



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**“Degradación secuencial vía enzimática/TiO<sub>2</sub>  
modificado de fenantreno en un sistema líquido”**

**T E S I S**

Que presenta

**Denisse Fabiola González Ramírez**

Para obtener el grado de  
**DOCTORA EN CIENCIAS**  
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de la Tesis: **Dra. Refugio Rodríguez Vázquez**

**Dr. Pedro Ávila Pérez**

Ciudad de México

FEBRERO, 2017

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo No. 355106, para poder realizar mis estudios de doctorado a través del programa “Becas Nacionales CONACYT”.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) por las facilidades brindadas durante el desarrollo de la parte experimental de esta investigación.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPV) por las facilidades otorgadas durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

Agradezco a mis directores de tesis, Dra. Refugio Rodríguez Vázquez y Dr. Pedro Ávila Pérez, así como a mis asesores el Dr. Luis Gilberto Torres Bustillos, el Dr. Ricardo Aguilar López, la Dra. María del Carmen Montes Horcasitas y el Dr. Fernando José Esparza García, por su orientación y comentarios durante la elaboración de este trabajo de investigación.

## DEDICATORIA

A mi padre, madre y hermano; cuyo apoyo ha sido clave para poder alcanzar una más de mis metas. Y de quienes estoy infinitamente agradecida por sus enseñanzas.

A todas las personas que me brindaron su ayuda en más de una forma para concretar esta empresa, y a quienes agradezco la confianza depositada en mí.

Especialmente a Marissa, Anette, Bertha, Xenia, Diana, Ofelia, Lina, Laura, Sonia, Flor, Rebeca, Sergio, Yaremi, Mario, Enrique, la Dra. Martha y el Sr. Tomas; de quienes aprendí mucho y agradezco su amistad.

*“Every person takes the limits  
of their own field of vision for  
the limits of the world.”*

Arthur Schopenhauer

# ÍNDICE

	RESUMEN	xi
	ABSTRACT	xii
1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	HPAs	3
1.2	Fenantreno	5
1.3	Tratamientos biológicos para la remoción de PHE	6
1.3.1	Cultivos mixtos	9
1.3.2	Enzimas Ligninolíticas	11
1.3.3	Atrapamiento de enzimas en gel	14
1.4	Tratamiento de oxidación avanzada para la remoción de PHE	17
1.4.1	Mecanismo fotocatalítico TiO <sub>2</sub> /UV	18
1.4.2	Síntesis y dopaje del TiO <sub>2</sub>	22
1.4.3	Fotocatálisis heterogénea	24
2	JUSTIFICACIÓN	28
3	HIPÓTESIS	29
4	OBJETIVOS	29
4.1	Objetivo general	29
4.1.1	Objetivos específicos	29
5	MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1	Tratamiento de PHE por el sistema enzimático	31
5.1.1	Preparación del inóculo	32
5.1.2	Efecto de un inductor biológico en la producción de enzimas	32
5.1.3	Efecto del pH en la producción de enzimas	34
5.1.4	Precipitación e inmovilización de enzimas	34
5.1.5	Atrapamiento de enzimas crudas en un gel de alginato	35
5.1.6	Degradación de PHE en una columna empacada con hidrogeles de lecho fijo	37
5.2	Tratamiento de PHE por el sistema fotocatalítico	39

5.2.1	Síntesis del material	40
5.2.2	Caracterización del material	41
5.2.3	Pruebas de degradación de PHE en reactor fotocatalítico	42
5.3	Pruebas de degradación de PHE en el sistema enzimático acoplado al fotocatalítico	44
5.4	Análisis estadístico y procesamiento de datos	45
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
6.1	Tratamiento de PHE por el sistema enzimático	46
6.1.1	Efecto de un inductor biológico en la producción de enzimas	46
6.1.2	Efecto del pH en la producción de enzimas	55
6.1.3	Precipitación de enzimas	58
6.1.4	Atrapamiento de enzimas crudas en un gel de alginato	63
6.1.5	Degradación de PHE en una columna empacada con hidrogeles de lecho fijo	66
6.2	Tratamiento de PHE por el sistema fotocatalítico	71
6.2.1	Síntesis del material	72
6.2.2	Caracterización del material	74
6.2.3	Pruebas de degradación de PHE en el reactor fotocatalítico	84
6.2.3.1	Pruebas de degradación de PHE en el reactor fotocatalítico irradiado con luz UVC	85
6.2.3.2	Pruebas de degradación de PHE en el reactor fotocatalítico irradiado con luz UVA	93
6.3	Pruebas de degradación de PHE en el sistema enzimático acoplado al fotocatalítico	97
	CONCLUSIONES	103
	RECOMENDACIONES	105
	BIBLIOGRAFÍA	106
	ANEXO A	123
A.1	Estimación de azúcares reductores	123
A.2	Determinación de Proteínas	123
A.3	Determinación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	123

A.4	Determinación de Lcc	124
A.5	Determinación de MnP	124
	ANEXO B	125
B.1	Pruebas de diferencia mínima significativa en el cultivo mixto empleando glucosa como fuente de carbono	125
B.2	Análisis de correlación Pearson de la producción de Lcc, MnP y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> usando glicerol como fuente de carbono	125
B.3	ANOVA del diseño factorial 2 <sup>2</sup> de la actividad enzimática del cultivo mixto empleando glicerol como fuente de carbono	126
B.4	Pruebas de diferencia mínima significativa en el tratamiento fotocatalítico	127
	ANEXO C	129
C.1	Artículo aceptado: Denisse F. González-Ramírez, Pedro Ávila-Pérez, Luis G. Torres-Bustillos, Ricardo Aguilar-López, María C. Montes-Horcasitas, Fernando J. Esparza-García and Refugio Rodríguez-Vázquez. 2017. Removal of Phenanthrene in Aqueous Solution by TiO <sub>2</sub> -C-Ag Film Supported in Fiberglass on the Presence of Phonton Competitors. Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering.	129
C.2	Artículo enviado: Denisse F. González-Ramírez, Pedro Ávila-Pérez, Luis G. Torres-Bustillos, Ricardo Aguilar-López, María C. Montes-Horcasitas, Fernando J. Esparza-García and Refugio Rodríguez-Vázquez. 2017. Effects of Dimethyl Sulfoxide and Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate on the Phenanthrene Removal by a Crude Enzymatic Extract from a Mixed Culture entrapped in Alginate Hydrogels.	130

## ÍNDICE DE TABLAS

1.1	Propiedades fisicoquímicas del fenantreno (USNLM, 2013)	6
5.1	Diseño experimental 2 <sup>2</sup>	33
6.1	Máxima actividad enzimática obtenida en los ensayos.	53
6.2	Comparación de actividad reportada en cultivos mixtos.	54
6.3	Actividad enzimática del extracto crudo del cultivo mixto almacenado a 3°C.	61
6.4	Actividad enzimática en el extracto crudo del cultivo mixto atrapado en geles de alginato.	65
6.5	Determinación de las características morfológicas.	75
6.6	Porcentajes de remoción de PHE alcanzados en los diferentes tratamientos, n=3.	102

## ÍNDICE DE FIGURAS

1.1	Molécula de Fenantreno (USNLM, 2013).	6
1.2	Regiones del fenantreno (Fukui, 1982).	8
1.3	Mecanismo de fotocatalisis TiO <sub>2</sub> (Zaleska, 2008).	19
5.1	Método para la degradación secuencial vía enzimática/TiO <sub>2</sub> modificado de PHE en un sistema líquido	30
5.2	Sistema enzimático: (a) 1 columna empacada de lecho fijo, 2 concentrador de O <sub>2</sub> , 3 bomba peristáltica, 4 tanque de mezclado y 5 toma de muestra; y (b) columna empacada.	37
5.3	Sistema fotocatalítico: (a) 1 reactor fotocatalítico, 2 concentrador de O <sub>2</sub> , 3 bomba peristáltica, 4 tanque de mezclado, y 5 toma de muestra, (b) reactor fotocatalítico y (c) concentrador de oxígeno.	43
5.4	Sistema enzimático-fotocatalítico: (a) 1 columna empacada de lecho fijo, 2 concentrador de O <sub>2</sub> , 3 bomba peristáltica, 4 tanque de mezclado, 5 toma de muestra, y 6 reactor fotocatalítico, (b) tratamiento enzimático y (c) tratamiento fotocatalítico.	44

6.1	Seguimiento del (a) consumo de azúcares reductores y (b) producción de proteínas por ○ <i>T. maxima</i> , △ <i>T. maxima/P. carneous</i> (1:1), □ <i>T. maxima/P. carneous</i> (1:2) en 20 g/L de glucosa; n=2.	47
6.2	Producción de: (a) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , (b) Lcc, y (c) MnP por ○ <i>T. maxima</i> , △ <i>T. maxima/P. carneous</i> (1:1), □ <i>T. maxima/P. carneous</i> (1:2) en 20 g/L de glucosa; n=2.	48
6.3	Seguimiento de proteínas (a)-(c) y peróxido de hidrógeno (b)-(d) en cultivos de ○ <i>T. maxima</i> , △ <i>T. maxima/P. carneous</i> (1:1), □ <i>T. maxima/P. carneous</i> (1:2) con 15 y 20 g/L de glicerol; n=2.	50
6.4	Seguimiento de Lcc (a)-(c) y MnP (b)-(d) en cultivos de ○ <i>T. maxima</i> , △ <i>T. maxima/P. carneous</i> (1:1), □ <i>T. maxima/P. carneous</i> (1:2) con 15 y 20 g/L de glicerol; n=2.	51
6.5	Diseño experimental 2 <sup>2</sup> , donde a) Lcc y b) MnP.	52
6.6	Seguimiento de (a) pH y (b) proteínas en el cultivo mixto en soluciones amortiguadoras: ○ acetatos, △ citratos y □ citratos-fosfatos; n=2.	56
6.7	Efecto del pH en la (a) producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , (b) Lcc y (c) MnP en soluciones amortiguadoras: ○ acetatos, △ citratos y □ citratos-fosfatos; n=2.	57
6.8	Crecimiento de monocultivos y cultivo mixto donde: ○ <i>T. maxima</i> , △ <i>P. carneous</i> y □ <i>T. maxima/P. carneous</i> ; n=3.	58
6.9	Seguimiento de ○ pH y △ proteínas en el cultivo mixto; n=3.	59
6.10	Seguimiento de ○ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , △ Lcc y □ MnP en el cultivo mixto; n=3.	60
6.11	Precipitación de proteínas del extracto del cultivo mixto usando acetona: a) 75 % y b) 83.3%; n=5.	62
6.12	Actividad enzimática de la precipitación con: (a) 75% y (b) 83.3% de acetona, n=5.	62
6.13	Perlas de alginato entrecruzadas con glutaraldeído: (a) antes y (b) después de liofilizar.	64
6.14	Micrografía MEB 20 KeV de: (a) hidrogel de alginato, (b) corte transversal, y (c) análisis EDX.	65
6.15	Remoción de PHE por: ○ hidrogeles sin enzimas e ● hidrogeles con enzimas; n=3.	67
6.16	Espectros de absorción UV-Vis en el tratamiento de PHE por: (a) hidrogeles si enzimas e (b) hidrogeles con enzimas.	68



6.17	Seguimiento del pH en el tratamiento de PHE por: ○ hidrogel sin enzimas e ● hidrogel con enzimas; n=3.	68
6.18	Análisis XPS en la superficie del hidrogel sin enzimas antes y después del tratamiento de PHE.	70
6.19	Análisis XPS en la superficie del hidrogel con enzimas antes y después del tratamiento de PHE.	71
6.20	Micrografía MEB de partículas de TiO <sub>2</sub> -C-Ag método sol-gel: (a) sin TW80, (b) con 15 CMC TW80/1:18 TTB/H <sub>2</sub> O y (c) 15 CMC TW80/1:0.5 TTB/H <sub>2</sub> O a 20 Kv.	73
6.21	Micrografía MEB de la síntesis de partículas de TiO <sub>2</sub> -C-Ag con los surfactantes: a) Brij 72, b) Span 80, c) Surfapcol G, d) Emulgin 600, e) CTAB, y f) Tween 20 a 25 kV.	74
6.22	Distribución de tamaño de partícula de 6 mg/L de TiO <sub>2</sub> -C-Ag en DMSO/H <sub>2</sub> O (1:10); n=3.	76
6.23	Difractograma de TiO <sub>2</sub> modificado con C y Ag por la técnica sol-gel.	77
6.24	Micrografía MED de filtro de fibra de vidrio impregnada con TiO <sub>2</sub> -C-Ag: a) imagen MEB a x5,000 20 kV y b) análisis EDX.	78
6.25	Imagen de MET 200 keV del material sintetizado: a) TiO <sub>2</sub> -C-Ag en fibra de vidrio comercial, b) distribución de partículas de Ag y c) distribución del Ti.	79
6.26	Micrografía MET 200x de: (a) TiO <sub>2</sub> -C-Ag, (b) difractograma, (c) nanopartículas, y (d) distribución del tamaño de partículas de Ag; n=257.	80
6.27	Análisis BET de (a) fibra de vidrio, (b) TiO <sub>2</sub> -C/fibra de vidrio y (c) TiO <sub>2</sub> -C-Ag/fibra de vidrio donde: ○ adsorción y ● desorción.	81
6.28	Análisis XPS de la superficie de los materiales.	82
6.29	Análisis de superficie XPS de las regiones (a) C 1s y (b) Ag 3d de la fibra de vidrio impregnada con TiO <sub>2</sub> -C-Ag.	83
6.30	Espectro UV-Vis de los tratamientos en el reactor fotocatalítico irradiado con luz UVC por: (a) TiO <sub>2</sub> -C/TW80, (b) TiO <sub>2</sub> -C-Ag/TW80, (c) DMSO/TW80 y (d) TiO <sub>2</sub> -C-Ag/TW80/DMSO.	85
6.31	Seguimiento del pH de los tratamientos en el reactor fotocatalítico: △ TW80/DMSO, ◇ TiO <sub>2</sub> -C-Ag/TW80, □ TiO <sub>2</sub> -C/TW80, y ○ TiO <sub>2</sub> -C-Ag/TW80/DMSO; n=3.	86

6.32	Remoción de PHE en los tratamientos con: □ UVC, ○ TiO <sub>2</sub> -C/UVC y △TiO <sub>2</sub> -C-Ag/UVC; n=3.	87
6.33	Seguimiento del pH de los tratamientos de PHE: □ UVC, ○ TiO <sub>2</sub> -C/UVC y △ TiO <sub>2</sub> -C-Ag/UVC; n=3.	88
6.34	Espectro UV-Vis de los tratamientos en el reactor fotocatalítico por: (a) UVC, (b) TiO <sub>2</sub> -C/UVC y (c) TiO <sub>2</sub> -C-Ag/UVC.	89
6.35	Análisis de superficie XPS de TiO <sub>2</sub> -C antes y después de los tratamientos irradiados con luz UVC.	90
6.36	Análisis de superficie XPS de TiO <sub>2</sub> -C-Ag antes y después de los tratamientos irradiados con luz UVC.	92
6.37	Remoción de PHE en los tratamientos irradiados con luz UVA; n=3.	94
6.38	Seguimiento del pH de los tratamientos irradiados con: □ UVA y ■ TiO <sub>2</sub> -C-Ag/UVA; n=3.	95
6.39	Espectro UV-Vis de los tratamientos en el reactor fotocatalítico por: (a) UVA y (b) TiO <sub>2</sub> -C-Ag/UVA.	95
6.40	Análisis de superficie XPS de TiO <sub>2</sub> -C-Ag antes y después del tratamiento irradiado con luz UVA.	96
6.41	Remoción de PHE en el tratamiento enzimático/fotocatalítico irradiado con luz UVA; n=3.	97
6.42	Seguimiento del pH el tratamiento enzimático/fotocatalítico irradiado con luz UVA de PHE; n=3.	98
6.43	Espectro de absorbancia el tratamiento enzimático/fotocatalítico irradiado con luz UVA de PHE.	99
6.44	Análisis superficial XPS del tratamiento enzimático acoplado de PHE.	100
6.45	Análisis superficial XPS del tratamiento acoplado fotocatalítico irradiado con luz UVA de PHE.	101

## RESUMEN

Los tratamientos aplicados para el manejo de aguas residuales, generan lodos con altas concentraciones de contaminantes. Estos contaminantes son moléculas que presentan una baja solubilidad y tienden a sorberse en la materia orgánica. Entre ellos se tienen los compuestos orgánicos persistentes, de los cuales los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son los más frecuentemente encontrados. Los HAPs se caracterizan por su prolongada permanencia en el ambiente, en donde pueden ocasionar daños a la salud humana y equilibrio de los ecosistemas debido a la gran estabilidad de sus moléculas. En este trabajo se estudió el tratamiento de la molécula de fenantreno (PHE) en agua. El PHE posee una gran estabilidad como resultado de la alta resonancia en sus tres anillos bencénicos. Las pruebas de degradación de ~ 30 mg/L de PHE se realizaron en presencia de los agentes solubilizantes dimetil sulfoxido y monooleato de polioxietileno sorbitán vía enzimática/TiO<sub>2</sub> modificado. El tratamiento enzimático, empleó enzimas crudas precipitadas a partir de un cultivo mixto del hongo basidiomiceto *Trametes maxima* y el ascomiceto *Paecilomyces carneous*. El cultivo mixto incrementó la actividad lacasa usando como fuente de carbono glicerol. En el tratamiento fotocatalítico, se sintetizó TiO<sub>2</sub>-C-Ag por el método sol-gel y se soportó en fibra de vidrio. La actividad fotocatalítica fue evaluada en luz UVC y UVA. En ambos tratamientos se alcanzó remociones de PHE superiores al 90%. Finalmente se diseñó un sistema acoplado el tratamiento enzimático/fotocatalítico, el cual mejoró la remoción del tratamiento fotocatalítico irradiado con luz UVA.

## ABSTRACT

Wastewater reclamation makes use of treatments that generate sludge with high pollutant concentration. The pollutants associated to these organic matter have a low solubility; therefore, they associate to sludge. Among such pollutants, the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are frequently found. The PAHs have a long permanence in the environment as a result of their highly stable molecules. These organic persistent pollutants are detrimental to human health and ecosystem equilibrium. In this work, the treatment of phenanthrene (PHE) was studied in aqueous solution. The PHE is highly stable as a result of the high resonance of his three benzene rings. The degradation test of  $\sim 30$  mg/L of PHE were carried out through enzymatic/doped-TiO<sub>2</sub> treatments in the presence of the solubilizing agents: dimethyl sulfoxide and polyoxyethylene sorbitan monooleate. The enzymatic treatment made use of crude enzymes precipitate from a mixed culture of the basidiomycete *Trametes maxima* and the ascomycete *Paecilomyces carneous*. The mixed culture increased the laccase activity using as carbon source glycerol. In the photocatalytic treatment, TiO<sub>2</sub>-C-Ag was synthesized by the sol-gel technique and supported in fiberglass. The photocatalytic activity was tested under UVC and UVA light. In both treatments, the PHE removal was superior to 90%. The final stage of this research was the design of a coupled system combining the enzymatic and photocatalytic treatments, such treatment improved the PHE removal in the photocatalytic treatment irradiated with UVA light.

# 1 INTRODUCCIÓN

El abastecimiento de agua potable segura es un problema al que se enfrentan la mayoría de los países. Se estima que para el 2050, un tercio de la población no tendrá acceso a agua segura (Mukheibir, 2010). En el 2010, el índice de calidad del agua de México de acuerdo al Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP) fue de 60.5 (de un máximo de 100 puntos) en lo que respecta a los parámetros de oxígeno disuelto, pH, conductividad, nitrógeno total y fósforo total (UNEP, 2010). En México, el 70% de los cuerpos de agua han sido afectados por contaminantes de acuerdo con el reporte de la UNEP (2010), debido a la infraestructura y tratamientos de bajo costo aplicados a las aguas residuales. La creciente urbanización, ha reducido la capacidad de recarga de mantos acuíferos subterráneos y aguas superficiales. Por tal motivo, la recuperación de aguas residuales para el consumo humano es un factor clave para poder satisfacer las demandas actuales de la población.

En México, según datos de Comisión Nacional del Agua (CONAGUA, 2014), de las 2337 plantas tratadoras de aguas residuales ubicadas en los municipios de la República Mexicana, más del 50% aplicaba tecnologías de bajo costo como lagunas de estabilización (30.7%) y lodos activados (30.3%). Las aguas tratadas en el país constituyen un caudal de 99.8 m<sup>3</sup>/s de aguas residuales tratadas, de 230.2 y 210.3 m<sup>3</sup>/s generadas en centros urbanos (por una población que ascendía a 119.7 millones de habitantes en el 2010) e industria, respectivamente (De la Peña *et al.* 2013; CONAGUA, 2014; INEGI 2015). De las aguas tratadas, el 25.3% fue reusada en la agricultura; mientras que en resto fue descargada en cuerpos de agua superficiales o

en mantos freáticos para su recarga. Los efectos adversos de descargas de agua residual tratada en cuerpos de agua y suelos, han resultado en niveles de contaminación que van de moderados a altos en ecosistemas acuáticos (Anda y Shear, 2008).

