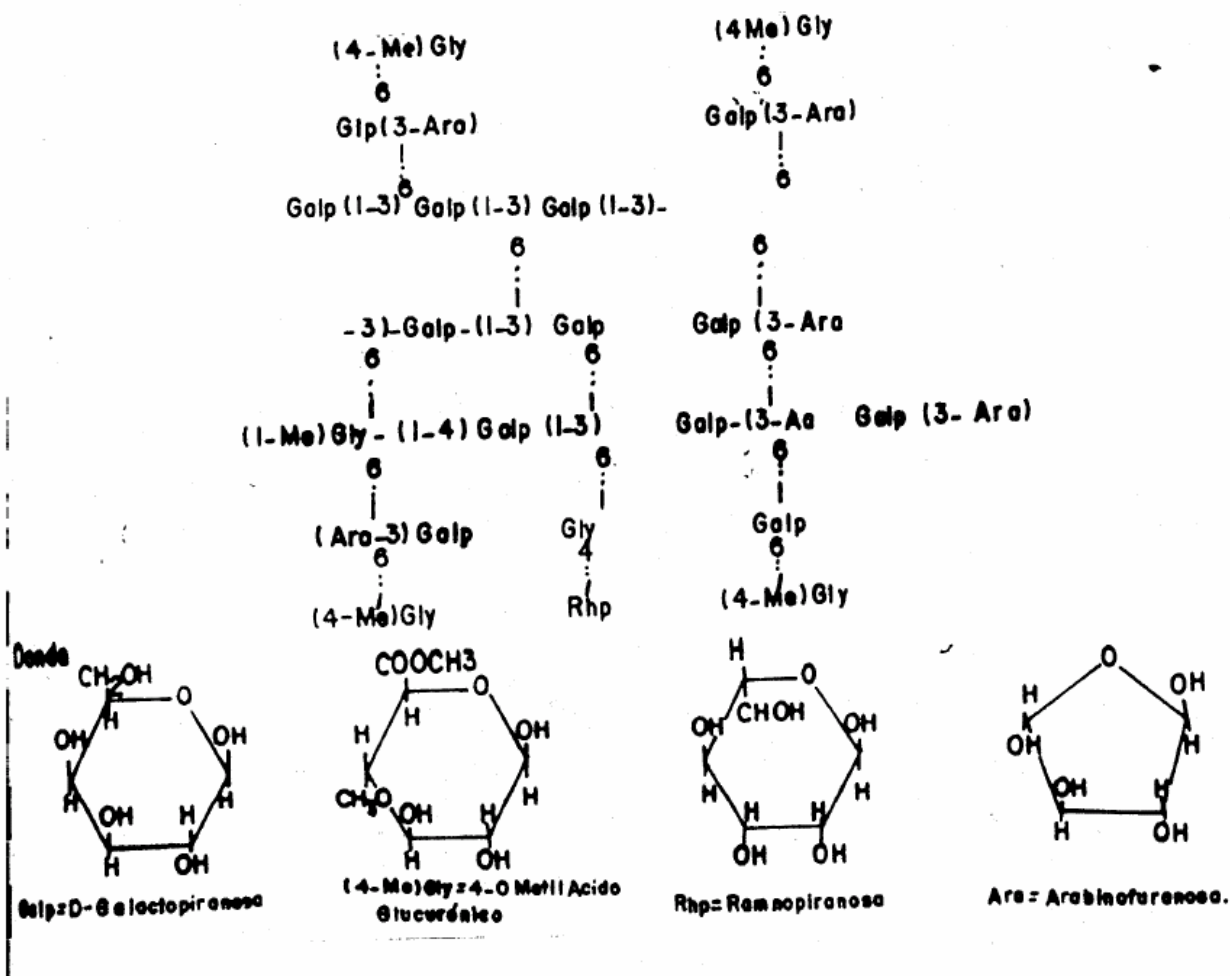


Fig. 9.5. Estructura de la goma arábica (Villagomez-Zavala, 1992).