Los tratamientos convencionales presentan tasas de degradación bajas en concentraciones altas de contaminantes, no son destructivos y en concentraciones bajas son inefectivos. Las tecnologías de oxidación avanzadas constituyen una colección de tratamientos basados en la fotogeneración de especies radicales altamente oxidantes para la destrucción de contaminantes persistentes. Los procesos de fotocatalisis heterogénea poseen los atributos necesarios para ser operados después de los tratamientos convencionales para la eliminación de compuestos químicos sintéticos refractarios en efluentes de procesos unitarios. Los procesos de fotocatalisis pueden ser combinados con operaciones físicas, químicas o biológicas. Los tratamientos secuenciales consisten en al menos dos operaciones principales. Para asegurar la efectividad de tratamiento, los métodos convencionales son aplicados como la operación primaria mientras que la fotocatalisis como la operación secundaria (Gaya, 2014).

Los tratamientos secundarios aplicados a aguas residuales se evocan a la remoción de altas concentraciones de amoníaco y materia orgánica (Puigagut *et al.* 2009). Los productos finales de dichos procesos se constituyen de una mezcla de compuestos orgánicos, inorgánicos, contaminantes microbiológicos y patógenos. Siendo los órdenes de magnitud mayores en los lodos, en lo que respecta a concentración de contaminantes orgánicos persistentes como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) de los que se han reportado concentraciones de 0.5 a 2.2 mg/Kg (Zeng *et al.*

2010). Los lodos son un medio de transferencia de contaminantes en el ambiente ya que generalmente son dispuestos en tierras de cultivo como fertilizantes, donde pueden dañar a los organismos que habitan el suelo y afectar a los cultivos. La Directiva del Consejo de la Unión Europea ha establecido una carga máxima de 6 mg/Kg de HPAs en lodos para aplicación a suelos agrícolas. Los HPAs han cobrado gran importancia debido a su gran persistencia en el suelo, alta lipofilicidad, biomagnificación en las cadenas alimenticias, efectos adversos en la biota y ser carcinógenos (Pérez *et al.* 2001; Mita *et al.* 2010).

## **1.1 HPAs**

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) son constituyentes lipofílicos, que se liberan al ambiente como resultado de la combustión incompleta en combustibles fósiles, quema de aceites y humo de cigarro, descarga accidental de petróleo, durante el uso y disposición de productos del petróleo, en la licuefacción y gasificación de carbón; así como de la quema de residuos agrícolas y forestales (Singh, 2006; Arun *et al.* 2008).

Los HPAs están conformados por dos o más anillos bencénicos en arreglos lineares, angulares o en aglomerados. Son termodinámicamente estables, debido a su fuerte resonancia negativa. Su hidrofobicidad al agua y presión de vapor, permiten su sorción y acumulación en los sedimentos (Torreta, 2012). Los compuestos orgánicos hidrófobos presentan baja movilidad debido a su sorción en materia orgánica por lo que no se espera que migren a la superficie; sin embargo, las nanopartículas presentes

en el suelo liberadas de biosólidos sirven como mecanismo de transporte de estos compuestos a aguas subterráneas (Cai, 2014). Los HPAs con alto peso molecular son más recalcitrantes que los de bajo peso molecular a ataques microbianos, lo anterior ha sido atribuido a la biodisponibilidad de los nutrientes, su potencial de oxidación y otros factores limitantes. Debido a su permanencia en el ambiente y genotoxicidad, los HPAs son considerados contaminantes prioritarios a ser eliminados de ecosistemas acuáticos y terrestres por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA). Siendo de los primeros contaminantes en ser reconocidos por ser carcinogénicos. Los HAPs son fácilmente adsorbidos en el tracto intestinal de mamíferos y distribuidos a diferentes partes del cuerpo debido a su alta solubilidad en lípidos (Singh *et al.* 2016).

Métodos inadecuados de disposición y control han favorecido la distribución de estos contaminantes en suelos, aguas subterráneas y superficiales. Una gran variedad de tratamientos (físicos, químicos y biológicos) han sido desarrollados para la remoción o destrucción de dichos residuos, pero algunos de estos implican altos costos (Singh, 2006; Haritash y Kaushik, 2009). Entre los tratamientos se encuentran procesos de separación por gravedad, membranas de absorción, osmosis inversa, microfiltración y nanofiltración; los cuales además de los altos costos de producción y operativos producen grandes volúmenes de lodos (Singh *et al.* 2016).



## 1.2 Fenantreno

El fenantreno (PHE), con la fórmula molecular  $C_{14}H_{10}$  y estructura mostrada en la Figura 1.1; no es mutagénico o cancerígeno a los humanos; sin embargo, ha demostrado ser tóxico para organismos acuáticos (Bezalel *et al.* 1996). El PHE es considerado como un leve alergénico y fotosensibilizador de la piel humana, afecta la actividad metabólica de organismos acuáticos (moluscos, crustáceos y peces), produce mutaciones en sistemas bacterianos e interfiere en la comunicación intercelular (Wu *et al.* 2014; Singh *et al.* 2016). Ha sido usado como un compuesto modelo para el estudio de la degradación, ya que se ha encontrado en mayor proporción en muestras ambientales de sitios contaminados por HPAs (Zeng *et al.* 2010).

Aunado a lo anterior muchos de los HPAs que en su estructura contienen al PHE (Figura 1.1), son cancerígenos (Bezalel *et al.* 1996; Sack *et al.* 1997). La solubilidad al agua del PHE (Tabla 1.1) y su potencial de ionización de 8.19 eV (energía requerida para remover un electrón del átomo y formar radicales catiónicos) no lo hacen sustrato para enzimas como la LiP (Sack *et al.* 1997). El límite máximo permisible de PHE en agua dulce y salada es de 0.0067 mg/L según lo establecido por la USEPA y la Water Framework Directive de la Unión Europea (WDF UE) (Fatta-Kassinos *et al.* 2011; Blokker *et al.* 2013). En un estudio de toxicidad en especies acuáticas, realizado por Wu *et al.* (2014) se estableció como límites máximos las concentraciones de 0.051 y 0.0427 mg/L de PHE.

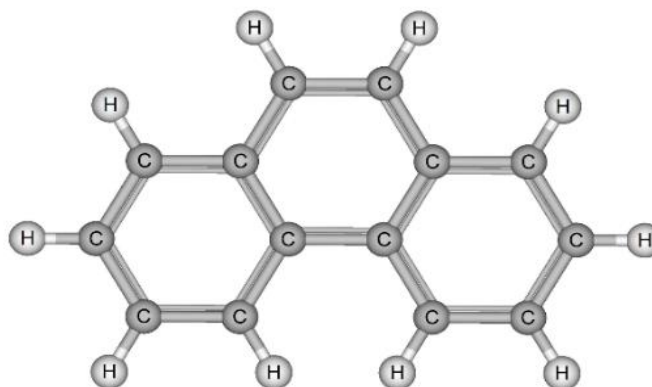


Figura 1.1. Molécula de Fenantreno

Tabla 1.1. Propiedades fisicoquímicas del fenantreno (USNLM, 2013).

<b>Peso molecular</b>	178.2292 g/mol	<b>Volumen molar</b>	182 cm <sup>3</sup> /mol
<b>Masa molecular</b>	178.229202 Da	<b>Log<sub>ow</sub></b>	4.46
<b>Punto de fusión</b>	99 - 101 °C	<b>Solubilidad en agua</b>	1.15 mg/L, 25 °C
<b>Punto de ebullición</b>	340 °C	<b>Absorbe UV</b>	< 290 nm
<b>Densidad</b>	1.179 g/cm <sup>3</sup> , 25 °C	<b>Cte. de Henry</b>	4.23×10 <sup>-5</sup> atm-cu m/mol, 25 °C

### 1.3 Tratamientos biológicos para la remoción de PHE

La mineralización de HPAs y mecanismos de degradación por bacterias han sido ampliamente estudiados. Se tiene conocimiento de actividades similares en especies fúngicas pertenecientes a los hongos de podredumbre blanca y a otros presentes en el suelo. Las enzimas extracelulares como la lacasa (Lcc) y manganeso peroxidasa (MnP) han sido identificadas como responsables de la transformación de estos compuestos (Sack *et al.* 1997).

En la mineralización de 50 mg/L de PHE por *Trametes versicolor* y *Kuehneromyces mutabilis* reportada por Sack *et al.* (1997) en medio mínimo por 63 días alcanzó un

13.8 y 4.3%, mientras que usando paja de trigo impregnada con HPAs alcanzó un 15.5% en *T. versicolor* y 5.0% en *K. mutabilis* con una mayor actividad enzimática. En la degradación de PHE más del 19% de la radioactividad del control y cerca del 4.1 y 10.8% de la radioactividad del cultivo fúngico fue volatilizado e identificado como PHE por HPLC. En el micelio, se encontraron concentraciones de radioactividad entre 9 y 43.9%. La naturaleza hidrofóbica del PHE indica su afinidad a la bioacumulación en materiales biológicos por lo que se considera que la degradación de compuestos es dependiente de la biodisponibilidad y no del número de anillos aromáticos (Sack *et al.* 1997). La cepa de *Pleurotus ostreatus* en medio rico para basidiomicetos fue capaz de mineralizar 3% de 2.5 mg de PHE. Encontrándose el 60.6% en los metabolitos extraídos por acetato de etilo y 35% en la fracción no extraíble. Siendo identificado como el metabolito más abundante al ácido 2,2'-difénico (Bezalel *et al.* 1996).

Los hongos tienen la capacidad de romper los anillos aromáticos y mineralizar los HPAs; no utilizan el PHE como fuente única de carbono, aunque lo cometabolizan a productos hidroxilados. La regioespecificidad y estereoselectividad de las oxigenasas puede ser determinada en estudios metabólicos con PHE, ya que es el HPAs de menor tamaño con una región bahía (Sack *et al.* 1997). En la teoría electrónica, los comportamientos estáticos y dinámicos de las moléculas son explicados por los efectos electrónicos que se basan en la distribución de los electrones en la molécula. Cuando la magnitud de la densidad de electrones es adoptada como criterio, la atracción electrostática y repulsión causada por la densidad de electrones es considerada. Por lo que, es razonable inferir que un agente electrofílico atacará la posición de mayor densidad de electrones en la molécula (HOMO), mientras que en una reacción nucleofílica ocurrirá en el sitio de menor densidad electrónica (LUMO)

(Fukui, 1982). En el caso del PHE la Región K es la más susceptible de ser transformada por metabolitos fúngicos (Figura 1.2).

Los hongos de podredumbre blanca se caracterizan por transformar la molécula de PHE en la posición del C9 y 10 de la región K (Figura 1.2), mientras que hongos del suelo han producido metabolitos sustituidos en el C1,2, C3,4 y C9,10. Las bacterias han mostrado poca eficiencia en la degradación de HPAs con más de 4 anillos aromáticos a diferencia de los hongos (Sack *et al.* 1997), utilizando al PHE como única fuente de carbono y energía. La oxidación se lleva a cabo vía dioxigenasa primaria en la región bahía (en las posiciones C3 y C4 ó en las posiciones C5 y C6) para formar un fenantreno cis-dihidrodiol. Pudiendo llevar la molécula de cis-3,4-dihidrodiol a ácido 1-hidroxi-2-naftóico y ácido protocatecoico ó catecol, el cual puede ser mineralizado (Bazalel *et al.* 1996).

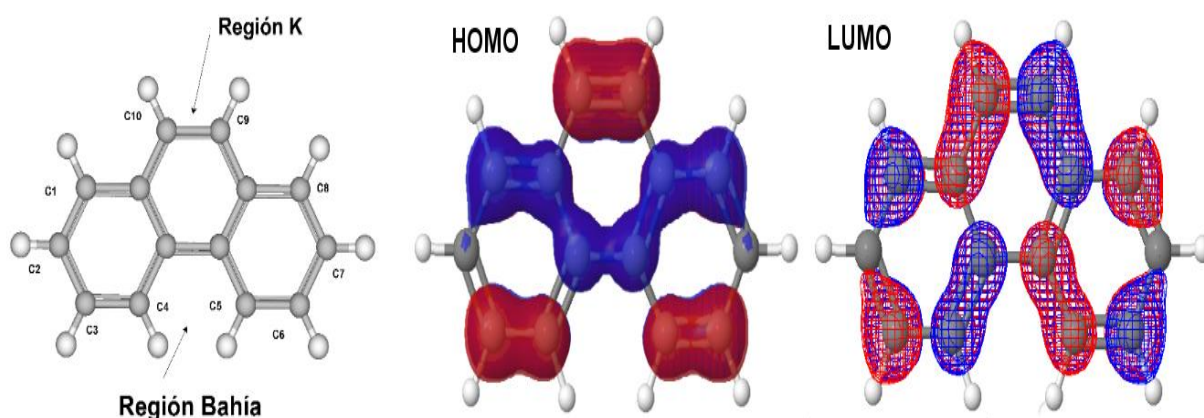


Figura 1.2 Regiones del PHE.

En cultivos fúngicos se ha encontrado como metabolitos en la degradación de PHE al fenantreno trans-1,2,-dihidrol, trans-3,4-dihidrol y trans 9,19-dihidrol. En adición a la dihidrólisis, la degradación de PHE produce metabolitos monohidroxil (1,2,3, y 4

fenantrol). Se cree que los metabolitos trans-dihidroles, sulfato glucósido y conjugados glucoronidos de los metabolitos primarios están relacionados con la actividad de la monooxigenasa citocromo P450 en conjunto con una epóxido hidrolasa (Bezalel *et al.* 1996; Sack *et al.* 1997). *Pleurotus ostreatus* es capaz de metabolizar PHE a fenantreno trans-9,10-dihidrodiol y ácido 2,2'-difénico así como mineralizarlo a CO<sub>2</sub>. La correlación entre la degradación del HPAs y Lcc extracelular, MnP o manganeso-independiente peroxidasa fue pequeña. En este estudio la formación de fenantreno trans -9R, 10R-dihidrodiol, en la que sólo un átomo de oxígeno originado del oxígeno molecular; indica que *P. ostreatus* inicialmente oxida PHE estereoselectivamente, vía monooxigenasa citocromo P-450 y usa una epóxido hidrolasa en lugar de una dioxigenasa para formar el dihidrodil (Bezalel *et al.* 1996).

### **1.3.1 Cultivos mixtos**

En la madera y en otros microambientes es típico que los hongos crezcan cerca unos de otros. Estos hongos pueden presentar interacciones antagónicas, resultando en una más rápida explotación de nutrientes, o en parasitismo, o pueden generar puntos muertos donde ninguna hifa de otra especie puede ocupar su territorio (Baldrian, 2004; Chi *et al.* 2007).

Un resultado típico de interacciones patógenas y antagonistas es el estrés oxidativo, en donde se generan especies reactivas al oxígeno (ROS); las cuales se cree tienen un importante rol en la degradación de materiales lignocelulósicos (Chi *et al.* 2007). El uso del potencial sinérgico de las rutas metabólicas en las diferentes cepas de un co-cultivo, lo hacen ventajoso frente a monocultivos. La gran mayoría de las

biotransformaciones en la naturaleza toman lugar por la combinación de rutas metabólicas de diferentes microorganismos (Bader *et al.* 2010). Evidencia experimental indica que la competencia por espacio y nutrientes puede resultar en incremento en la degradación de la lignina y en una elevada producción de enzimas degradadoras de la lignina, como Lcc (Zhang *et al.* 2006; Chi *et al.* 2007). La lignina es considerada como un obstáculo para la eficiente conversión de la biomasa a azúcares fermentables y combustibles líquidos. Limita la digestibilidad de paja y otros materiales lignocelulósicos por el ganado y otros rumiantes (Eriksson y Bermek, 2009). Los cultivos mixtos son aplicados en el tratamiento de aguas residuales, producción de biogás y remediación de suelos (Bader *et al.* 2010). Los cultivos mixtos pueden resultar en incremento de rendimiento, reducción de los costos de proceso debido al uso de sustratos baratos en ocasiones no estériles, así como el remplazo de sustancias que representen un riesgo ambiental. Los resultados finales dependen de la combinación particular entre estas, la forma de interacción entre especies; así como el microambiente o en las condiciones nutricionales del sustrato en colonización (Chi *et al.* 2007; Bader *et al.* 2010).

Recientemente han surgido estudios con fuentes de carbono distintas a los azúcares reductores como lo es el glicerol. El glicerol (1,2,3-propanetriol, también conocido como glicerina) es el principal producto secundario obtenido de la transesterificación de aceites vegetales, y grasas animales. El glicerol es abundante en la naturaleza, debido a que es el componente estructural de muchos lípidos. Siendo uno de los principales solutos compatibles, producido en respuesta al decremento de actividad de agua extracelular durante la osmoregulación de las levaduras. Muchos microorganismos conocidos pueden utilizar el glicerol como única fuente de carbono y

energía. El glicerol puede sustituir a muchos de los carbohidratos tradicionales, como la sacarosa, glucosa y almidón, en procesos de fermentación industrial. Ya que el glicerol puede ser usado como fuente de carbón en microbiología industrial, le da un valor agregado a la cadena de producción de biodisel contribuyendo a incrementar su competitividad (da Silva *et al.* 2009).

### **1.3.2 Enzimas Ligninolíticas**

Los principales microorganismos responsables de la degradación de la lignocelulosa son hongos, los cuales han sido clasificados en hongos de podredumbre blanca, hongos de podredumbre marrón y hongos de la podredumbre suave. La degradación de los compuestos lignocelulósicos está relacionada con la presencia de LiP, MnP, versátil peroxidasa y Lcc. En los hongos de podredumbre blanca se ha identificado la presencia de celobiosa dehidrogenasa, glioxal oxidasa, aril-alcohol oxidasa, oxalato decarboxilasa, NAD-dependiente formato dehidrogenasa, P450 monooxigenasa, glutathiona reductasa, cobre radical oxidasa, isoamil alcohol oxidasa, peroxirredoxina, benzoquinona reductasa, isoamil alcohol oxidasa, peroxiredoxinas, benzoquinona reductasa, piranosa 2-oxidasa, multicobre oxidasa, glutathiona S-transferasa, glucosa oxidasa y manganeso superóxido dismutasa (Manavalan *et al.* 2015). Existen diferentes métodos para obtener enzimas, como el aislamiento a partir de microorganismos presentes en el ambiente, modificaciones genéticas, ingeniería de proteínas y modificaciones químicas (Asgher *et al.* 2014). Las Lcc son oxidoreductasas de proteínas N-glicosiladas con cuatro átomos de Cu cuyo peso molecular varía de 38

a 150 kDa, óptima temperatura de 30 a 70 °C y pH de 2 a 10 (Manavalan *et al.* 2015). Estas enzimas poseen su baja especificidad por el sustrato con un potencial redox de 1.5 a 1 V, se ha encontrado evidencia del incremento en su síntesis como respuesta al estrés oxidativo ocasionada por la presencia de otros microorganismos (Baldrian, 2004; Mogharabi y Faramarzi, 2014). Las Lcc más estudiadas han sido obtenidas de *Agaricus busporus*, *Podospora anserina*, *Rhizoctonia praticola*, *Trametes versicolor*, *Pholiota aegerita*, *Pleurotus ostreatus*, *Coriolus hirsitus* y *Neurospora crassa*. La mayoría de los hongos producen enzimas intra y extra celulares. Algunos compuestos que incluyen a fenoles sustituidos, aminas, ácidos benzoicos pueden inducir la síntesis de Lcc en hongos que no la producen en su ausencia (Yaropolov *et al.* 1994). Elementos de transición como el manganeso o compuestos fenólicos son frecuentemente necesarios para la expresión de Lcc en hongos (Zhang *et al.* 2006; Bader *et al.* 2010). Esta enzima a la par con la oxidasa citocromo C, ceruplosmina, y ascorbato oxidasa cataliza la reducción de oxígeno molecular por varios compuestos orgánicos a agua, sin la formación de peróxido de hidrógeno (Yaropolov *et al.* 1994). En el estudio realizado por Baldrian (2004), la actividad Lcc se incrementó inmediatamente después de la adición de *Trichoderma harzianum* a un cultivo de 11 días de *T. versicolor*, alcanzando 45 U/L en el día 13, comparado con 1 U/L del control. Las actividades de Lcc se incrementaron significativamente en los cultivos mixtos. Sin embargo, no se observó la presencia de isoenzimas de Lcc distintas a las del cultivo puro de *T. versicolor*. En ensayos realizados con *Endmyces magnussi*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* se observó un incremento en menor proporción de la actividad Lcc, comparado con el presentado en hongos filamentosos. La Lcc pura no presento un efecto inhibitorio en el crecimiento de *B. subtilis* ó *E. coli*.



De entre las enzimas ligninocelulolíticas en el trabajo de Chi *et al.* (2007), la Lcc presentó la respuesta más rápida superando las 2000 U/L en el co-cultivo de *Ceriporiopsis subvermispota* CZ-3 y *P. ostreatus* B6. Las mayores actividades fueron obtenidas de 7 a 10 días de crecimiento, después de lo cual la actividad declino en la mayoría de los cultivos. Se observó cambios en la composición de la isoforma de las enzimas degradadoras de lignina, lo cual puede indicar una regulación diferencial en la expresión de peroxidasas degradadoras de la lignina ocasionado por estrés químico, como ROS en la interface de interacciones específicas (Chi *et al.* 2007). La Lcc puede catalizar la oxidación de varios compuestos, incluyendo los *o,p*-difenoles, aminofenoles, polifenoles, poliamidas, lignina, algunos iones orgánicos y aril diaminas. También cataliza la desmetilación de la lignina y ácidos metoxifenólicos. El segundo sustrato de la reacción es oxígeno molecular. La Lcc puede catalizar con igual eficiencia la oxidación de ácido ascórbico y fenol. A diferencia de reacciones catalizadas por otras oxidoreductasas, el oxígeno es reducido directamente a agua por un mecanismo de cuatro electrones. Compuestos como halidos, acetato, entre otros han probado inhibir la Lcc, la cual es también afectada por la fuerza iónica (Yaropolov *et al.* 1994).