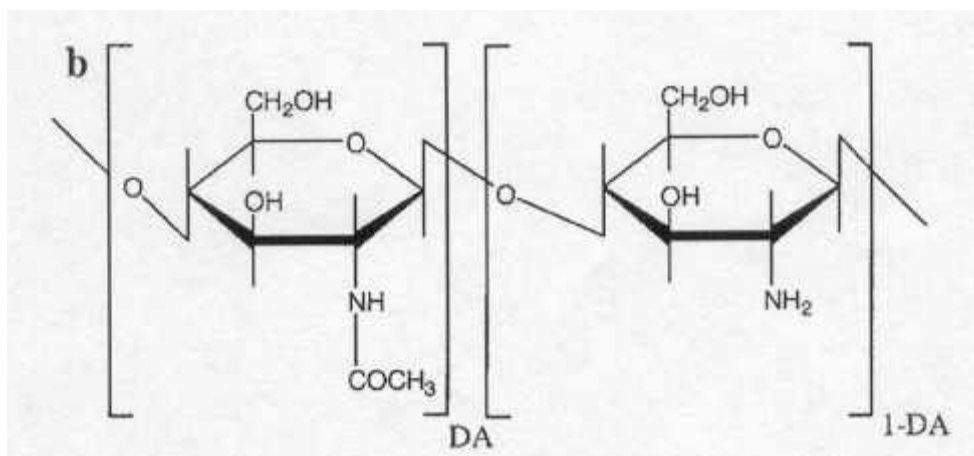


Figura 9.6. Estructura química del quitosano, donde DA es el grado de acetilación (Shahidi y col., 1999).

## Anexo 5. Análisis estadísticos.

En esta sección se presentan los análisis de varianza y las pruebas de comparaciones múltiples de Tukey obtenidos en los tratamientos, donde el tiempo fue bloqueado.

### 9.5.1 Análisis estadísticos para la concentración de Span 80 en la emulsión simple $W_1/O$ .

#### 9.5.1.1 Anova para la concentración de Span 80 en los diámetros de glóbulo ( $D_{3,2}$ ) en la emulsión simple $W_1/O$ .

##### Analysis of Variance Table

| Source<br>Term      | DF | Sum of<br>Squares | Mean<br>Square | F-Ratio | Prob<br>Level | Power  |
|---------------------|----|-------------------|----------------|---------|---------------|--------|
| <b>(Alpha=0.05)</b> |    |                   |                |         |               |        |
| A: Conc             | 7  | 19.92377          | 2.846253       | 7.86    | 0.000010*     | 0.9998 |
| B: tiempo           | 5  | 1.880386          | 0.3760772      |         |               |        |
| AB                  | 35 | 12.67194          | 0.3620554      |         |               |        |
| S                   | 0  | -9.886162E-16     |                |         |               |        |
| Total (Adjusted)    | 47 | 34.4761           |                |         |               |        |
| Total               | 48 |                   |                |         |               |        |

\* Term significant at alpha = 0.05

#### 9.5.1.2 Comparación múltiple para la concentración de Span 80 en los diámetros de glóbulo $D_{3,2}$ en la emulsión simple $W_1/O$ .

##### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: D\_3\_2

Term A: Conc

Alpha=0.050 Error Term=AB DF=35 MSE=0.3620554 Critical Value=4.555051

| Group | Count | Mean     | Different<br>From Groups |
|-------|-------|----------|--------------------------|
| 30    | 6     | 1.03563  | 4, 2, 1, 0.5             |
| 10    | 6     | 1.140981 | 1, 0.5                   |
| 16    | 6     | 1.677598 | 0.5                      |
| 8     | 6     | 1.744372 | 0.5                      |
| 4     | 6     | 2.221037 | 30                       |
| 2     | 6     | 2.258362 | 30                       |
| 1     | 6     | 2.584331 | 30, 10                   |
| 0.5   | 6     | 3.019331 | 30, 10, 16, 8            |

### 9.5.2 Análisis estadísticos para la $\phi$ en la emulsión simple $W_1/O$ .

#### 9.5.2.1 Anova para la $\phi$ en los diámetros de glóbulo ( $D_{3,2}$ ) en la emulsión simple $W_1/O$ .

##### Analysis of Variance Table

| Source<br>Term      | DF | Sum of<br>Squares | Mean<br>Square | F-Ratio | Prob<br>Level | Power  |
|---------------------|----|-------------------|----------------|---------|---------------|--------|
| <b>(Alpha=0.05)</b> |    |                   |                |         |               |        |
| A: $\phi$           | 3  | 0.3745222         | 0.124840       | 2.86    | 0.07215       | 0.5634 |
| B: tiempo           | 5  | 0.500912          | 0.1001824      |         |               |        |
| AB                  | 15 | 0.6553464         | 4.368976E-02   |         |               |        |
| S                   | 0  | 1.830851E-16      |                |         |               |        |
| Total (Adjusted)    | 23 | 1.530781          |                |         |               |        |
| Total               | 24 |                   |                |         |               |        |

\* Term significant at alpha = 0.05

**9.5.2.2 Comparación múltiple para la  $\phi$  en los diámetros de glóbulo  $D_{3,2}$  en la emulsión simple  $W_1/O$ .****Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test**

Response: D\_4\_3

Term A: fi

Alpha=0.050 Error Term=AB DF=15 MSE=4.368976E-02 Critical Value=4.076004

| Group | Count | Mean     | Different From Groups |
|-------|-------|----------|-----------------------|
| 0.1   | 6     | 1.422289 |                       |
| 0.3   | 6     | 1.465794 |                       |
| 0.4   | 6     | 1.586452 |                       |
| 0.2   | 6     | 1.744372 |                       |

**9.5.3 Análisis estadísticos para la comparación de glóbulo ( $D_{3,2}$ ) con goma de mezquite y polímero sintético en la emulsión múltiple  $W_1/O/ W_2$ .****9.5.3.1 Anova para la comparación de glóbulo ( $D_{3,2}$ ) con goma de mezquite y polímero sintético en la emulsión múltiple  $W_1/O/ W_2$ .****Analysis of Variance Table**

| Source              | DF | Sum of Squares | Mean Square  | F-Ratio | Prob Level | Power |
|---------------------|----|----------------|--------------|---------|------------|-------|
| <b>(Alpha=0.05)</b> |    |                |              |         |            |       |
| A: tiempo           | 27 | 0.4180902      | 1.548482E-02 |         |            |       |
| B: tipo             | 1  | 2.687728       | 2.687728     | 62.67   | 0.0000*    | 1.000 |
| AB                  | 27 | 1.15801        | 4.288925E-02 |         |            |       |
| S                   | 0  | 0              |              |         |            |       |
| Total (Adjusted)    | 55 | 4.263828       |              |         |            |       |
| Total               | 56 |                |              |         |            |       |

\* Term significant at alpha = 0.05

**9.5.3.2 Comparación múltiple para glóbulos ( $D_{3,2}$ ) con goma de mezquite y polímero sintético en la emulsión múltiple  $W_1/O/ W_2$ .****Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test**

Response: D\_3\_2

Term B: tipo

Alpha=0.050 Error Term=AB DF=27 MSE=4.288925E-02 Critical Value=2.901739

| Group              | Count | Mean     | Different From Groups |
|--------------------|-------|----------|-----------------------|
| Polímero sintético | 28    | 1.190776 | Goma de mezquite      |
| Goma de mezquite   | 28    | 1.628932 | Polímero sintético    |