La MnP es una glicoproteína extracelular con un grupo prostético que posee una protoporfirina de hierro IX (homo) y es secretada como múltiples isoformas con pesos moleculares variando entre 32 y 62.5 kDa, de un pH óptimo de 4 a 7 y temperatura de 40 a 60 °C. La MnP usa como sustratos compuestos fenólicos siendo completamente inhibida en presencia de  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Ag^{+}$ , lactato,  $NaN_3$ , ácido ascórbico, beta-mercaptoetanol y ditreitol (Manavalan *et al.* 2015). En el cultivo mixto de *Cytisus hisutus* y *Cerrena maxima* (en donde las enzimas predominantes en los hongos son

Lcc y MnP, respectivamente), no presento incremento en la producción de ninguna de las enzimas comparado con los monocultivos usando como fuente de carbono glucosa (Koroleva *et al.* 2002). En contraste, la producción de MnP ha sido estudiada en el cultivo mixto de *P. radiata* y *D. squalens*, en donde se presentó la mayor producción usando como fuente de carbono mazorca de maíz a los 9 días de incubación (Dong *et al.* 2012).

### **1.3.3 Atrapamiento de enzimas en gel**

A pesar de las extensivas aplicaciones de las enzimas ligninocelulolíticas; su uso en procesos industriales es limitado por sus altos costos de producción, inestabilidad, disponibilidad, susceptibilidad al ataque de proteasas e inhibición por intermediarios en procesos de producción. La inmovilización incrementa la estabilidad y reduce el costo de las enzimas, por lo que se ha estudiado como una importante alternativa para mejorar procesos selectivos en catálisis ambiental. La inmovilización permite el desarrollo de procesos continuos, lo anterior reduce costos de operación llevando a la automatización y disminución de la razón de inversión/capacidad (Asgher *et al.* 2014). Los procesos de inmovilización incluyen: enlaces covalentes, adsorción, inmovilización en polímeros nanofibrosos/nanopartículas, agregados de enzimas entrecruzados y atrapamiento. En el atrapamiento, la enzima está adherida a la superficie del material sólido por medio de interacciones iónicas, fuerzas de Vander Waals y enlaces de hidrógeno. La adsorción no implica una reacción química; sin embargo, el sitio activo de la enzima puede ser bloqueado por la matriz reduciendo la actividad de la enzima.

El atrapamiento en gel es preferido debido a su fácil preparación, costo y estabilidad de los derivados. Los dos tipos de soporte que son usados comúnmente en la inmovilización de enzimas son biomateriales hidrofóbicos e hidrófilos (Asgher *et al.* 2014). Los geles producidos a partir de polímeros naturales como el ácido hialurónico, alginato y heparina, han encontrado una amplia aplicación médica en la regeneración de tejidos debido a su interacción con las células (Vermonden y Klumperman, 2015). Los geles basados en polímeros naturales están conformados por polisacáridos y proteínas formados de monosacáridos de enlaces glucosídicos y uniones de aminoácidos por enlaces peptídicos, respectivamente. Los geles de polímeros naturales; especialmente de polisacáridos, son en general no tóxicos y biodegradables (Ahmed, 2015). El termino alginato describe a un grupo de polisacáridos lineares de uniones ácido 1,4  $\beta$ -D manurónico (G) y  $\alpha$ -L gulorónico (M) obtenidos de algas café y bacterias. El alginato presenta arreglos en bloques de homopolímeros (MM, GG) o en bloques alternos de M y G, entrecruzadas por iones divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) que unen los ácidos gulorónicos transformándolo en un hidrogel (Gombotz y Wee, 2012; Dragan, 2014). En el caso de las secuencias G-G enlazadas por iones  $\text{Ca}^{2+}$ , debido a la repulsión de entre los grupos carboxílicos presentan un orden geométrico de caja de huevo inclinada (Gambotz y Wee, 2012).

Un hidrogel es un gel polimérico macromolecular construido de una red tridimensional de cadenas poliméricas entrecruzadas producto de la reacción de uno o más monómeros (Maitra y Shukla, 2014; Ahmed, 2015; Vermonden y Klumperman, 2015). En general, los tres factores determinantes en la preparación de hidrogeles son el monómero, iniciador y agente entrecruzante (Ahmed, 2015). La adición de agentes

entrecruzantes en las cadenas poliméricas afecta las propiedades físicas del polímero dependiendo del grado de entrecruzamiento, presencia o ausencia de cristalinidad. El grado de entrecruzamiento disminuye la viscosidad, afecta el hinchamiento y transporte de moléculas, así como la insolubilidad del polímero debido a que forma cadenas unidas por enlaces covalentes (Maitra y Shukla, 2014). El entrecruzamiento puede ser físico o químico; y da al hidrogel una estructura tridimensional, haciéndolo insoluble. Lo anterior permite la inmovilización efectiva y liberación de agentes activos y biomoléculas. Los hidrogeles pueden ser clasificados en dos grupos basados en su origen (naturales o sintéticos), de acuerdo al método de preparación (homopoliméricos, copoliméricos, y multipoliméricos), estructura física y composición química (amorfos, semi-cristalinos y cristalinos), tipo de entrecruzamiento (químico o físico) o basados en la presencia de cargas eléctricas en las cadenas entrecruzadas (no-iónicos, iónicos, electrolitos anfotéricos y zwitteriónico) (Ahmed, 2015).

En el entrecruzamiento químico, los hidrogeles son sintetizados por polimerización de crecimiento de cadena, polimerización de adición y condensación, así como polimerización por haz de electrones y rayos gama. En el entrecruzamiento físico los hidrogeles son sintetizados por interacciones iónicas, cristalización, formación de estereo complejos, polisacáridos hidrófobos, interacción de proteínas y enlaces de hidrógeno (Maitra y Shulka, 2014; Ahmed, 2015). Los entrecruzamientos físicos presentan uniones transitorias, suficientemente fuertes para hacer a los hidrogeles insolubles en medios acuosos dando origen a hidrogeles reversibles. Los hidrogeles basados en proteínas pueden formarse por gelación térmica, y sus propiedades mecánicas pueden mejorarse usando agentes entrecruzantes como el glutaraldehído (Maitra y Shukla, 2014). Las características ideales de los hidrogeles incluyen una alta

capacidad de adsorción, tasas de adsorción adecuadas a su aplicación en función del tamaño y porosidad, la mayor absorbencia bajo presión, el menor contenido de monómeros residuales solubles, un bajo costo, alta durabilidad y estabilidad, alta biodegradabilidad sin que se produzcan especies tóxicas, pH neutral después de hinchase en agua, incoloro, inodoro, estabilidad fotolítica, y capacidad de regeneración (Ahmed, 2015).

#### **1.4 Tratamiento de oxidación avanzada para la remoción de PHE**

Los procesos de oxidación avanzada son tecnologías que están evolucionando constantemente y que han demostrado ser eficientes en la remoción de contaminantes altamente estables y poco biodegradables en el tratamiento de agua (Singh *et al.* 2016). En años recientes estos procesos han recibido gran atención debido a su potencial para el tratamiento de microcontaminantes como hormonas, productos farmacéuticos, productos de cuidado personal y HAPs. Los procesos fotocatalíticos en donde es usado  $\text{TiO}_2$ , han probado la tendencia de HAPs a depositarse en la superficie, lo que incrementa sus probabilidades de ser oxidados (Singh *et al.* 2016). La degradación de PHE ha sido reportada por Sirisaksoontorn *et al.* (2009) con  $\text{TiO}_2$  dopado con N obteniendo un 80% de degradación en 8 h bajo el espectro de la luz visible en un sistema MeOH/H<sub>2</sub>O (3:1). La deposición de PHE, en la superficie de  $\text{TiO}_2$  Degussa irradiado con luz UV (< 410 nm) alcanzó un 40.1% de transformación de PHE a CO<sub>2</sub> en la investigación de Lin y Valsaraj (2003). La eficiencia en la transformación de microcontaminantes durante los tratamientos oxidativos del agua depende de la

reactividad del oxidante sobre éstos y sobre los componentes de la matriz de agua como es la materia orgánica disuelta (Lee y von Gunten, 2012).

La investigación científica en fotocatalizadores heterogéneos inició desde principios de los años 70. Algunas de las ventajas de catálisis heterogénea sobre la regeneración de sorbentes son: 1) no se requiere un postratamiento, ya que los contaminantes orgánicos pueden ser mineralizados a formas no tóxicas y productos secundarios como H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> o ácidos minerales, 2) la posibilidad de ser activados por energía solar reduce el costo de energía, 3) posible regeneración en el sitio de adsorbentes y destrucción de materia orgánica adsorbida, y 4) pérdidas reducidas de adsorbentes, debido a desgaste o incineración que puede ocurrir en la regeneración térmica (Zhang *et al.* 2009). Los catalizadores en polvo presentan aplicaciones limitadas debido a que la caída de presión se convierte en un importante problema cuando la densidad del polvo de empaque es muy alta (Kou *et al.* 2007).

#### **1.4.1 Mecanismo fotocatalítico TiO<sub>2</sub>/UV**

El TiO<sub>2</sub> presenta una buena estabilidad química y alta actividad fotocatalítica. Sin embargo, sólo puede utilizar de un 3 a 5% de la energía solar que toca la superficie del planeta (Chen *et al.* 2009), ya que la mayoría de la luz UV es filtrada por la capa de ozono (Wu y Chen, 2004). Puede ser usado como antibacterial debido a su fuerte actividad oxidativa y superhidrofilicidad. El TiO<sub>2</sub> muestra una alta reactividad y estabilidad química bajo luz UV ( $\lambda < 387$  nm), cuya energía excede la banda prohibida de 3.4 eV en su fase cristalina anatasa. En la estructura anatasa, los átomos de Ti

están localizados en los sitios octahedricos. Las especies de estructura rutila (3.0 eV) generan menos portadores cargados que la anatasa con el mismo tamaño de partícula y propiedades reactivas de superficie (Zhang *et al.* 2009).

El mecanismo fotocatalítico es iniciado por la adsorción de un fotón  $h\nu_1$  con una energía igual o mayor a la banda prohibida produciendo un par de electrón-hueco en la superficie de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  (Figura 1.3).

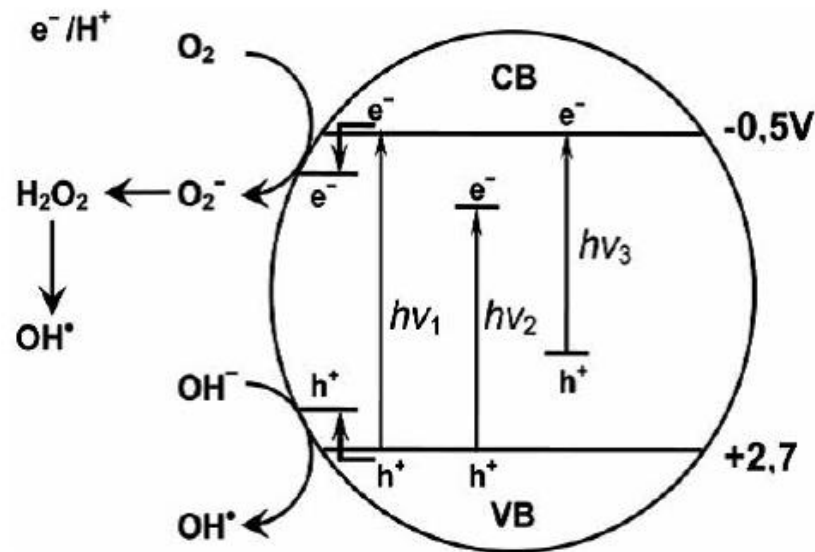


Figura 1.3 Mecanismo de fotocatalisis  $\text{TiO}_2$  (Zaleska, 2008).

Un electrón se promueve a la banda de conducción (CB), mientras que un hueco positivo se forma en la banda de valencia (VB). Los electrones en estado excitado y huecos pueden recombinar y disipar la energía entrante como calor, ser atrapados en estados de superficie metaestable, o reaccionar con donadores de electrones y aceptores de electrones absorbidos en la superficie del superconductor o dentro de la doble capa eléctrica de las partículas cargadas. Después de la reacción con agua,

estos huecos pueden producir radicales hidroxilos con un alto potencial de oxidación redox. Dependiendo de las condiciones los huecos, radicales  $OH^\cdot$ ,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y  $O_2$  juegan importantes roles en los mecanismos de reacción (Zaleska, 2008; Landmann *et al.* 2012).

El mecanismo de  $TiO_2$  sobre compuestos orgánicos disueltos sigue los siguientes pasos (Zhang *et al.* 2009):

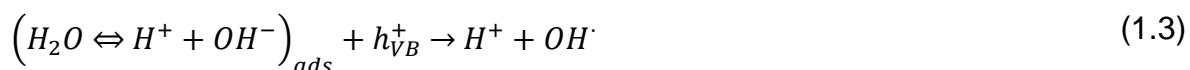
1 Adsorción eficiente de fotones ( $h\nu \geq EG = 3.2e$ ) por  $TiO_2$  (Ecuación 1.1).



2 Adsorción de iones por el  $O_2$  (primer paso en la reducción de oxígeno, el grado de oxidación del oxígeno pasa de 0 a -1/2) (Ecuación 1.2).



3 Neutralización de los grupos  $OH^-$  por fotohuecos que producen los radicales  $OH^\cdot$  (Ecuación 1.3).

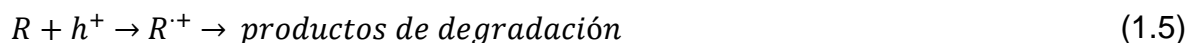


4 Oxidación de reactivos orgánicos vía oxidación sucesiva de radicales  $OH^\cdot$  (Ecuación 1.4).



5 Oxidación directa por oxidación con los huecos (Ecuación 1.5).





Dado que el proceso de fotocatalisis ocurre en la superficie del material semiconductor bajo la irradiación de fotones, se distinguen tres fases principales: excitación, difusión en el entramado cristalino y transferencia a la superficie de los portadores cargados fotoinducidos. El crecimiento del cristal, dopado y eteroestructuración del semiconductor fotocatalítico tiene una influencia substancial en el rango de respuesta a la luz, los potenciales redox de los portadores cargados fotoinducidos y la separación entre el entramado cristalino y la superficie (Liu *et al.* 2010). Para mejorar la actividad catalítica del TiO<sub>2</sub>, uno de los métodos se basa en alterar la microestructura de las partículas a través del área superficial, la fase cristalina, el tamaño del cristal y la morfología de partículas individuales. El otro método, se basa en la modificación del TiO<sub>2</sub> involucrando el dopaje con iones metálicos o no metálicos, colorantes de sensibilización y acoplamiento con semiconductores (Zaleska, 2008).

El radical  $OH^{\cdot}$  reacciona muy rápido con cualquier tipo de grupo funcional incluyendo las uniones alifáticas  $C - H$ , reacciona con compuestos orgánicos en cuatro formas: 1) por medio de la adición a una olefina o sistema aromático, 2) abstracción de un átomo de hidrógeno a un átomo de carbón, 3) reacciones de transferencia de electrones y 4) reacción con azufre, nitrógeno o fracciones de fósforo. Algunos de los valores de  $k_{OH}$  de  $3 \times 10^9$  a  $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  se observan en compuestos con anillos aromáticos u olefinas con un donador de electrones e incluso con la separación de sustituyentes de electrones débiles, grupos alifáticos con múltiples átomos de H que pueden ser fácilmente abstraídos, y fracciones orgánicas sulfúricas o aminas. Muchos de los

microcontaminantes orgánicos llenan estos criterios. Los microcontaminantes que presentan baja reactividad con  $OH^\cdot$  son generalmente de un peso menor a los 200 Da. La baja eficiencia en la eliminación de microcontaminantes por  $OH^\cdot$  se puede deber a la presencia de materia orgánica disuelta y carbonatos (Lee y von Gunten, 2012). La desactivación del  $TiO_2$  ha sido observada con sales inorgánicas ( $Cl^- > HCO_3^- > CO_3^{2-} > SO_4^{2-} > NO_3^-$ ), ya que la adsorción de iones está en competencia con la adsorción del contaminante afectando el desempeño del sistema (Räilaenu *et al.* 2013).

#### **1.4.2 Síntesis y dopaje del $TiO_2$**

El método sol-gel es empleado para la síntesis de películas delgadas y nanopartículas. El proceso ha demostrado ser especialmente útil para la modificación de las superficies, ya que permite un alto grado de control de la porosidad. El método sol-gel incorpora varios pasos entre los que se encuentran la hidrólisis, condensación y polimerización. Los precursores para el método sol-gel se basan en compuestos órgano-metálicos (Tsakalacos *et al.* 2003). La incorporación de un dopante activo en la solución durante el estado de gelación permite que el dopaje de elementos tenga interacción directa con el soporte, por lo que el material posee propiedades catalíticas o fotocatalíticas. Algunos de los precursores del titanio usados son el isopropóxido de titanio, butóxido de titanio y tetracloruro de titanio. Estos agentes son mezclados con un dopante disuelto en alcohol, seguido por una hidrólisis llevada a cabo a temperatura ambiente o altas temperaturas. El precipitado es secado usualmente a temperaturas

que van de 80 a 100 °C, pulverizado para obtener un xerogel y calcinado en aire en temperaturas que van de los 200 a los 600 °C (Zaleska, 2008).

El dopaje puede ejercer sustancial influencia en la estructura electrónica y la construcción de estructuras heteroatómicas superficiales que permitan una alta eficiencia fotocatalítica bajo radiación solar. Los estados químicos y la localización de los dopantes son considerados factores clave en el ajuste de la distribución espectral de los estados electrónicos inducidos de esos dopantes y la reconstrucción favorable de la superficie. Comparado con los semiconductores fotocatalíticos de una sola fase, los sistemas híbridos con dos o más semiconductores poseen mayores ventajas en el uso eficiente de la luz solar como resultado de la combinación de diferentes estructuras electrónicas (Liu *et al.* 2010).

En el caso de los componentes no metálicos estos pueden reducirse durante el proceso de calcinación, por lo que la fotoactividad tiende a decrecer. Los iones dopados con metales pueden mejorar la eficiencia cuántica inhibiendo la recombinación de electrones y huecos fotogenerados, actuando como trampas de electrones que expanden el rango de absorción de la luz y mejoran el potencial redox de los radicales fotogenerados. La fotoactividad en la luz visible del TiO<sub>2</sub> dopado puede ser explicada por un nuevo nivel de energía producida en la banda prohibida de TiO<sub>2</sub> por la dispersión de nanopartículas metálicas en la matriz del TiO<sub>2</sub> (Zaleska, 2008).

La plata ha sido usada como agente dopante en el SiO<sub>2</sub>, ZrO y TiO<sub>2</sub>, estos materiales actúan como matrices para el crecimiento de nanopartículas. Las partículas de plata se acumulan en la superficie, generando pares electrón-hueco en la región superficial y una menor transferencia de electrones a la plata. La acumulación de huecos en la banda de valencia lleva a la producción radicales superóxido e hidroxilo vinculados

con la degradación de compuestos orgánicos. El sistema Ag/TiO<sub>2</sub> puede suprimir de manera eficiente la recombinación de portadores foto-generados mejorando la actividad fotocatalítica e incrementar la sorción de compuestos orgánicos entre los que se encuentran colorantes, ácidos orgánicos, fenol y gases como el H<sub>2</sub>S y N<sub>2</sub>O (Epifani *et al.* 2000; Tryba *et al.* 2010; Xu *et al.* 2012). La incorporación de C en TiO<sub>2</sub> irradiado en luz visible, ha reportado una oxidación superior de clorofenol a la de TiO<sub>2</sub>-C-W (Kawahara *et al.* 2005).

### **1.4.3 Fotocatálisis heterogénea**

A diferencia de las técnicas convencionales que transfieren los contaminantes de una fase a otra, los tratamientos de oxidación avanzada permiten llegar hasta la oxidación a CO<sub>2</sub>, mientras otros elementos unidos a compuestos orgánicos son convertidos a aniones, como el nitrato, sulfato o cloruro. Los tratamientos de catálisis heterogénea inmovilizados minimizan los problemas de disposición de materiales sólidos peligrosos, sin que su eficiencia se vea comprometida por la presencia de compuestos en el medio como sucede con los tratamientos biológicos (Murkherjee y Ray, 1999).

Los tres componentes principales de una reacción de fotocatalisis heterogénea son: un fotón (en la apropiada longitud de onda), una superficie catalítica (usualmente un material semi-conductor) y un fuerte agente oxidante (en muchos casos oxígeno). Las reacciones fotocatalíticas son resultado de una serie de eventos que inician con la formación de un par electrón-hueco. Lo anterior lleva al uso del par electrón-hueco en procesos de oxidación y eventualmente a la captura de electrones en procesos de

reducción, así como a la potencial formación de aniones superóxido y peróxido de hidrógeno del oxígeno. La competencia por la recombinación de los electrones y pares electrón-hueco resulta en procesos ineficientes y en el desperdicio de energía aportado por el fotón (Mukherjee y Ray, 1999; De Lasa *et al.* 2005).

En un fotoreactor además de las complicaciones convencionales de reactores químicos (tiempo de contacto del catalizador-reactante, patrones de flujo, mezclado, transferencia de masa, cinéticas de reacción, instalación del catalizador, control de temperatura, entre otros), la iluminación del catalizador se convierte en algo relevante. La clasificación de los reactores fotocatalíticos para el tratamiento de agua varía entre: el estado del catalizador (el catalizador puede ser libre o fijado a un soporte), el tipo de iluminación (lámparas UV monocromáticas o luz solar) y la posición de la fuente de irradiación (fluente inmersa, fuente externa o fuentes distribuidas por medio de reflectores). Existen tres tipos de lámparas UV monocromáticas: de baja presión de mercurio (tiempo de vida > 5000 h), presión media de mercurio (tiempo de vida > 2000 h), y alta presión de mercurio (tiempo de vida >3000 h). Sin fotones con un apropiado contenido energético, el catalizador no muestra actividad alguna. La iluminación se convierte en un factor determinante, ya que la cantidad de catalizador que puede ser activado por adsorción de la luz determina la capacidad de tratamiento del reactor. En el caso de la fase anatasa del  $\text{TiO}_2$  requiere de fotones de energía superior a 3.2 eV ( $\lambda < 380 \text{ nm}$ ) para iniciar la formación del par electrón-hueco. Lo anterior resulta en requerimientos de energía de 1 a 5  $\text{W/m}^2$ , siendo la penetración de la luz en un 0.5% (p/v) de un catalizador en suspensión de 0.02 m (Mukherjee y Ray, 1999; De Lasa *et al.* 2005).

La carga superficial del catalizador beneficia los procesos de sorción, mejorando el proceso de degradación; como fue descrito por Alkaim *et al.* (2013) en la remoción de EDTA empleando TiO<sub>2</sub> Degussa. La eficiencia fotónica del catalizador alcanza un máximo en donde el incremento del mismo no afecta la degradación. El incremento en la cantidad de catalizador puede llegar a reducir la eficiencia fotónica del mismo debido a fenómenos como: el decline en la penetración de la luz por el aumento de la opacidad en la suspensión, el incremento de la dispersión de la luz y la disminución de los sitios activos en la superficie ocasiona por la aglomeración partícula-partícula.

Los reactores en lote son usados en operaciones en pequeña escala, para probar procesos que no han sido desarrollados completamente, la manufactura de productos costosos y en procesos que son difíciles de llevar a operación continua. En muchos de los reactores en lote, el tiempo de permanencia del reactante influye en su conversión a producto hasta alcanzar el equilibrio o el reactante sea agotado (Fogler, 1999). Una de las principales limitaciones para el escalamiento de reactores fotocatalíticos es el tamaño, siendo los reactores con fuente de luz UV inmersa los que presentan mayores posibilidades para su escalamiento pese a que la lámpara ocupa el 75% del volumen del reactor. Debido a lo anterior, el tiempo de residencia del contaminante dentro del fotoreactor influye en la degradación. En el caso de la remoción de clorofenoles empleando TiO<sub>2</sub> Degussa, la disminución la velocidad de flujo (600 mL/min en un reactor tubular de 510 mL con fuente de luz externa de 352 nm) alcanzó la remoción a las 14 h, siendo la cantidad de COT alcanzada de 15 mg/L (Suryaman y Hasegawa, 2010). En el tratamiento de PHE como contaminante modelo empleando TiO<sub>2</sub> Degussa en un reactor de fuente de luz UV externa en lote, alcanzó la remoción del mismo

después de 77 pases a una velocidad de 7.26 mL/min equivalente a 400 min (Lin y Valsaraj, 2013).

El oxígeno actúa como un agente reductor, este puede influir en la velocidad de reacción. En un experimento llevado a cabo con oxígeno al 99.99% usando  $\text{TiO}_2$  dopado con platino y nitrógeno teniendo como contaminante modelo al benceno alcanzo conversiones inferiores al de una atmósfera con  $\text{O}_2\text{-H}_2$  mejorando la actividad fotocatalítica en luz visible (Li *et al.* 2008).

## 2 JUSTIFICACIÓN

Los tratamientos de aguas residuales convencionales producen agua con poco potencial de reúso y no están diseñadas para remover los contaminantes orgánicos persistentes. Estos compuestos ocasionan efectos adversos a los ecosistemas y la salud pública. Por tal motivo es necesario encontrar alternativas de tratamiento capaces de removerlos.

El uso de sistemas biológicos en los que el mecanismo de remoción de contaminantes se basa en la acción de enzimas de baja especificidad ha demostrado ser eficiente en la transformación de estos contaminantes. Mientras que los sistemas fotocatalíticos se han caracterizado por su gran capacidad de degradación de bajas concentraciones. Sin embargo, ambos sistemas están limitados por interferentes presentes en las matrices acuosas. De ahí la importancia de entender los mecanismos por los cuales se lleva a cabo la transformación de contaminantes y establecer configuraciones que favorezcan la mineralización y extiendan la actividad catalítica de ambos sistemas.

En este trabajo se propuso el desarrollo de un proceso acoplado aplicando una tecnología enzimática y fotocatalítica para obtener agua tratada usando al fenantreno como modelo.



### 3 HIPÓTESIS

El acoplamiento de la actividad enzimática producida por *T. maxima* (y estimulada por su cultivo mixto con *P. carneous*) en un extracto crudo con un tratamiento fotocatalítico con TiO<sub>2</sub> (dopado con plata), alcanzará los límites máximos permisibles de 6 µg/L de fenantreno en agua.

### 4 OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

Evaluar el acoplamiento de la actividad enzimática producida por *T. maxima* (y estimulada por su cultivo mixto con *P. carneous*) en un extracto crudo con un tratamiento fotocatalítico con TiO<sub>2</sub> (dopado con plata), para remover PHE en agua.

#### 4.1.1 Objetivos específicos

- Establecer si un inductor biológico (*P. carneous*) favorece la actividad Lcc en *T. maxima*.
- Determinar la correlación entre la actividad enzimática y la degradación de PHE.
- Evaluar la efectividad del tratamiento fotocatalítico con nanopartículas de TiO<sub>2</sub> dopado con carbono y plata para la degradación de PHE.
- Evaluar la remoción de PHE en el sistema enzimático/fotocatalítico.

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se estudio la degradación de fenantreno (PHE) por un extracto enzimático crudo obtenido del cultivo mixto de *Trametes maxima* (*T. maxima*) con *Paecilomices carneous* (*P. carneous*) inmovilizado en perlas de alginato acoplado a un proceso fotocatalítico con  $\text{TiO}_2$  modificado con C y Ag. El desarrollo de la investigación realizó en tres etapas (Figura 5.1).

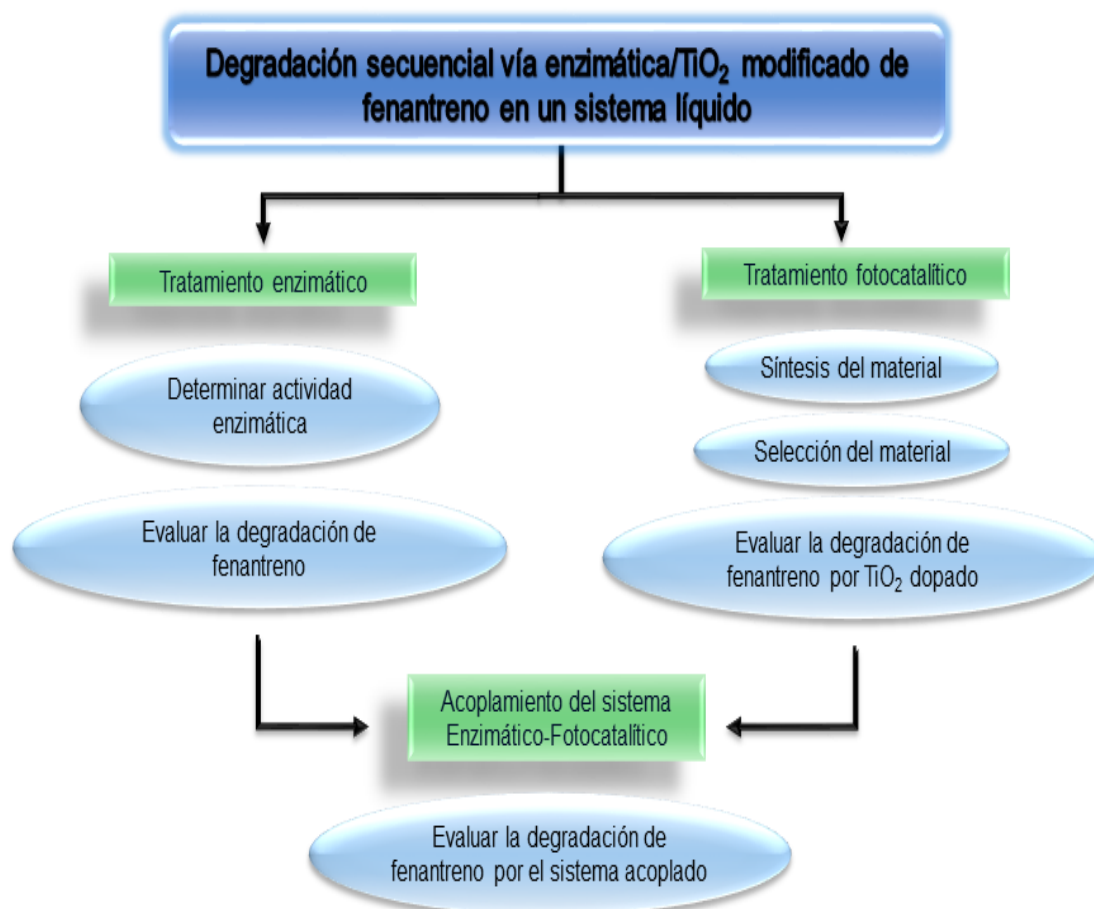


Figura 5.1 Método para la degradación secuencial vía enzimática/TiO<sub>2</sub> modificado de PHE en un sistema líquido

En la primera etapa se evaluó la actividad catalítica del sistema enzimático de la cepa de *T. maxima* usando un medio sintético para favorecer la producción de enzimas, de las cuales se ensayaron las enzimas ligninolíticas: lacasa (Lcc) y manganeso peroxidasa (MnP). La mezcla enzimática fue inmovilizada por atrapamiento en gel usando alginato. Los aerogeles obtenidos fueron empacados en una columna de lecho fijo para la degradación de PHE en presencia de agentes solubilizantes dimetil sulfoxido (DMSO) y monooleato de polioxietileno sorbitán (TW80). En la segunda etapa, se llevó a cabo la síntesis, caracterización y evaluación del proceso de fotocatalisis heterogénea con TiO<sub>2</sub> dopado con C y Ag en la remoción de soluciones de PHE de concentración conocida. La tercera etapa del proyecto, empleó los resultados obtenidos de la primera y segunda etapa para la configuración del tratamiento enzimático-fotocatalítico.

## **5.1 Tratamiento de PHE por el sistema enzimático**

En esta sección se describen las estrategias empleadas para incrementar la producción de las enzimas Lcc y MnP por *T. maxima* en condiciones estériles a temperatura ambiente. Las condiciones evaluadas para la síntesis enzimática de un cultivo mixto con el hongo *P. carneous* en medios de crecimiento con abundante fuente de carbono a nivel matraz. La técnica empleada para la precipitación de enzimas crudas y la configuración del sistema para evaluar la degradación de PHE.

### **5.1.1 Preparación del inóculo**

Las cepas *T. maxima* (GenBank HF947516) y *P. carneous* (GenBank HF947521) fueron aisladas de la parte central de Veracruz en los municipios de Tlalnehuayocan y Huatusco, respectivamente. Las cepas fueron donadas por el Cepario del INECOL. Se mantuvieron en agar papa dextrosa (DB Bioxin) a 4 °C hasta el momento de su inoculación.

El medio de pH 4.6 para inducir la producción de enzimas ligninolíticas fue modificado de lo establecido por Revankar y Lele, (2007), en donde se agregaron: fuente de carbono en las concentraciones indicadas en cada experimento, extracto de levadura 2.5 g/L (BD bacto), H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g/L (J. T. Baker), (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> 0.05 g/L (99%, J. T. Baker), MgSO<sub>4</sub> 0.5 g/L (99%, J. T. Baker), CaCl<sub>2</sub> 0.01 g/L (96%, J. T. Baker), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g/L (99%, J. T. Baker), MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.001 g/L (98%, J. T. Baker), ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001 g/L (99%, J. T. Baker) y CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.002 g/L (99%, J. T. Baker).

### **5.1.2 Efecto de un inductor biológico en la producción de enzimas**

La inoculación de *T. maxima* se realizó con 4 discos de 5 mm de diámetro (los discos fueron tomados de hongo crecido en PDA), en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 240 mL del medio modificado reportado por Revankar y Lele (2007). En el cultivo mixto se inoculó a *P. carneous* después de 48 h de crecimiento de *T. maxima*. Los matraces se incubaron a 28 °C y 120 rpm, de los cuales se tomaron muestras de 4 mL diariamente en diferentes intervalos de tiempo en un periodo de 10 días. La muestra

obtenida fue centrifugada a 6000 rpm por 20 min para remover el micelio. Posteriormente, se evaluó la actividad de Lcc y MnP, el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, azúcares reductores, y proteínas como se describe en el Anexo A en un espectrofotómetro Shimadzu UV 1800.

En las primeras pruebas se evaluó en como fuente de carbono 20 g/L de glucosa (Dextrosa anhidra, grado reactivo, J. T. Baker) en los cultivos mixtos. Con base en los resultados obtenidos se probó glicerol (99.5%, J. T. Baker) como fuente de carbono en los cultivos mixtos. En los experimentos con glicerol se estableció un diseño factorial 2<sup>2</sup> (Tabla 5.1). Una vez que se determinaron los parámetros que favorecen la producción de Lcc en medio líquido, el sobrenadante obtenido fue precipitado con acetona y usado directamente como fuente de enzimas extracelulares.

Tabla 5.1. Diseño experimental 2<sup>2</sup>

<b>Factores</b>	<b>Niveles</b>
Inóculo	1:1: y 1:2
Cantidad de fuente carbono	15 y 20 g/L

El uso de cultivos mixtos ha sido reportado como un mecanismo inductor de la síntesis de Lcc; que pudiera llegar a sustituir el uso de compuestos químicos. Con este diseño experimental se buscó determinar el efecto de la cepa de *P. carneous* en el incremento de la actividad Lcc. Los niveles del inóculo corresponden a *T. maxima* y *P. carneous* en una proporción de discos 1 a 1 (1:1); y 1 a 2 (1:2). Todos los experimentos se realizaron por duplicado. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI Versión 16.1.03 y Desing-Expert Versión 6.0.8, los

resultados se muestran en el Anexo B. El programa Origin Pro 8.1 SR3 v8.1.34.90 fue usado para graficar los datos obtenidos.

### **5.1.3 Efecto del pH en la producción de enzimas**

El efecto del pH en la actividad enzimática, se evaluó empleando soluciones amortiguadoras de citratos pH  $5.6 \pm 0.17$ , acetatos  $3.7 \pm 0.14$  y citratos-fosfatos  $2.8 \pm 0.06$  preparadas con reactivos J. T. Baker. Los matraces se incubaron a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 120 rpm. Se tomaron muestras de 5 mL en intervalos de 48 h, en un periodo de 18 días. Las muestras obtenidas fueron filtradas con papel filtro de poro fino para remover el micelio, se realizaron los análisis descritos en el Anexo A y se monitoreo el pH.

### **5.1.4 Precipitación e inmovilización de enzimas**

El seguimiento del crecimiento en los monocultivos y cultivo mixtos por 240 h fue cuantificado por peso seco ( $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h) una vez lavada la biomasa con agua destilada, usando papel filtro de poro fino y dejando el papel con el micelio 1 h en el desecador antes de pesar la biomasa seca. La producción de enzimas en el cultivo mixto con 20 g/L de glicerol y proporción de inóculo 1:1 fue seguida por 432 h, registrando los cambios en pH, proteínas, actividad enzimática (Lcc y MnP), y  $\text{H}_2\text{O}_2$  de acuerdo a lo establecido en el Anexo A.

La muestra obtenida a los 15 días de incubación fue filtrada con papel filtro de poro fino para remover el micelio; posteriormente, se evaluó la actividad de Lcc y MnP,

proteínas de acuerdo a lo establecido en el anexo A. La muestra fue almacenada a 4.0 °C en frascos ámbar en condiciones estériles con la adición del inhibidor para proteasas cOmpleteMini™ de la marca Roche (100 µL de una solución 14x por cada 20 mL de extracto).

El protocolo de precipitación de proteínas se llevó a cabo manteniendo la temperatura a 0°C usando un baño de hielo mezclado con hielo seco. La acetona fue enfriada previamente en nitrógeno líquido. La precipitación se ensayó en concentraciones de 75 y 83.33% de acetona, la cual se adicionó a 5 mL de extracto previamente filtrado en un disco de nylon de 0.22 µm. La mezcla se agito vigorosamente con un agitador magnético durante 1 h en condiciones estériles. Posteriormente se centrifugó a 4 °C por 20 min, y se retiró el solvente del pellet precipitado por decantación. El pellet se secó 30 min en un baño de hielo con aire estéril. El pellet se reconstituyó en 1 mL de una solución amortiguadora de acetatos 50 mM pH 4.5 (Harris-Valle *et al.* 2007).

### **5.1.5 Atrapamiento de enzimas crudas en un gel de alginato**

La inmovilización de las enzimas precipitadas se realizó en un baño frío en condiciones estériles utilizando alginato de sodio, siguiendo el método modificado de Palmieri *et al.* (1994) y Zahmatkesh *et al.* (2010). El cual se especifica a continuación: en condiciones estériles usando 10 mL de una solución esterilizada de alginato de sodio (Sigma Aldrich) preparada al 3 % (p/v) en una solución amortiguadora de acetatos 50 mM 4.5, la cual se mezcló con una alícuota de 2 mL de precipitado con un agitador magnético. La mezcla de alginato de sodio y extracto enzimático crudo se vertió por goteo con

jeringas de 1 mL en una solución de 0.15 M CaCl<sub>2</sub> en solución amortiguadora de acetatos 10 mM pH 5.0 y las perlas formadas se mantuvieron a 4 °C durante 24 h (Torres *et al.* 1998).

Las perlas fueron lavadas con solución amortiguadora Tris 0.05 M pH 7 y entrecruzadas con una solución al 1% de glutaraldeído por 90 min (Bushan *et al.* 2015). Posteriormente, fueron lavadas con solución amortiguadora acetatos 10 mM pH 5.0 y congeladas empleando N<sub>2</sub> líquido y liofilizadas. El hidrogel requiere ser lavado para remover las impurezas del proceso de preparación, que incluyen monómeros no reaccionantes, iniciadores, entrecruzantes y productos no deseados producidos por reacciones secundarias (Ahmed, 2015).

Se hicieron ensayos de actividad Lcc y MnP y proteínas, en las perlas disueltas con una solución amortiguadora fosfatos 0.1 M pH 6 de acuerdo a lo establecido por Palmieri *et al.* (1994); así como a las perlas sin disolver siguiendo las técnicas descritas en el Anexo A.

El tamaño de las perlas de alginato fue medido en el eje mayor usando un Vernie antes y después de liofilizar. Los aerogeles obtenidos de la liofilización fueron observados en un microscopio electrónico de barrido (MEB) JEOL JSM-5900LV de alto-bajo vacío de 200 kV, con una resolución de 2.2 Å y un detector para microanálisis de energía dispersiva de rayos X (EDX). Se realizó un análisis de área superficial por medio de la técnica de Brunauer-Emmett-Teller (BET); sin embargo, el material presentó presiones negativas lo cual indicó que se encontraba fuera del límite de detección de la técnica (Rouquerol *et al.* 2014).



### 5.1.6 Degradación de PHE en una columna empacada con hidrogeles de lecho fijo

Los experimentos de degradación de  $28 \pm 0.3$  mg/L PHE (90%, Sigma-Aldrich) se hicieron usando como agentes solubilizantes al cosolvente DMSO (99.5%, Sigma-Aldrich) al 0.1% (v/v) y al surfactante no-iónico TW80 (peso molar promedio 1310, Sigma-Aldrich) al 0.001% (v/v) evaluando la remoción por los hidrogeles sin y con enzimas como se aprecia en la Figura 5.2a. Los agentes solubilizantes permiten trabajar con concentraciones superiores a la máxima solubilidad de PHE en el agua, que es de 1.1 mg/L (Chen *et al.* 2013).

Los aerogeles de alginato fueron empacados en una altura de 40 mm en una columna de vidrio de 25 mm de diámetro interno por 100 mm de alto como se observa en la Figura 5.2b. El empaque consistió de dos secciones de 30 mm de perlas de vidrio y fibra de vidrio, arriba y debajo de los aerogeles.