**9.5.4 Análisis estadísticos para la comparación de glóbulos ( $D_{4,3}$ ) con goma de mezquite y polímero sintético en la emulsión múltiple  $W_1/O/ W_2$ .****9.5.4.1 Anova para la comparación de glóbulos ( $D_{4,3}$ ) con goma de mezquite y polímero sintético en la emulsión múltiple  $W_1/O/ W_2$ .****Analysis of Variance Table**

| Source              | DF | Sum of Squares | Mean Square | F-Ratio | Prob Level | Power  |
|---------------------|----|----------------|-------------|---------|------------|--------|
| <b>(Alpha=0.05)</b> |    |                |             |         |            |        |
| A: tiempo           | 27 | 9.424025       | 0.3490379   |         |            |        |
| B: tipo             | 1  | 74.08419       | 74.08419    | 77.22   | 0.000000*  | 1.0000 |
| AB                  | 27 | 25.90401       | 0.9594079   |         |            |        |
| S                   | 0  | 0              |             |         |            |        |
| Total (Adjusted)    | 55 | 109.4122       |             |         |            |        |
| Total               | 56 |                |             |         |            |        |

\* Term significant at alpha = 0.05

#### 9.5.4.2 Comparación múltiple para glóbulos ( $D_{4,3}$ ) con goma de mezquite y polímero sintético en la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ .

##### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: D\_4\_3

Term B: tipo

Alpha=0.050 Error Term=AB DF=27 MSE=0.9594079 Critical Value=2.901739

| Group              | Count | Mean     | Different From Groups |
|--------------------|-------|----------|-----------------------|
| Goma de mezquite   | 28    | 7.230512 | Polímero sintético    |
| Polímero sintético | 28    | 9.530888 | Goma de mezquite      |

#### 9.5.5. Análisis estadísticos para el tipo de polímero en la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ .

##### 9.5.5.1 Anova para el tipo de polímero en la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ donde se compararon los valores de las relaciones $D_{3,2}/D_{4,3}$ entre las emulsiones formuladas con GM y PS.

##### Tipo polímero

##### Analysis of Variance Table

| Source           | DF | Sum of Squares | Mean Square | F-Ratio | Prob Level | Power  |
|------------------|----|----------------|-------------|---------|------------|--------|
| A: Tipo          | 1  | 0.1369193      | 0.1369193   | 365.47  | 0.000000*  | 1.0000 |
| S                | 54 | 2.023072E-02   | 3.74643E-04 |         |            |        |
| Total (Adjusted) | 55 | 0.1571501      |             |         |            |        |
| Total            | 56 |                |             |         |            |        |

\* Term significant at alpha = 0.05

##### 9.5.5.2 Comparación múltiple para el tipo de polímero en la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ donde se compararon los valores de las relaciones $D_{3,2}/D_{4,3}$ entre las emulsiones formuladas con GM y PS.

##### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: GM

Term A: PS

Alpha=0.050 Error Term=S DF=54 MSE=3.74643E-04 Critical Value=2.835338

##### Different

| Group | Count | Mean      | From Groups |
|-------|-------|-----------|-------------|
| PS    | 28    | 0.1261782 | 2           |
| GM    | 28    | 0.2250719 | 1           |

#### 9.5.6. Análisis estadísticos para glóbulos ( $D_{4,3}$ ) de emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ biótica y abiótica con polímero sintético.

##### 9.5.6.1 Anova para glóbulos ( $D_{4,3}$ ) de emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ biótica y abiótica con polímero sintético.

##### Analysis of Variance Table

| Source           | DF | Sum of Squares | Mean Square | F-Ratio | Prob Level | Power   |
|------------------|----|----------------|-------------|---------|------------|---------|
| A: tiempo        | 29 | 91.38213       | 3.151108    |         |            |         |
| B: trat          | 1  | 1143.283       | 1143.283    | 5184.49 | 0.000000*  | 1.00000 |
| AB               | 29 | 6.39508        | 0.22052     |         |            |         |
| S                | 0  | 0              |             |         |            |         |
| Total (Adjusted) | 59 | 1241.06        |             |         |            |         |
| Total            | 60 |                |             |         |            |         |

\* Term significant at alpha = 0.05

### 9.5.6.2 Comparación múltiple para glóbulos ( $D_{4,3}$ ) de emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ biótica y abiótica con polímero sintético.

#### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: D\_4\_3

Term B: trat

Alpha=0.050 Error Term=AB DF=29 MSE=0.22052 Critical Value=2.892404

| Group    | Count | Mean     | Different From Groups |
|----------|-------|----------|-----------------------|
| Abiótica | 30    | 9.413986 | Biótica               |
| Biótica  | 30    | 18.14433 | Abiótica              |

### 9.5.7. Análisis estadísticos para glóbulos ( $D_{3,2}$ ) de emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ biótica y abiótica con polímero sintético.

#### 9.5.7.1 Anova para glóbulos ( $D_{3,2}$ ) de emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ biótica y abiótica con polímero sintético.

##### Analysis of Variance Table

| Source           | DF | Sum of Squares | Mean Square  | F-Ratio | Prob Level | Power   |
|------------------|----|----------------|--------------|---------|------------|---------|
| A: tiempo        | 29 | 0.897785       | 0.0309581    |         |            |         |
| B: trat          | 1  | 0.5919205      | 0.5919205    | 26.51   | 0.000017*  | 0.99870 |
| AB               | 29 | 0.6474098      | 2.232448E-02 |         |            |         |
| S                | 0  | 0              |              |         |            |         |
| Total (Adjusted) | 59 | 2.137115       |              |         |            |         |
| Total            | 60 |                |              |         |            |         |

\* Term significant at alpha = 0.05

### 9.5.7.2 Comparación múltiple para glóbulos ( $D_{3,2}$ ) de emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ biótica y abiótica con polímero sintético.

#### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: D\_3\_2

Term B: trat

Alpha=0.050 Error Term=AB DF=29 MSE=2.232448E-02 Critical Value=2.892404

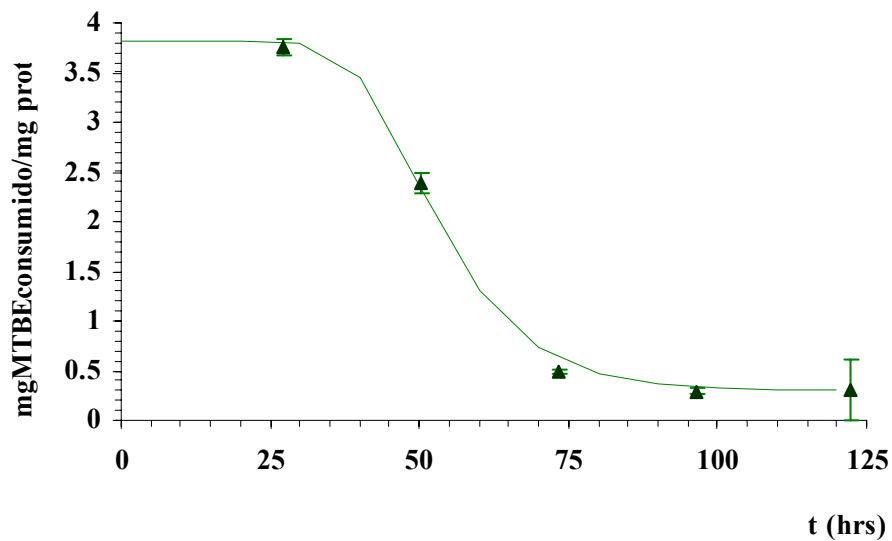
| Group    | Count | Mean     | Different From Groups |
|----------|-------|----------|-----------------------|
| Abiótica | 30    | 1.196333 | Biótica               |
| Biótica  | 30    | 1.394982 | Abiótica              |