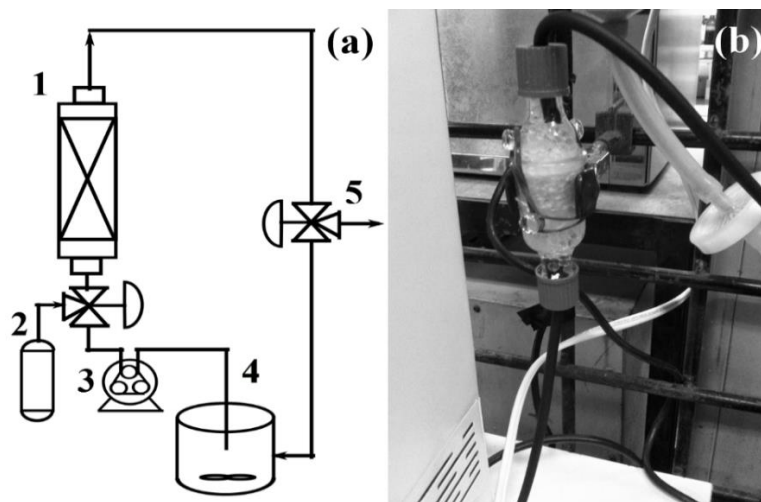


Figura 5.2 Sistema enzimático: (a) 1 columna empacada de lecho fijo, 2 concentrador de O<sub>2</sub>, 3 bomba peristáltica, 4 tanque de mezclado y 5 toma de muestra; y (b) columna empacada.

El sistema operó en régimen de flujo ascendente en multi-pasos con recirculación alimentado por una bomba peristáltica (mínima velocidad de 4.9 mL/min y máxima de 17.6 mL/min) a una velocidad de 14.7 mL/min con pulsos de 0.125 mL/min de O<sub>2</sub> cada 5 min usando un concentrador de oxígeno MARK 5 Nuvo lite (115 V, Nidek Medical Products, Inc). Se dio un tiempo de homogenización de 2 h a la mezcla PHE/DMSO/TW80 antes de incorporar O<sub>2</sub> al sistema (Figura 5.2a). Se tomaron muestras de 10 mL cada hora por 13 h para seguir la remoción de PHE y poder comparar y acoplar el tratamiento enzimático con el tratamiento fotocatalítico, haciendo todos los experimentos por triplicado. A la salida de gases del tanque de mezclado, se colocó un filtro de 0.22 μm seguido de un filtro de carbón activado para atrapar compuestos volátiles que pudiera emitirse a la atmósfera.

Los cambios en la solución se siguieron por medio de espectroscopia UV-Vis en un espectrómetro Shimadzu modelo UV-1800 con un barrido de 200 a 900 nm de absorbancia para determinar de manera rápida los cambios en la mezcla PHE/DMSO/TW80. Además del seguimiento espectroscópico, la remoción de PHE fue cuantificada por Cromatografía Líquida de Ultra-Alta Resolución acoplado a un Espectrómetro de Masas (UPLC-MS) marca Waters. Los solventes empleados en las extracciones en fase sólida y como fase móvil fueron: diclorometano (DCM) (grado HPLC, Honeywell), acetonitrilo (ACN) (grado HPLC, Honeywell) y metanol (MeOH) (grado HPLC, Honeywell).

Se empleó un programa de gradiente de elución de 40:60 H<sub>2</sub>O/ACN a 0 min, 10:90 H<sub>2</sub>O/ACN a 1 min, 40:60 H<sub>2</sub>O/ACN a 1.1 min; y 40:60 H<sub>2</sub>O/ACN a 2.5 min con una

velocidad de 0.5 mL/min. El volumen de inyección empleado fue de 3  $\mu$ L a 20 °C usando una columna UPLC BEC C18 (1.7 $\mu$ m, 2.1 mm x 50 mm) Clase H Waters. Se realizaron extracciones en fase sólida a la muestra (SPE) de las muestras con cartuchos ENVI-18 SUPELCO. Los cuales fueron acondicionados usando 10 mL de cada uno de los siguientes solventes: DCM, ACN, MeOH y agua desionizada. La elución de la muestra se realizó en 10 mL de DCM. El extracto obtenido fue reconstituido en ACN y filtrado en filtros de teflón de 0.22  $\mu$ m previa inyección en el UPLC-MS. Para cuantificar la cantidad de PHE removido se empleó un estándar de PHE de la marca SUPELCO, del cual se preparó una solución patrón de 100 mg/L en ACN y una curva con PHE grado reactivo de las concentraciones 0.001, 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 mg/L obteniendo las ecuaciones de ajuste lineal  $y = 6.9 \times 10^5 x + 2.6 \times 10^4$ ,  $r^2=0.99$  para el estándar SUPELCO y  $y = 5.9 \times 10^5 x + 9.3 \times 10^4$ ,  $r^2=0.99$  para el PHE grado reactivo.

Se determinó a composición superficial del material antes y después del tratamiento por medio de Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X en XPS K-Alpha Thermo Fisher Scientific Al  $K\alpha = 1486.6$  eV. Se empleó el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI (los resultados se muestran en el Anexo B) y el paquete Origin Pro 8.1 SR3 v8.1.34.90 para deconvolucionar los análisis XPS descritos en la sección 5.4.

## **5.2 Tratamiento de PHE por el sistema fotocatalítico**

En esta etapa se describe el método sol-gel empleado para la síntesis ácida a temperatura ambiente de TiO<sub>2</sub>-C-Ag, así como las técnicas de caracterización del

material como polvo y soportado en fibra de vidrio. Se describe la configuración del sistema y la evaluación de la fibra de vidrio impregnada con TiO<sub>2</sub>-C-Ag en la remoción de PHE en un fotoreactor irradiado por luz UVC (254 nm) y UVA (365-465 nm).

### **5.2.1 Síntesis del material**

La síntesis fue modificada de lo reportado por Yang *et al.* (2014), empleando como precursor al tetrabutoxido de titanio (TTB) (97%, Sigma-Aldrich); y como agente precursor dopante AgNO<sub>3</sub> (99.7% J. T. Baker). El precursor fue disuelto en etanol anhidro (EtOH) (97%, J. T. Baker) en una proporción 1:20. A la anterior solución le fue adicionado ácido acético glacial (97%, J. T. Baker), agua destilada y etanol anhidro en proporción 2:0.5 y 19:20 con respecto al TTB. La solución fue agitada por 1 h y sonicada por 15 min para posteriormente ser dejada para nucleación en la oscuridad por 12 h y secada a 80 °C por 24 h en la estufa.

El sólido obtenido fue molido en un mortero y sinterizado a 500 °C por 2 h. El AgNO<sub>3</sub> fue adicionado a la mezcla de ácido acético, agua destilada y etanol en un 2% en mol con respecto al TTB. Se realizó una síntesis empleando al surfactante TW80 como agente dispersante en una concentración de 0.24 mM.

La inmovilización del material en fibra de vidrio se realizó incorporando la fibra a la solución antes del secado, y se procedió al proceso de calcinación a 500 °C de acuerdo a lo descrito por (Liu *et al.* 2012).

## 5.2.2 Caracterización del material

Las partículas obtenidas fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido (MEB) JEOL JSM-5900LV de alto-bajo vacío de 200 kV, con una resolución de 2.2\AA y un detector para microanálisis con EDX. Se tomaron imágenes del material en el microscopio electrónico de transmisión (MET) JEOL JEM 2010HT de 200 kV. La estructura cristalina se determinó en un difractómetro de rayos X (DRX) Siemens D5000, de 2KW con un detector de centello gaseoso (resolución 0.1°) y una fuente de rayos X con ánodo de cobre ( $\lambda_{CuK\alpha} = 0.1546$  nm). El barrido se realizó de 10 a 90° con un tamaño de paso de 0.03 y un tiempo de paso de 1 s a 25 °C.

El tamaño de poro fue determinado en un BelSorp Mini II por la técnica de BET donde 200 mg de la muestra recibieron un pre-tratamiento térmico a una temperatura de 200 °C (velocidad de calentamiento de 10°C/min), en un reactor de borosilicato bajo flujo de gas nitrógeno (30 cm<sup>3</sup>/min) con un límite de detección para el área superficial de 0.01 m<sup>2</sup>/g y precisión de  $\pm 0.5\%$ . El diámetro de las partículas inmersas en líquido se determinó usando la técnica de dispersión dinámica de luz en un Zeta sizer ZS90 con una capacidad de detección de partículas de 0.3 nm a 5  $\mu$ m con un detector de ángulo de dispersión de 90° en una mezcla de DMSO/H<sub>2</sub>O (1:10) ya que es el medio en el cual se hicieron las pruebas de degradación de PHE. Se determinó a composición superficial del material antes y después del tratamiento por medio de XPS K-Alpha Thermo Fisher Scientific Al K $\alpha$  =1486.6 eV.

### 5.2.3 Pruebas de degradación de PHE en reactor fotocatalítico

Las pruebas se realizaron en el reactor de fotoquímica FOTO Q200 de ESVE (Figura 5.3) por triplicado. Se emplearon dos rangos diferentes de luz UV: una lámpara de luz ultravioleta de 254 nm (UVC) con una irradiancia de  $8.8 \text{ W/m}^2$  (175 W) y dos lámparas de 365 a 456 nm (UVA) de  $3.6 \mu\text{W/m}^2$  (20 W). Se realizaron pruebas preliminares en soluciones de PHE/TW80 y PHE/TW80/DMSO, con el propósito de identificar el efecto del DMSO en el catalizador irradiado con luz UVC. El reactor tiene una capacidad 0.27 L (Figura 5.3) y fue alimentado empleando una bomba peristáltica. El sistema operó en régimen de flujo ascendente en multi-pasos con recirculación alimentado por una bomba peristáltica una velocidad de 14.7 mL/min con pulsos de 0.125 mL/min de  $\text{O}_2$  cada 5 min. Se dio un tiempo de homogenización de 2 h a la mezcla PHE/DMSO/TW80 antes de incorporar  $\text{O}_2$  al sistema y encender las lámparas UV. En la salida del refrigerante en el reactor se colocó dos matraces con 250 mL de 0.01 M de BaOH y un filtro de  $0.22 \mu\text{M}$  seguido de un filtro de carbón activado. En la lámpara del reactor se colocó un refrigerante para evitar incrementos de temperatura, así como en la salida de gases para evitar pérdidas por evaporación. Al igual que en el tratamiento biológico se colocaron filtros en la salida de los gases del tanque de mezclado.

Los experimentos de degradación de  $28 \pm 0.3 \text{ mg/L}$  PHE (90%, Sigma-Aldrich) se hicieron con 0.1% (v/v) de DMSO y 0.01% (v/v) de TW80 evaluando la remoción por la luz UVC, luz UVA,  $\text{TiO}_2\text{-C/UVC}$ ,  $\text{TiO}_2\text{-C-Ag/UVC}$  y  $\text{TiO}_2\text{-C-Ag/UVA}$ . Se llevó a cabo un seguimiento por espectroscopia UV-Vis con un barrido de 200 a 900 nm de absorbancia para determinar de manera rápida los cambios en la presencia de PHE.

Se dejó un tiempo de homogenización del sistema de 2 h en ausencia de luz para determinar la cantidad de PHE adsorbido sobre el material, posteriormente se encendió la lámpara UV.

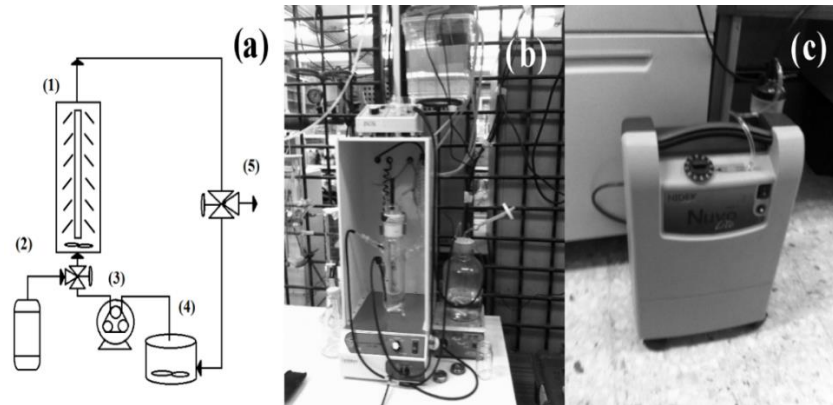


Figura 5.3 Sistema fotocatalítico: (a) 1 reactor fotocatalítico, 2 concentrador de O<sub>2</sub>, 3 bomba peristáltica, 4 tanque de mezclado, y 5 toma de muestra, (b) reactor fotocatalítico y (c) concentrador de oxígeno.

Tomando en cuenta lo reportado por Lin y Valsaraj (2003) en el tiempo de equilibrio de conversión de 6.67 h en la degradación de PHE en un reactor con fuente de luz externa. Por lo que en este trabajo se monitoreo la reacción por 13 h, tomando muestras de 10 mL cada hora. Se realizó una extracción en SPE de las muestras con cartuchos ENVI-18 SUPELCO como fue descrito en la sección 5.1.6.

La remoción de PHE fue cuantificada por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un equipo Perkin Elmer Flexar con detector DAD usando una columna C18 Platinum (250 x 4.6 mm) con una fase móvil ACN/H<sub>2</sub>O (75:25) a una velocidad de 0.7 mL/min y una longitud de onda de 254 nm. Para cuantificar la cantidad de PHE removido por HPLC se empleó una curva con PHE grado reactivo de las concentraciones 0.001, 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 mg/L obteniendo la ecuación de ajuste lineal  $y = 3.1 \times 10^5 x + 1.8 \times 10^5$ ,  $r^2=0.99$ . También se empleó UPLC-MS de

la marca Waters en las mismas condiciones descritas en la sección 5.1.6 en la cuantificación de PHE. Se determinó la composición superficial del material antes y después del tratamiento por medio de XPS K-Alpha Thermo Fisher Scientific Al K $\alpha$  =1486.6 eV. Se emplearon los paquetes estadísticos descritos en la sección 5.4 para analizar los datos.

### 5.3 Pruebas de degradación de PHE en el sistema enzimático acoplado al fotocatalítico

La prueba de degradación del sistema acoplado de la Figura 5.4, se realizó a la velocidad y configuración descritas en la sección 5.1.6 y 5.2.3 para los sistemas enzimático y fotocatalítico irradiado con luz UVA, respectivamente. Se realizó el seguimiento de los espectros de absorbancia, remoción de PHE por UPLC, y cambios en la superficie por medio de XPS como se describió para los sistemas individuales.

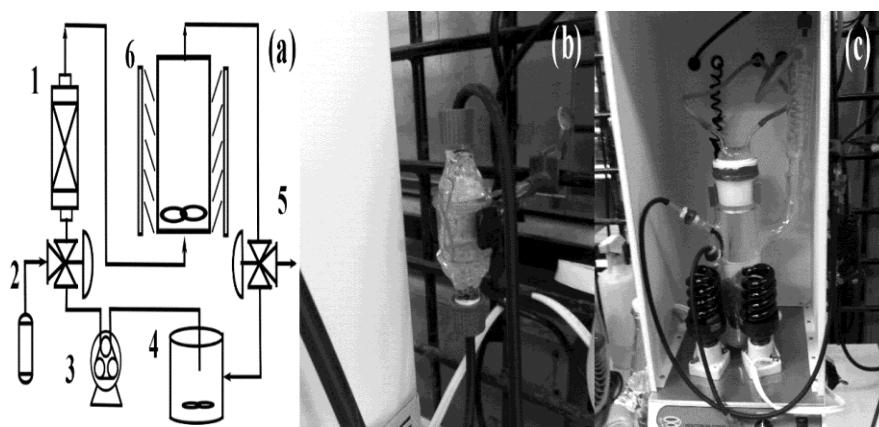


Figura 5.4 Sistema enzimático-fotocatalítico: (a)1 columna empacada de lecho fijo, 2 concentrador de O<sub>2</sub>, 3 bomba peristáltica, 4 tanque de mezclado, 5 toma de muestra, y 6 reactor fotocatalítico, (b) tratamiento enzimático y (c) tratamiento fotocatalítico.



El sistema tuvo como primera etapa la columna empacada de lecho fijo con enzimas atrapadas en aerogeles de alginato y como etapa secundaria el tratamiento con  $\text{TiO}_2\text{-C-Ag}$  irradiado con luz UVA (Figura 5.4). El sistema operó en régimen de flujo fue ascendente en multi-pasos con recirculación alimentado por una bomba peristáltica una velocidad de 14.7 mL/min con pulsos de 0.125 mL/min de  $\text{O}_2$  cada 5 min. Se dio un tiempo de homogenización de 2 h a 1 L de la mezcla PHE/DMSO/TW80 antes de incorporar  $\text{O}_2$  al sistema y encender las lámparas UVA. Se tomaron muestras de 10 mL cada hora para seguir la remoción de PHE haciendo todos los tratamientos por triplicado. Para realizar el análisis estadístico se emplearon los paquetes estadísticos descritos en la sección 5.4.

#### **5.4 Análisis estadísticos y procesamiento de datos**

El análisis estadístico en todos los tratamientos se realizó con el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI v16.1.03 y Desing-Expert v6.0.8 con un nivel de confianza del 95%. En los tratamientos se evaluaron análisis de varianza (ANOVA), correlación de variables y comparación de medias. El programa Origin Pro 8.1 SR3 v8.1.34.90 fue usado para realizar histogramas de frecuencia, así como ajustes lineales y no-lineales obtenidos en las pruebas de crecimiento, curvas de calibración y análisis de superficie obtenidos por XPS. Los datos de XRD fueron analizados usando PowderCell v2.4, mientras que las micrografías MEB y MET fueron procesadas con Gatan Microscopy Suite v2.31.734.0 e ImageJ v1.49.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Tratamiento de PHE por el sistema enzimático

En esta etapa se estudiaron las condiciones para obtener la mayor actividad enzimática usando un cultivo mixto del basidiomiceto *T. maxima* y el ascomiceto *P. carneous* en diferentes concentraciones de fuente de carbono y proporciones de inóculo. Para la posterior obtención de un extracto enzimático crudo, se tomó como indicador de actividad enzimática a las enzimas ligninolíticas: Lcc y MnP. El extracto crudo fue inmovilizado por atrapamiento en alginato evaluando su actividad catalítica en la remoción de PHE.

#### 6.1.1 Efecto de un inductor biológico en la producción de enzimas

El seguimiento del consumo de azúcares reductores y producción de proteínas usando como fuente de carbono a 20 g/L de glucosa se presenta en la Figura 6.1a-b. Los resultados obtenidos en el monocultivo y cultivo mixto en proporciones de inóculo 1:1 y 1:2 no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos a las 13 h en el consumo de azúcares reductores (prueba LSD 95%,  $r_{+/-}=0.19$ ,  $\alpha= 0.05$ , ANOVA Distribución F,  $P=0$ ) como se observa en la Figura 6.1a. El seguimiento de las proteínas totales en la Figura 6.1b por el método de Bradford mostro diferencias significativa de *T. maxima/P. carneous* (1:1) con respecto a los otros tratamientos a partir de las 168 h (prueba LSD 95%,  $r_{+/-}=0.001$ ,  $\alpha= 0.05$ , ANOVA Distribución F,  $P=0.0005$ ). Se presentó un

incremento en la concentración de proteínas en el cultivo mixto con proporción de inóculo 1:1 al tiempo que la glucosa en el medio fue menor a 5 g/L, como se aprecia en la figura 6.1b.

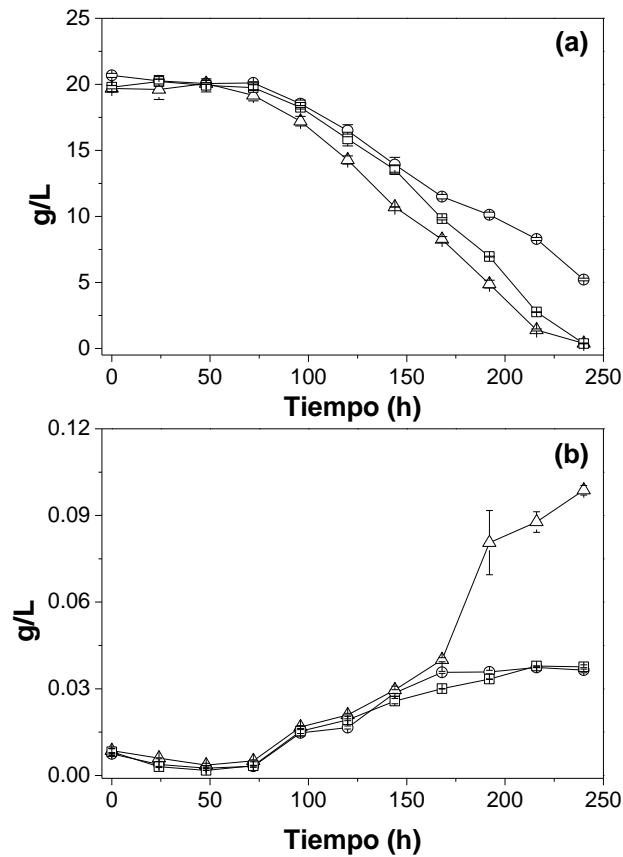


Figura 6.1. Seguimiento del (a) consumo de azúcares reductores y (b) producción de proteínas por ○ *T. maxima*, △ *T. maxima/P. carneous* (1:1), □ *T. maxima/P. carneous* (1:2) en 20 g/L de glucosa; n=2.