## Anexo 6. Ajuste de Gompertz para consumo de MTBE

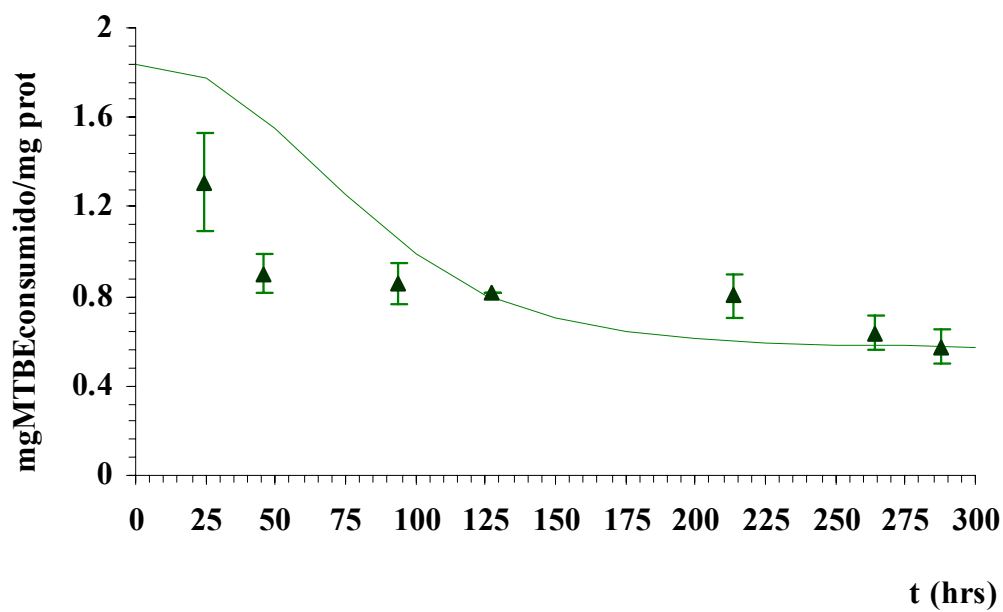
### 9.6.1 Ajuste de Gompertz para consumo de MTBE del consorcio microbiano en medio mineral

| $y = m1 \cdot \exp(-m2 \cdot \exp(-m3 \cdot m0))$ |          |          |
|---|----------|----------|
|   | Value    | Error    |
| m1  | 2.4964   | 0.069626 |
| m2  | 14.479   | 7.8066   |
| m3  | 0.066514 | 0.012797 |
| Chisq   | 0.013345 | NA       |
| R <sup>2</sup>                                    | 0.99719  | NA       |



### 9.6.2 Ajuste de Gompertz para consumo de MTBE del consorcio microbiano entrampado en emulsión múltiple.

| y = m1*(exp(-m2*exp(-m3*M0))... |          |          |
|---------------------------------|----------|----------|
|                                 | Value    | Error    |
| m1                              | 1.271    | 0.12385  |
| m2                              | 5.5696   | 6.8009   |
| m3                              | 0.026547 | 0.014134 |
| Chisq                           | 0.11594  | NA       |
| R                               | 0.95449  | NA       |



## **Anexo 7. Método de Tinción de Gram**

La tinción de Gram es la tinción diferencial más importante utilizada en microbiología. Dependiendo del resultado de esta tinción, las células pueden ser Gram + o Gram -. Una vez terminada la tinción de Gram, las células Gram + aparecen de color púrpura, mientras que las Gram – presentan color rojo. La metodología es la siguiente:

1. Tinción del frotis, previamente fijado al calor, con cristal violeta durante 1 min. Todas las células se tiñen de color azul/púrpura.
2. Añadir la solución de yodina y dejar que actúe e min. Todas las células siguen del mismo color (azul/púrpura).
3. Decolorar brevemente con alcohol (alrededor de 20 seg). Las células Gram + siguen de color azul/púrpura, mientras que las Gram – se decoloran.
4. Tinción de contraste con safranina durante 1-2 min. Las células Gram + se ven azules/púrpura y las Gram – rojas/rojizas (Madigan y col., 1999).