Se sabe que los hongos producen cantidades importantes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en ambientes bien aireados. Recientes investigaciones han mostrado evidencia de su participación en la generación de especies reactivas al oxígeno. Las cuales podrían estar involucradas en la degradación de materiales lignocelulósicos (Baldrian *et al.* 2005; Eriksson y Bermek, 2009). El incremento en peróxido de hidrógeno fue mayor en *T. maxima* y *T.*

*maxima/P. carneous* (1:2) en comparación con *T. maxima/P. carneous* (1:1) a partir de las 120 h como se aprecia en la Figura 6.2a. Durante el incremento en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las enzimas Lcc y MnP redujeron su actividad en el monocultivo y el cultivo mixto (Figura 2.1b-c). No se observó diferencia significativa entre la máxima producción de Lcc y MnP del monocultivo con los cultivos mixtos (Prueba LSD 95%,  $r_{+/-}=8677.2$ ,  $\alpha=0.05$ , ANOVA Distribución F, P=0.04).

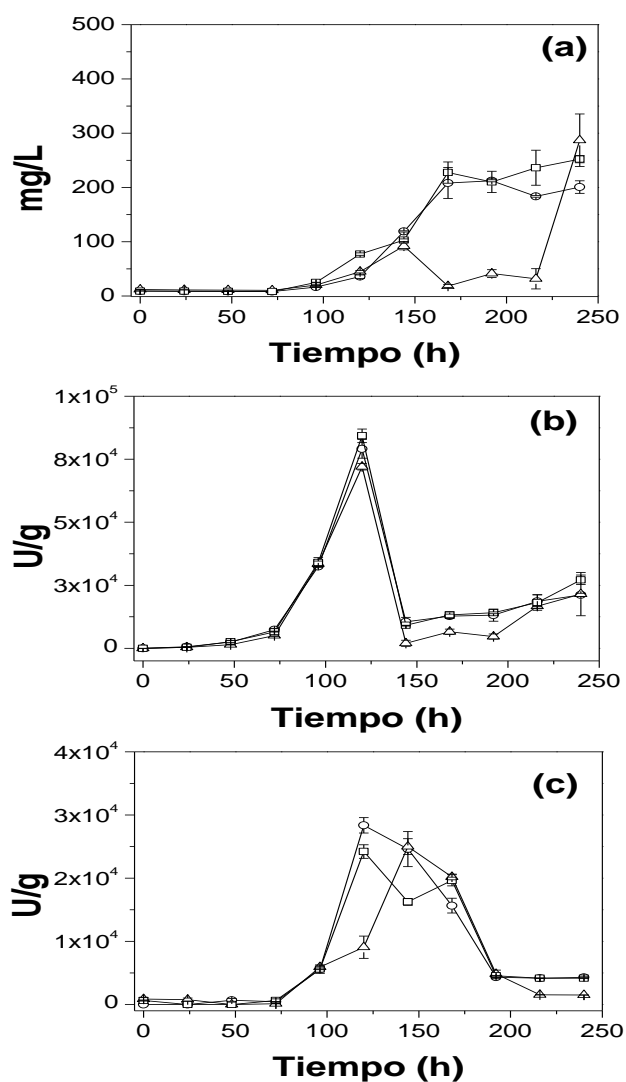


Figura 6.2. Producción de: (a) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (b) Lcc, y (c) MnP por  $\circ$  *T. maxima*,  $\triangle$  *T. maxima/P. carneous* (1:1),  $\square$  *T. maxima/P. carneous* (1:2) en 20 g/L de glucosa; n=2.

Las Lcc en los hongos de podredumbre blanca son expresadas principalmente en la fase de metabolismo secundario cuando existe limitación en carbón, nitrógeno o azufre en el medio; por lo que se considera que el agotamiento de glucosa inhibe la actividad Lcc (Li *et al.* 2011). En cuanto al desempeño de los cultivos mixtos en medio glucosa, el incremento en la proporción de inóculo no afectó la actividad enzimática.

Se ha reportado que la fuente de carbono influye en la actividad enzimática de los cultivos mixtos. En estudios realizados por Zhang *et al.* (2006) en *Trametes sp.* AH28-2 en co-cultivo con *Trichoderma sp.* ZH1 se alcanzaron actividades de 6210 U/L en medio líquido usando como fuente de carbono xilosa como fuente de carbono y triptona como fuente de nitrógeno, demostrando que la composición del medio de crecimiento puede llegar a alcanzar eficiencias de inducción enzimática similares a las obtenidas usando compuestos aromáticos. La ruta metabólica del glicerol incluye la producción de butanol, etanol, butirato y propionato (da Silva y Contiero, 2009). El glicerol como fuente de carbono, mejoró la producción de Lcc y MnP en *Cerrena Unicolor* comparado con la glucosa (Kachlishvili *et al.* 2014). Mientras que en el cultivo mixto de *G. lucidum* y una levadura, la transformación de la glucosa a glicerol por la levadura incrementó la actividad Lcc (Li *et al.* 2011).

En los experimentos donde se empleó glicerol como fuente de carbono, se presentó un incremento en la concentración de proteínas a partir de las 72 h en todos los tratamientos como se aprecia en la Figura 6.3a y c usando como fuente carbono glicerol. La producción de peróxido de hidrógeno de la Figura 6.3b y d presentó una mayor concentración en *T. maxima* y *T. maxima/P.carneous* (1:1) con 15 g/L de glicerol.

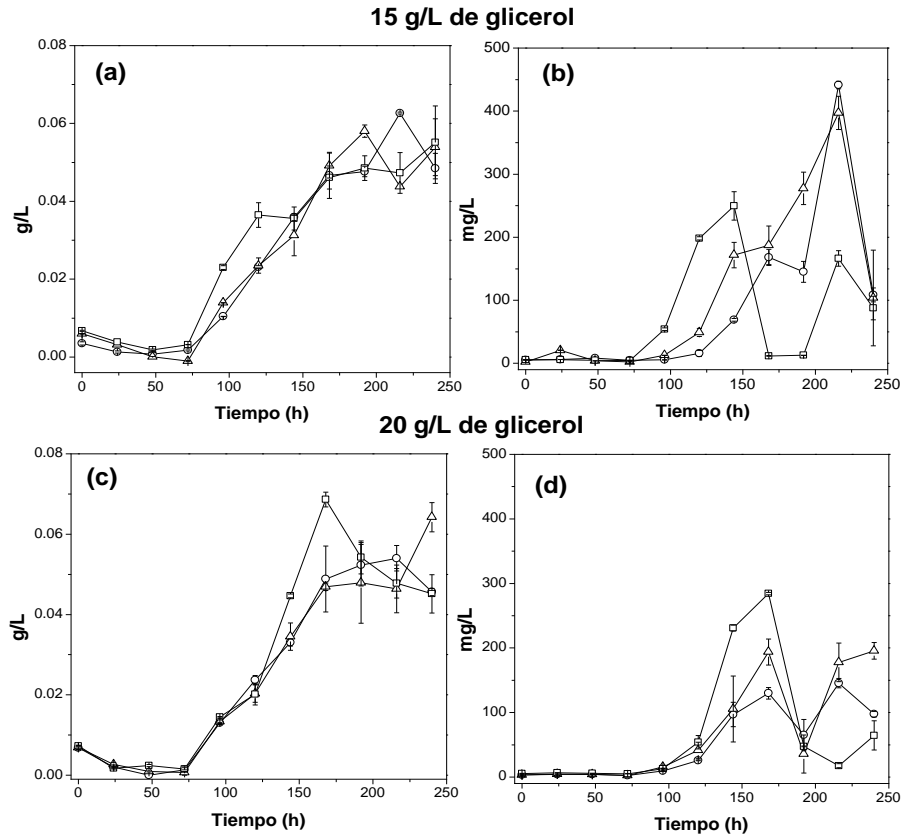


Figura 6.3. Seguimiento de proteínas (a)-(c) y peróxido de hidrógeno (b)-(d) en cultivos de  $\circ$  *T. maxima*,  $\triangle$  *T. maxima/P. carneous* (1:1),  $\square$  *T. maxima/P. carneous* (1:2) con 15 y 20 g/L de glicerol; n=2.

En cuanto a la actividad enzimática en los cultivos con glicerol, el incremento en la proporción del ascomiceto *P. carneous* no afectó la actividad enzimática del basidiomiceto *T. maxima* en concentraciones de 20 g/L de glicerol, pero si en 15 g/L de glicerol como se aprecia en la Figura 6.4a-d. La actividad MnP ha sido escasamente reportada en estudios realizados con cultivos mixtos. Siendo la actividad Lcc, la que hasta el momento se considera como la principal respuesta producida por el estrés oxidativo originado por la presencia de otros microorganismos, como se observó en estudios realizados por Baldrian, (2004). A diferencia de la actividad Lcc, la producción de MnP se incrementó en 15 g/L de glicerol y una concentración de inóculo (1:2) como se aprecia en la Figura 6.4b y d. Se determinó por un análisis de correlación de

Pearson que se muestra en el Anexo B, que el incremento en el peróxido de hidrógeno está relacionado con la actividad MnP en los ensayos con 15 g/L glicerol proporción (1:2) y 20 g/L del monocultivo.

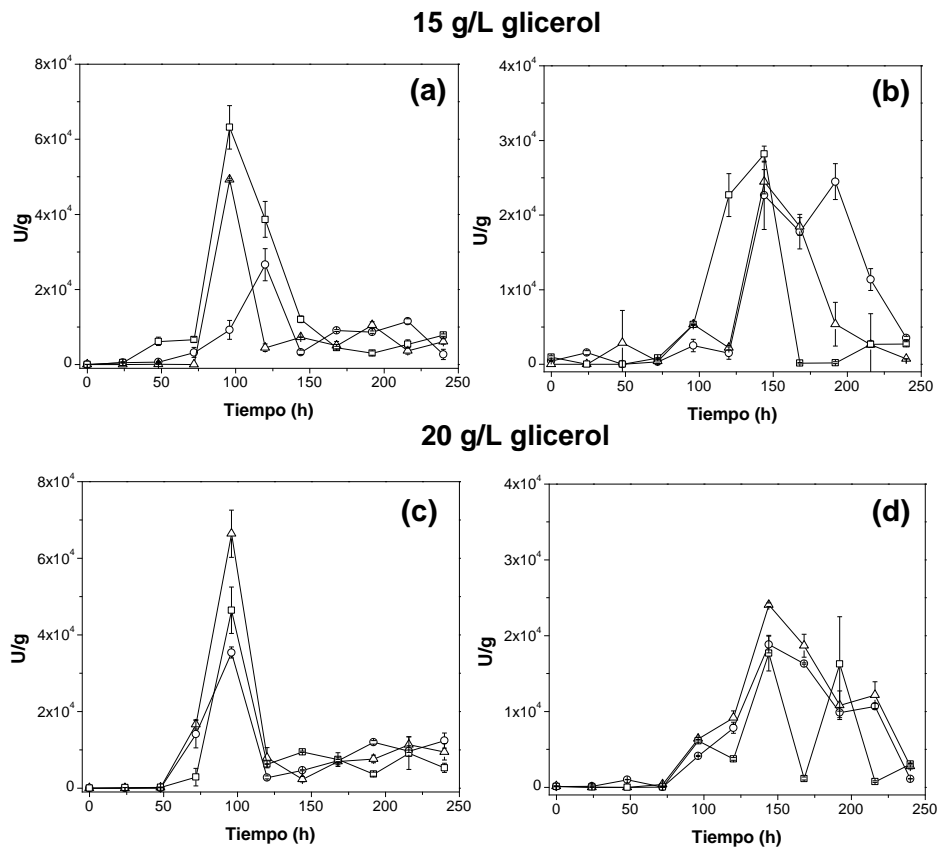


Figura 6.4. Seguimiento de Lcc (a)-(c) y MnP (b)-(d) en cultivos de  $\circ$  *T. maxima*,  $\triangle$  *T. maxima/P. carneous* (1:1),  $\square$  *T. maxima/P. carneous* (1:2) con 15 y 20 g/L de glicerol; n=2.

El diseño factorial  $2^2$  de la Figura 6.4a-b consideró como factores a las proporciones de inóculo y la concentración glicerol, y como variables de respuesta la actividad Lcc y MnP (Figura 6.5a-b). Se determinó que la interacción entre la concentración de glicerol y la proporción del inóculo influye de manera significativa en la actividad Lcc ( $\alpha=0.05$ , ANOVA F,  $P=0.04$ ). Mientras que en el caso de la MnP se vio afectada de

manera significativa por la concentración de glicerol ( $\alpha=0.05$ , ANOVA F,  $P=0.01$ ) y la interacción entre la concentración de glicerol y la proporción del inóculo ( $\alpha=0.05$ , ANOVA F,  $P=0.009$ ).

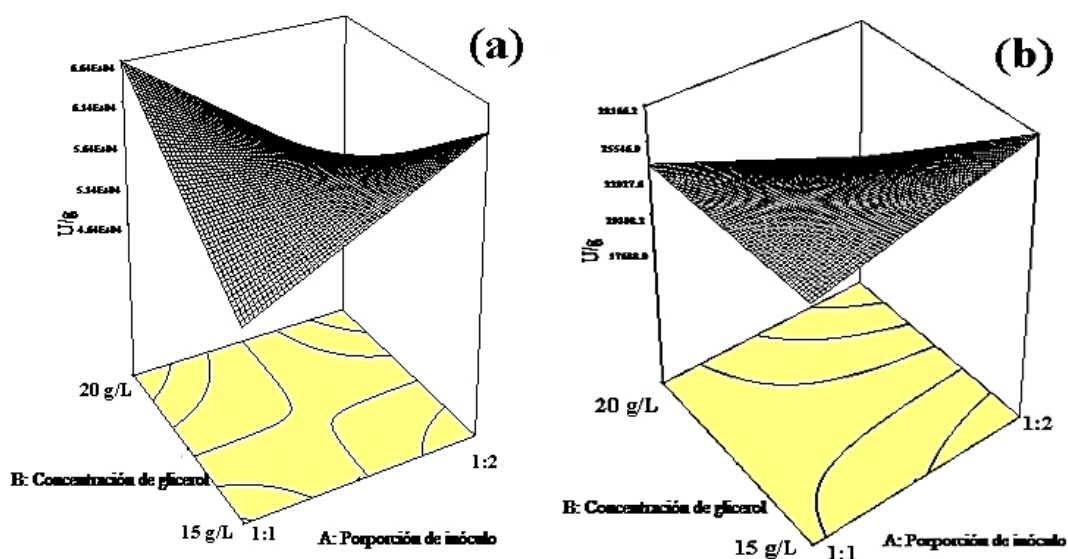


Figura 6.5 Diseño experimental  $2^2$ , donde a) Lcc y b) MnP.

Las Ecuaciones 6.1 y 6.2 para Lcc and MnP representan el ajuste al modelo de regresión lineal del diseño factorial  $2^2$ ; donde el factor A con las proporciones de inóculo y el factor B la concentración de inóculo.

$$Lcc = 56296.3 - 1510.07[A] + 107.3[B] - 8470.3[AB]; r^2 = 0.84 \quad (6.1)$$

$$MnP = 23593.5 - 666.04[A] - 2718.1[B] - 2520.4[AB]; r^2 = 0.92 \quad (6.2)$$

Los resultados obtenidos del diseño factorial  $2^2$ , indicaron que la actividad Lcc fue superior en cultivos mixtos con una proporción de inóculo de 1:1, usando 20 g/L de glicerol como fuente de carbono. El uso de glicerol como fuente carbono ha reportado



actividades similares a la glucosa en *T. pubescens* siendo una fuente de carbono de lento consumo (Galhaup *et al.* 2002).

La actividad enzimática producida en glicerol se encontró por debajo de lo obtenido con glucosa para la misma proporción de *T. maxima*/*P. carneous*. La menor actividad detectada, correspondió a *T. maxima* crecida con 20 g/L de glicerol, observándose un incremento en la actividad como resultado de la presencia de *P. carneous* (Tabla 6.1).

Tabla 6.1 Máxima actividad enzimática obtenida en los ensayos.

Fuente de carbono	Cultivo	Tiempo (h)	Lcc (U/g)	Tiempo (h)	MnP (U/g)
20 g/L de Glucosa	<i>T. maxima</i>	120	79121.4 ± 3677.06	120	28366.6 ± 1209.5
	<i>T. maxima</i> / <i>P. carneous</i> (1:1)	120	72056.2 ± 1278.2	144	24994.9 ± 1256.5
	<i>T. maxima</i> / <i>P. carneous</i> (1:2)	120	84315.1 ± 2673.6	120	24220.5 ± 1079.09
15 g/L de Glicerol	<i>T. maxima</i>	120	26587.3 ± 4276.9	192	24471.3 ± 2403.4
	<i>T. maxima</i> / <i>P. carneous</i> (1:1)	96	49228.7 ± 221.1	144	24457.3 ± 1620.0
	<i>T. maxima</i> / <i>P. carneous</i> (1:2)	96	63149.2 ± 5796.5	144	28166.1 ± 1074.5
20 g/L de Glicerol	<i>T. maxima</i>	96	35361.8 ± 1431.5	144	18813.6 ± 1096.8
	<i>T. maxima</i> / <i>P. carneous</i> (1:1)	96	66384.1 ± 6176.7	144	24061.9 ± 228.3
	<i>T. maxima</i> / <i>P. carneous</i> (1:2)	96	46423.3 ± 6068.3	144	17688.9 ± 2348.7

Los resultados obtenidos en este trabajo superan a lo reportado para un monocultivo de una cepa de *T. maxima* usando como fuente de carbono bagazo de caña de azúcar como se aprecia en la Tabla 6.2. El uso de cultivo mixtos afecta la red de proteínas y complejos del metabolismo secundario de familias de genes (Brakhage, 2012). Sin embargo, los valores de actividad detectados no superan a los obtenidos en cultivos de fermentación sólida usando como sustratos bagazo de maíz y tallo de banana.

Tabla 6.2 Comparación de actividad reportada en cultivos mixtos.

Microorganismos	Fuente de carbono	Enzima	Actividad (U/L)	Tiempo (días)	Autor
<i>T. maxima</i> <i>P. carneous</i>	Glucosa	Lcc	1500.0 ± 2.8	5	Este trabajo
		MnP	809 ± 33	7	
	Glicerol	Lcc	762.5 ± 46.2	4	
		MnP	1000 ± 45	6	
<i>Schizophyllum commune</i> <i>Ganoderma lucidum</i>	Bagazo de maíz*	MnP	193000	8	Yasmeen <i>et al.</i> (2013)
	Tallo de banana*	MnP	45000	6	
<i>T. versicolor</i> <i>T. harzianum</i>	Celulosa	Lcc	13	13	Baldrian (2004)
<i>Trametes sp. AH28-2</i> <i>Trichoderma sp. ZH1</i>	Xilosa	Lcc	6219	5	Zhang <i>et al.</i> (2006)
<i>Ceriposioopsis subvermispora</i> <i>P. ostreatus</i>	Madera de álamo	Lcc	2000	10	Chi <i>et al.</i> (2007)
<i>T. Maxima MULL 44155</i>	Bagazo de caña de azúcar	MnP	249	6	López <i>et al.</i> (2010)

\* Fermentación en fase sólida

Algunos de los estudios realizados hasta el momento para la inducción de Lcc empleando sistemas de cultivos mixtos con diferentes fuentes de carbono (Tabla 6.2), indican que los microorganismos presentan una mayor actividad enzimática en sustratos lignocelulósicos. Se ha descrito que estos sustratos activan los mecanismos reguladores de los sistemas ligninolíticos e hidrolíticos (Elisachvili y Kachlishvili, 2009).

### 6.1.2 Efecto del pH en la producción de enzimas

Los extractos obtenidos presentaban un pH ácido entre 3 y 4. Para contrarrestar los posibles efectos de inhibición del pH sobre la actividad Lcc se emplearon soluciones reguladoras de pH en un periodo de 18 días de incubación de los cultivos mixtos. Se realizó un seguimiento del pH durante los 18 días en los que se incubó los cultivos mixtos en presencia de soluciones amortiguadoras citratos, acetatos y citratos-fosfato como se aprecia en la Figura 6.6a. Se observó que la solución amortiguadora de citratos mantuvo regulado el pH del medio durante los 18 días de incubación, mientras que la de citratos perdió su capacidad tampón a los 10 días.

El medio fue ligeramente acidificado los primeros días de crecimiento; sin embargo, se mantuvo cercano al pH neutro. En un estudio en bioreactor usando *T. pubescens* después agotar la fuente de carbono (300 h) se presentó un incremento en el pH del medio una vez que se alcanzó el máximo crecimiento (Galhaup *et al.* 2002). Las proteínas totales son asociadas al crecimiento de los hongos, encontrándose el máximo para el control y tratamientos después de las 192 h, lo cual coincide con el incremento en el pH del medio en la Figura 6.6a-b. Se pudo apreciar inhibición en el crecimiento de los cultivos regulados con soluciones amortiguadoras citratos y citratos-fosfatos.

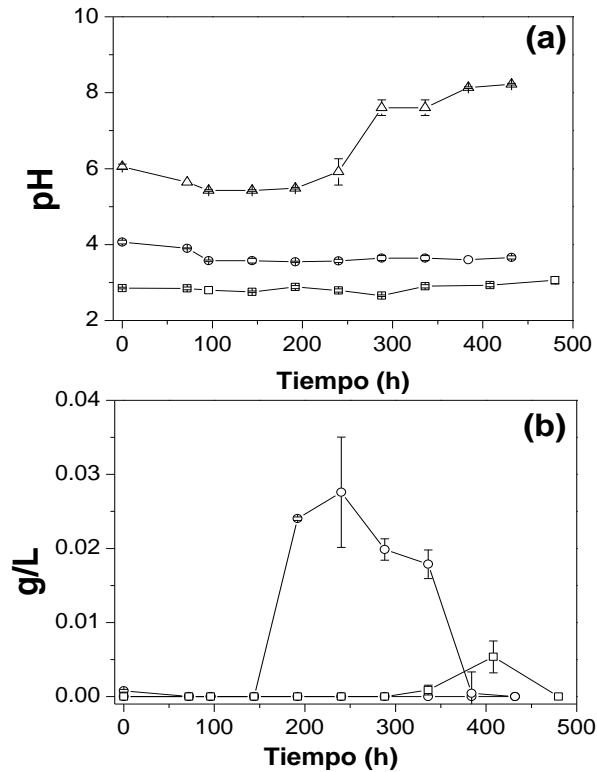


Figura 6.6 Seguimiento de (a) pH y (b) proteínas en el cultivo mixto en soluciones amortiguadoras: ○ acetatos, △ citratos y □ citratos-fosfatos; n=2

Se cuantificó una cantidad superior de  $H_2O_2$  en la solución amortiguadora citratos-fosfatos en comparación con soluciones amortiguadoras acetatos y citratos como se aprecia en la Figura 6.7a. En la solución amortiguadora acetatos la concentración de  $H_2O_2$  detectada fue inferior a los 2 mg/L. La regulación de pH afecta la actividad enzimática, de acuerdo a lo reportado por López *et al.* (2010) para el incremento de Lcc en pH 3.0 una cepa de *T. maxima*. El medio regulado con la solución amortiguadora acetatos ( $3.7 \pm 0.14$ ) no presentó actividad Lcc, mientras que el medio regulado con la solución amortiguadora citratos presentó una actividad inferior al control (Figura 6.7b). La actividad MnP fue inhibida completamente en la presencia de la solución amortiguadora de acetatos como se aprecia en la Figura 6.7c. La máxima

actividad Lcc y MnP, fue alcanzada a las 336 h en el medio regulado con la solución amortiguadora citratos-fosfatos.

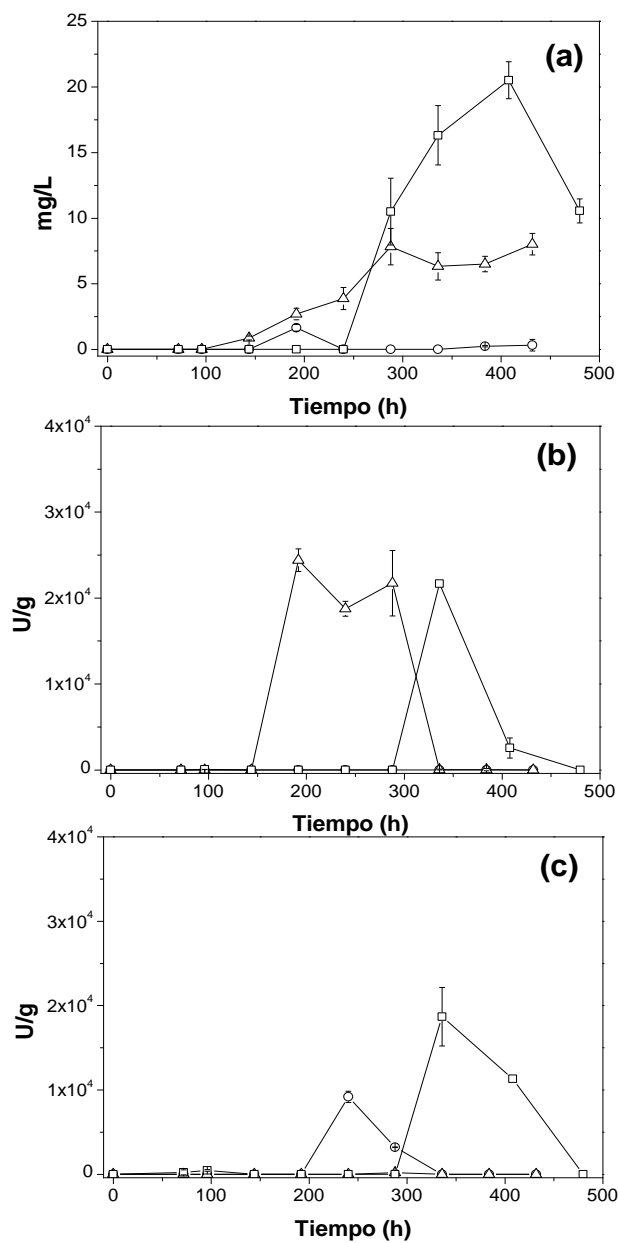


Figura 6.7 Efecto del pH en la (a) producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (b) Lcc y (c) MnP en soluciones amortiguadoras: ○ acetatos, △ citratos y □ citratos-fosfatos; n=2.

### 6.1.3 Precipitación de enzimas

Con base en los resultados obtenidos en el diseño factorial  $2^2$  y control de pH se decidió trabajar con una concentración de glicerol de 20 g/L con una proporción de inóculo 1:1, para lo cual se determinó el crecimiento de los monocultivos y cultivos mixtos por medio de la determinación del peso seco de la biomasa (Figura 6.8).

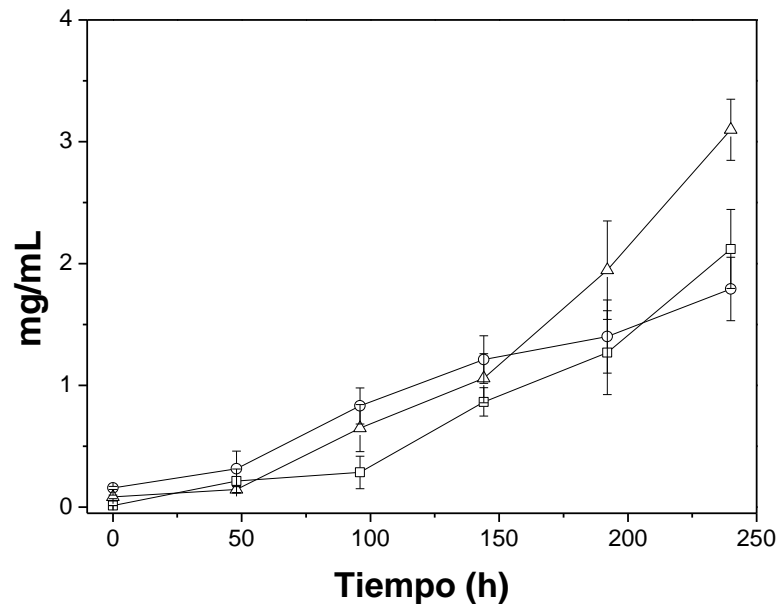


Figura 6.8 Crecimiento de monocultivos y cultivo mixto donde:  $\circ$  *T. maxima*,  $\triangle$  *P. carneous* y  $\square$  *T. maximal/P.carneous*; n=3.

Se encontró que el crecimiento de la biomasa se acelera después de las 150 h para *P. carneous*. Se realizó un ajuste no lineal sigmoidal tipo SGomperz a las curvas de crecimiento obteniéndose la Ecuación 6.3 para *T. maxima* ( $\mu_{max} = 92.58$  1/h), la Ecuación 6.4 para *P. carneous* ( $\mu_{max} = 8.55 \times 10^4$  1/h), y la Ecuación 6.5 para el cultivo mixto ( $\mu_{max} = 252.06$  1/h).

$$f(t) = 2.36e^{-e^{(0.99-0.0093t)}}; \chi^2 = 0.98 \quad (6.3)$$

$$f(t) = 281.09e^{-e^{(2.06-0.0025t)}}; \chi^2 = 0.95 \quad (6.4)$$

$$f(t) = 3.76e^{-e^{(1.72-0.0095t)}}; \chi^2 = 0.99 \quad (6.5)$$

El pH en el cultivo mixto se muestra en la Figura 6.9, en donde se aprecia un incremento a partir de las 150 h y su posterior estabilización a las 240 h. La estabilización del pH se presentó de manera simultánea a la disminución de proteínas en el sobrenadante.

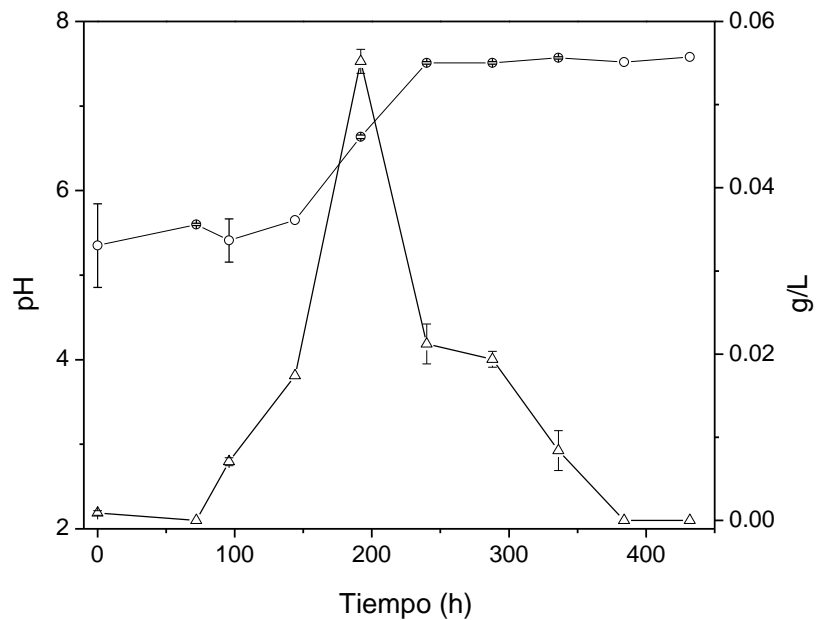


Figura 6.9 Seguimiento de  $\circ$  pH y  $\triangle$  proteínas en el cultivo mixto; n=3.

El seguimiento de la actividad enzimática se realizó por 432 h, encontrándose la máxima actividad de Lcc ( $342330.6 \pm 17966.1$  U/g) a las 336 h y MnP ( $17797.9 \pm 825.1$

U/g) a las 288 h como se aprecia en la Figura 6.10. En la fase de crecimiento exponencial del cultivo mixto presenta la mayor actividad Lcc en la fase exponencial de crecimiento. Encontrándose una correlación entre el crecimiento y la actividad Lcc con un coeficiente de correlación Pearson de 0.96.

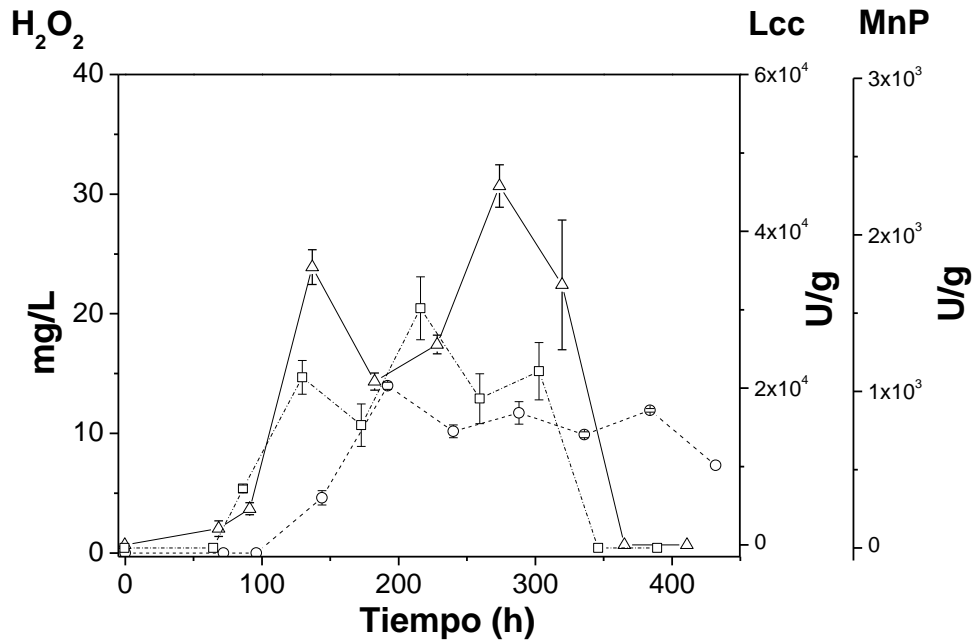


Figura 6.10 Seguimiento de  $\circ$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $\triangle$  Lcc y  $\square$  MnP en el cultivo mixto; n=3.

La producción de Lcc no se encontró relacionada con alguna fase de crecimiento, para algunos basidiomicetos como *T. villosa* (en el que el sistema ligninolítico no se encuentra asociado con el metabolismo secundario), reportándose inhibición en la síntesis enzimática con el incremento en la fuente de carbono (Yamanaka *et al.* 2008). Mientras que en la cepa de *T. pubescens* se ha reportado un incremento de la actividad Lcc asociada a altas concentraciones de fuente de carbono (Galhaup *et al.* 2002). Se obtuvo un extracto del cultivo mixto crecido con 20 g/L de glicerol en una proporción 1:1 después de 360 h de incubación (Tabla 6.3), el cual se filtró obteniéndose una



biomasa de  $0.6211 \pm 0.12$  g en peso seco para el cultivo mixto. El extracto filtrado se almacenó a  $3^{\circ}\text{C}$  por 408 h sin que se observara una importante disminución en las proteínas,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y actividad enzimática con respecto a las primeras 96 h. Los resultados concuerdan con lo reportado por López *et al.* (2010) en un extracto crudo de una cepa de *T. maxima*, la cual mantuvo el 90% de su actividad almacenado a  $4^{\circ}\text{C}$  por 168 h.

Tabla 6.3 Actividad enzimática del extracto crudo del cultivo mixto almacenado a  $3^{\circ}\text{C}$ , n=3.

Tiempo h	$\text{H}_2\text{O}_2$ mg/L	Proteínas g/L	Lcc U/g	MnP U/g
96	$115.1 \pm 4.8$	$0.02 \pm 0.001$	$63307.2 \pm 2834.5$	$18938.3 \pm 1601.1$
408	$116.2 \pm 10.7$	$0.02 \pm 0.002$	$67559.4 \pm 6439.72$	$18938.3 \pm 1601.1$

La precipitación de proteínas por la adición de sales, solventes orgánicos o polímeros no iónicos resulta en estructuras supramoleculares unidas por enlaces no covalentes que pueden ser fácilmente redisueltas en agua. El uso de acetona y otros solventes orgánicos miscibles en agua modifica la constante dieléctrica a temperaturas inferiores a  $4^{\circ}\text{C}$ , permitiendo la obtención de precipitados (Englard y Seifter, 1990). La precipitación con acetona resultó en un incremento en la precipitación efectiva de proteínas de la Figura 6.11; lográndose concentrar 3.43 veces las proteínas iniciales, al usar 75% de acetona. Mientras que la precipitación de proteínas empleando 83.3% de acetona logró concentrar 11.37 veces las proteínas iniciales a partir de una biomasa de  $0.43 \pm 0.02$  g en peso seco.

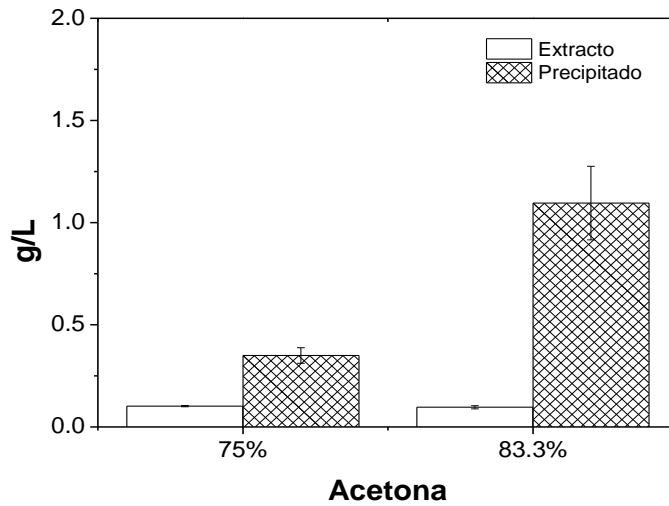


Figura 6.11 Precipitación de proteínas del extracto del cultivo mixto usando acetona: a) 75 % y b) 83.3%; n=5.

El precipitado reconstituido a partir de la evaporación completa de la acetona al 75%, presentó factores de purificación (F. P.) de 0.22 y 0.12 para Lcc y MnP, respectivamente, como se observa en la Figura 6.12a-b. En la precipitación con 83.3% de acetona de la Figura 6.12a-b se alcanzaron valores de F.P. de 0.12 y 0.03 para Lcc y MnP, respectivamente.

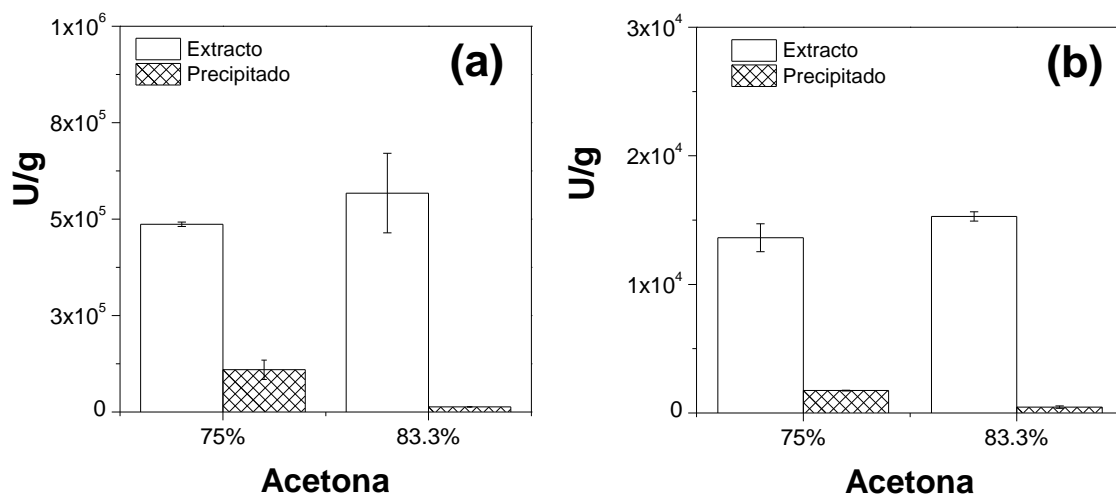


Figura 6.12 Actividad enzimática de la precipitación con: (a) 75% y (b) 83.3% de acetona, n=5.

El uso de solventes miscibles en agua como la acetona no requiere de la necesidad de diálisis en el extracto, lo que reduce el tiempo de precipitación y permite llevar a cabo su atrapamiento de manera inmediata (Rajeeva y Lele, 2011). Se ha reportado que el uso de acetona a temperaturas inferiores a 4 °C resulta en una precipitación efectiva de Lcc con una F. P. inferior al del PEG 1500 y superior al etanol; además de facilitar el manejo de los agregados de enzimas (Matijošyte *et al.* 2010). La precipitación usando solvente pudo modificar los péptidos de las proteínas, lo que llevó a una disminución de las enzimas de interés al incrementar el factor de dilución. El efecto anterior pudiera ser el resultado de la formación de dímeros o agregados a altas concentraciones, lo que puede llegar a afectar la actividad catalítica. Existen enzimas que son inestables a soluciones diluidas, siendo fácilmente desnaturalizadas resultando en baja actividad (Dekker *et al.* 1997).

#### **6.1.4 Atrapamiento de enzimas crudas en un gel de alginato**

La precipitación de las proteínas presentes en el extracto permitió llevar a cabo su inmovilización en geles de alginato. El porcentaje de humedad en las perlas fue de  $95.8 \pm 10\%$  (n=100). La fracción de agua en un hidrogel es mucho más alta que la fracción de polímero (Ahmed, 2015). Las perlas presentaron un tamaño promedio de  $2.3 \pm 0.3$  mm (n=55) estando hidratadas como se aprecia en la Figura 6.13a; y de  $1.9 \pm 0.2$  mm después de ser liofilizadas, (Figura 6.13b).

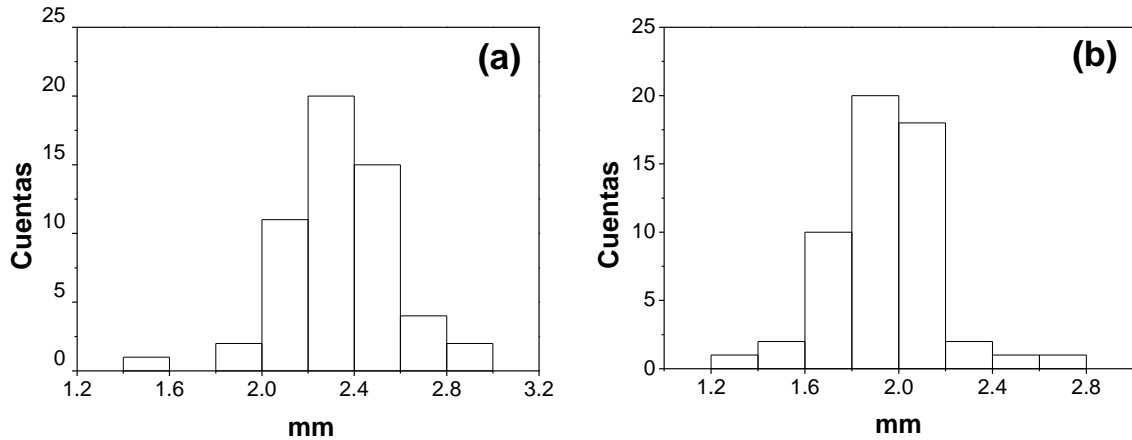


Figura 6.13 Perlas de alginato entrecruzadas con glutaraldeído: (a) antes y (b) después de liofilizar.

Las perlas obtenidas fueron observadas en MEB de la Figura 6.14a, encontrándose una formación en multicapas. La presencia de la solución amortiguadora fosfatos usada para disolver las perlas afectó la cuantificación de la actividad Lcc y MnP. No se apreciaron nanoporos después de la liofilización por medio de MEB en las paredes del material. Cuando los geles son secados la estructura porosa colapsa o se encoje debido a la tensión superficial del agua jalando las cadenas poliméricas durante el proceso de secado, para prevenir esto se reemplaza el agua por un alcohol con menos tensión superficial (Ahmed, 2015). Sin embargo, el uso de solventes compromete la actividad enzimática en los hidrogeles de alginato por lo que se omitió este paso. En el análisis EDX de la Figura 6.17c se detectó únicamente C (41.3%), O (50.6%), Ca (4.6%) y Cl (3.3%). El Ca y Cl son productos remanentes de la solución de entrecruzamiento de  $\text{CaCl}_2$ .

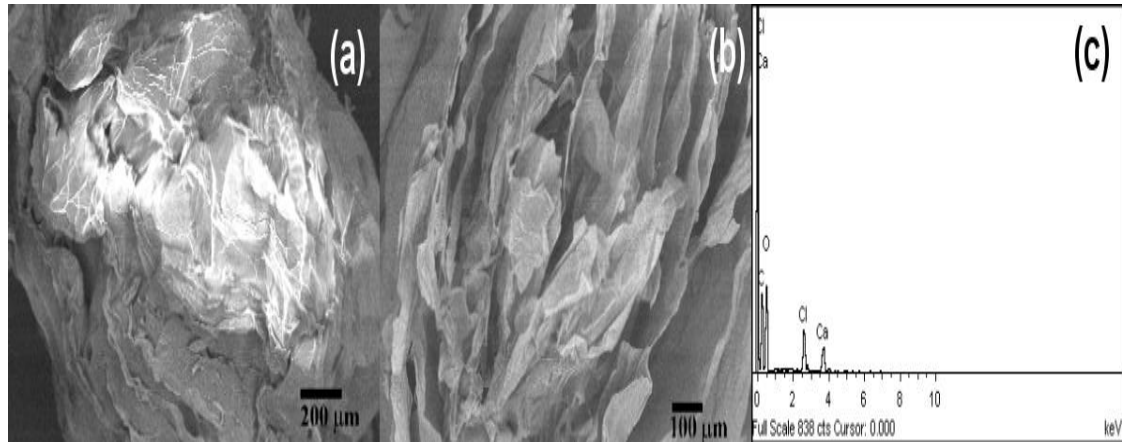


Figura 6.14 Micrografía MEB 20 KeV de: (a) hidrogel de alginato, (b) corte transversal, y (c) análisis EDX.

Las proteínas y actividad enzimática retenidas en 0.054 g en peso seco de perlas de alginato con enzimas, fue de un 85% en proteínas en las perlas disueltas como se muestra en la Tabla 6.4. La presencia de solución amortiguadora fosfatos 0.1 M de pH 7.2, empleada para disolver las perlas de alginato afecto los ensayos de Lcc y MnP. En las perlas de alginato sin disolver se detectó un 5.4% de las proteínas iniciales, 0.3 y 4.3 % de la actividad Lcc y MnP.

Tabla 6.4 Actividad enzimática en el extracto crudo del cultivo mixto atrapado en geles de alginato.

Material	Proteínas (g/L)	Lcc (U/g)	MnP (U/g)
Pellet enzimático reconstituido	5.8 ± 1.7	49933.3 ± 19909.1	1627.3 ± 336.9
Hidrogel disuelto en buffer fosfatos-Na*	2.46 ± 0.43	N. D.	N. D.
Hidrogel*	0.058 ± 0.003	580.92 ± 73.1	125.80 ± 51.8

\*0.054 ± 0.002 g peso seco

N. D. No Detectado

### **6.1.5 Degradación de PHE en una columna empacada con hidrogeles de lecho fijo**

Las pruebas de degradación fueron realizadas en  $28 \pm 0.3$  mg/L de PHE una solución DMSO/TW80. La remoción por sorción sobre la superficie de los hidrogeles sin enzimas fue de  $45.6 \pm 25.6\%$ , mientras que los hidrogeles con enzimas alcanzaron  $93.1 \pm 3.0 \%$  después de 13 h de tratamiento como se aprecia en la Figura 6.15. La cantidad de proteínas y actividad enzimática Lcc y MnP fue descrita en la sección 6.1.4. Se realizaron análisis de GC-MS y UPLC-MS, en muestras tratadas por extracción en fase sólida. Sin embargo, no se detectaron productos de degradación en las condiciones empleadas en esta investigación. La inyección directa fue descartada ya que la presencia de TW80 de un peso molecular impide que sea volatizado en el GC-MS quedando impregnado en la columna (Yoshikawa *et al.* 2003). Mientras que el DMSO, desprende el recubrimiento de la columna en HPLC y tiene un alto coeficiente de expansión que puede rebasar el volumen del inserto de inyección en el GC-MS (Abellán *et al.* 2009). La presencia de DMSO durante los tratamientos sin enzimas y con enzimas no ocasiono disminución de tamaño o que las perlas se disolvieran. A pesar de que el DMSO es un solvente polar aprótico capaz de disolver compuestos polares y no-polares, que actúa como atrapador de radicales hidroxilos (Abellán *et al.* 2009).

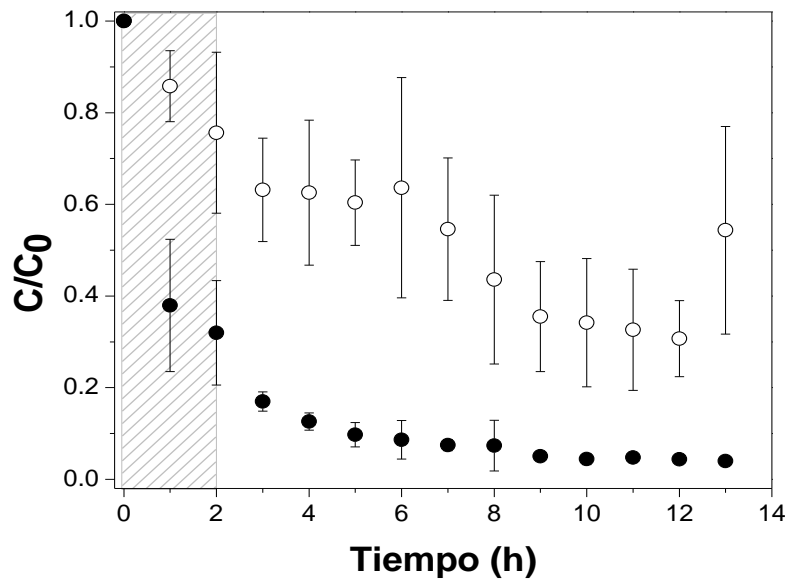


Figura 6.15 Remoción de PHE por: ○ hidrogeles sin enzimas e ● hidrogeles con enzimas; n=3.

Se obtuvo el espectro de absorbancia durante el tratamiento para el control de hidrogel sin enzimas y con enzimas (Figura 6.16a-b). Encontrándose un efecto hipercrómico en tratamiento de PHE en el control sin enzima. Mientras que en tratamiento con enzima el efecto fue hipocrómico. Se empleó el espectro de absorbancia con la finalidad de detectar la formación de complejos o productos de reacciones de sustitución en la molécula (Mistry, 2009); sin embargo, al igual que lo reportado en estudio siguiendo el espectro de emisión no se detectó la formación de otras moléculas aparte de PHE (De Bruyn *et al.* 2012). El efecto hipercrómico puede deberse a la liberación de glutaraldehído de las perlas sin enzimas, ya que el glutaraldehído se une a los grupos amino de las proteínas a pH 7 (Okuda *et al.* 1991).

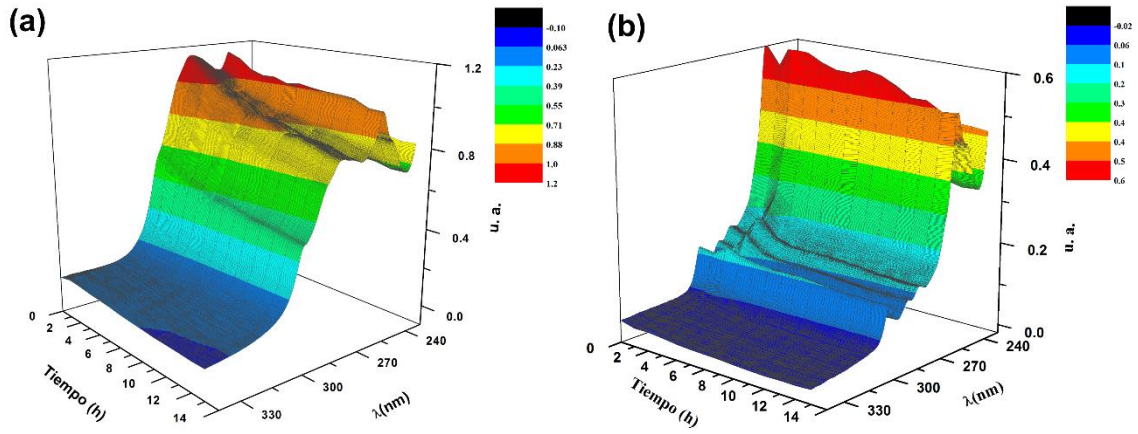


Figura 6.16 Espectros de absorción UV-Vis en el tratamiento de PHE por: (a) hidrogeles sin enzimas e (b) hidrogeles con enzimas.

El pH en el tratamiento de PHE se mantuvo en 4.5, ya que las enzimas requieren de ese pH para mantenerse activas (Figura 6.17). Por lo que el material fue acondicionado a ese pH tanto en el control como en el que contiene enzimas.

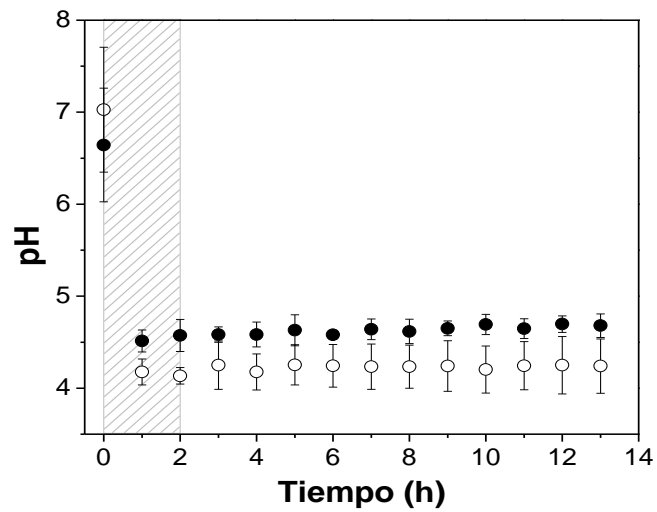


Figura 6.17 Seguimiento del pH en el tratamiento de PHE por:  $\circ$  hidrogeles sin enzimas e  $\bullet$  hidrogeles con enzimas;  $n=3$ .



Los cambios en la composición de la superficie después del tratamiento fueron confirmados con los análisis de superficie de XPS (Figura 6.18). La deconvolución de los datos de XPS fue por el método estático con un ajuste Gaussiano-Lorentziano con la línea base tipo Shirley y corrección al carbón adventicio a los 284.8 eV (C-C). Las especies fueron identificadas usando la base de datos para XPS del National Institute of Standards and Technology, versión 4.1 (NIST, 2012). Los ajustes de las regiones C 1s y O 1s, para los tratamientos fueron de  $r^2=0.99$  para C 1s y  $r^2=0.99$  para O 1s a las 0 h; y de  $r^2=0.99$  para C 1s y  $r^2=0.99$  para O 1s a las 13 h. El análisis composicional dio como resultados diferentes especies de C, las cuales son resultado de la adición de oxígeno a la superficie del material (Barr, 1995; MacManus *et al.* 1999). Los grupos carbono hidroxilo (C-O), carbono epoxi (C-O-C), carbono carbonilo (C=O) y carbono carboxilato (O-C=O) predominaron en las 13 h del tratamiento en las regiones C 1s y O 1s. Debido a que la diversidad de especies en la región O 1s se incrementó después de 13 h de tratamiento, podemos afirmar que se trata de especies asociadas a PHE y los agentes solubilizantes (TW80 y DMSO) depositadas en la superficie del hidrogel de alginato. Los surfactantes afectan la solubilidad y transporte de compuestos hidrófobos como el PHE, mediante la modificación de las interacciones estéricas, electrostáticas e hidrofóbas al adsorberse en las superficies porosas (Cai, 2014).

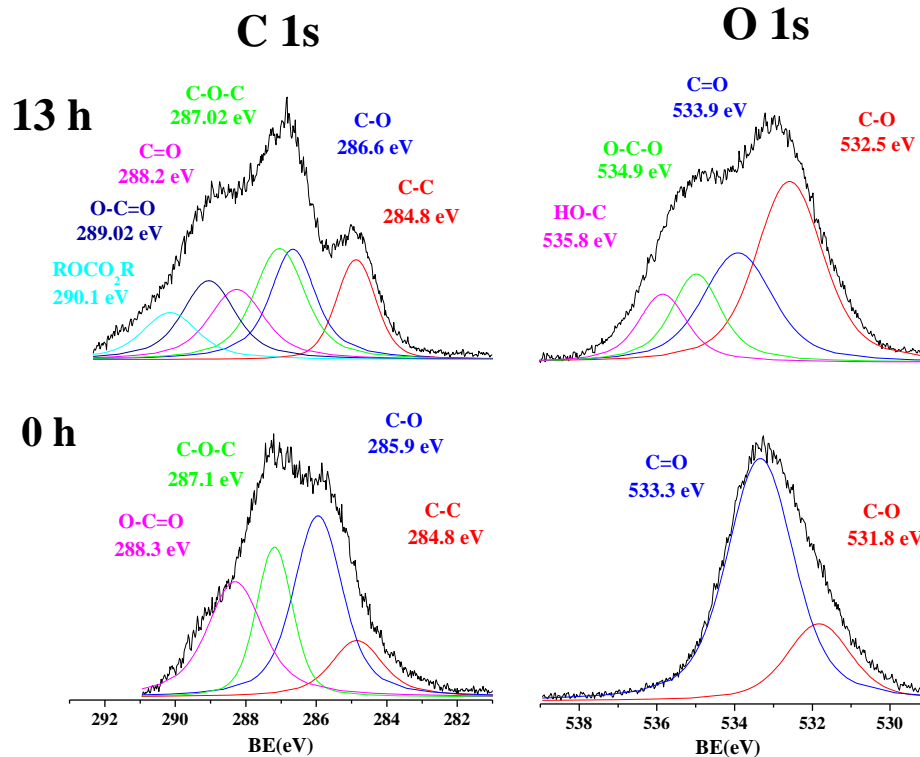


Figura 6.18 Análisis XPS en la superficie del hidrogel sin enzimas antes y después del tratamiento de PHE.

La deconvolución de los datos de XPS de los hidrogeles con enzimas se realizó como fue descrito para el hidrogel sin enzimas. Los ajustes de las regiones C 1s y O 1s, para los tratamientos fueron de  $r^2=0.99$  para C 1 y  $r^2=0.99$  para O 1s a las 0 h; y de  $r^2=0.99$  para C 1s y  $r^2=0.99$  para O 1s a las 13 h. Se detectaron menos especies presentes en el hidrogel con enzimas en la región C 1s de la Figura 6.19 con respecto a la ausencia de enzima en la Figura 6.18. Lo anterior puede estar ligado a procesos de oxidación en la superficie del hidrogel con enzima, y la subsecuente degradación de la molécula de PHE. El grupo carbono carbonilo predominó en las regiones C 1s y O 1s después de 13 h de tratamiento. La presencia de DMSO en concentraciones por debajo de 10%, mejora la solubilización de los sustratos incrementando la velocidad de reacción de las enzimas en procesos continuos (Mogharabi y Faramarzi, 2014).

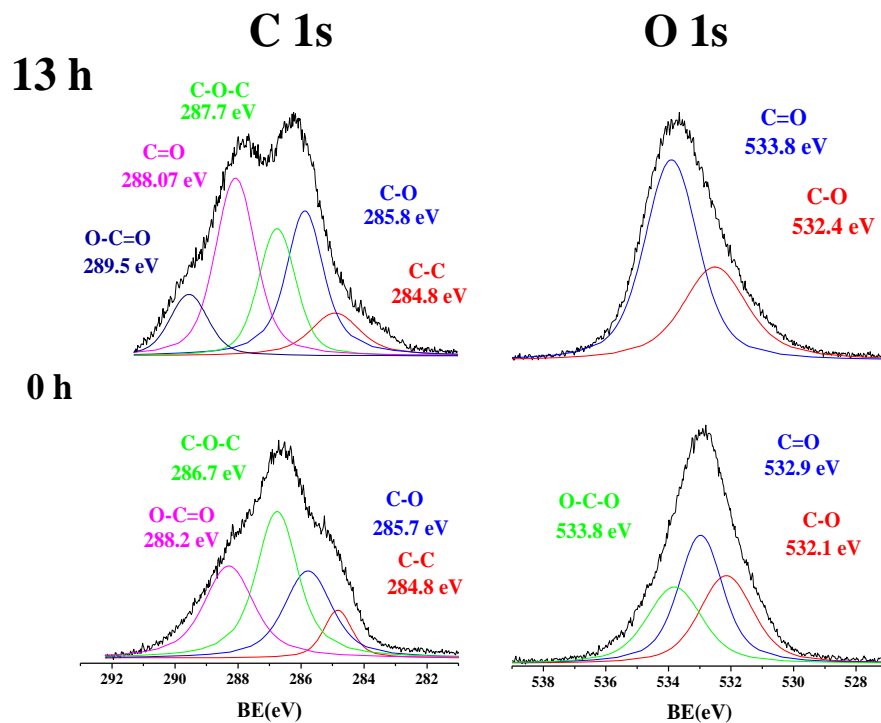


Figura 6.19 Análisis XPS en la superficie del hidrogel con enzimas antes y después del tratamiento de PHE.

## 6.2 Tratamiento de PHE por el sistema fotocatalítico

En esta etapa se realizó la síntesis e incorporación de C y Ag en el TiO<sub>2</sub>. El TiO<sub>2</sub> ha sido uno de los materiales más ampliamente estudiado en diversas aplicaciones ya que es altamente insoluble, no-reactivo con otros materiales, térmica estable y no flamable (Clemente *et al.* 2012). La síntesis de este óxido metálico por el método sol-gel permite mejorar su transparencia, porosidad y distribución del tamaño de poro, las cuales son características necesarias para maximizar la actividad fotocatalítica

(Fujishima *et al.* 2008). El TiO<sub>2</sub>-C-Ag sintetizado fue soportado en fibra de vidrio, lo cual permite la recuperación del material y la operación del sistema en continuo.

### **6.2.1 Síntesis del material**

Se sabe que el pH de las soluciones acuosas afecta en el TiO<sub>2</sub>, influyendo en el tamaño de los agregados, y la posición de las energías de valencia y conductividad. El punto de carga cero es el responsable de la formación de agregados y este se produce cuando las partículas no presentan ninguna carga. En condiciones ácidas se reportan cargas positivas en las partículas, mientras que en medio alcalino carga negativa (Clemente *et al.* 2012). La síntesis de partículas de TiO<sub>2</sub> dopadas con C y Ag fueron realizadas en condiciones ácidas usando ácido acético. Se adicionó TW80 como agente dispersante debido a su capacidad para formar micelas para controlar el crecimiento de los cristales. Diversos estudios han demostrado que por arriba de su concentración de su concentración micelar crítica (<40 CMC) dan como resultado, matrices irregulares (Domínguez *et al.* 1997; Chio *et al.* 2006; Medina-Valtierra *et al.* 2006). En esta investigación se empleó 15 veces la CMC del TW80.

En la síntesis de la Figura 6.20a temperatura ambiente y presión atmosférica se obtuvieron partículas menores a los 270 nm, empleando como precursor al butóxido de titanio. Se detectó la presencia de 12 % C, 40 % Ti, 42 % O y 6 % Ag en las partículas analizadas puntualmente por medio de EDX. Las partículas obtenidas presentaron formas amorfas en ausencia de TW80, Figura 6.20a. Se adicionó el surfactante TW80 como agente dispersante, obteniendo aglomerados de partículas

menores a los 200 nm, Figura 6.20 b. Se ha reportado que en atmosferas de nitrógeno se presentan estructuras cristalinas amorfas, con una mezcla de rutila y anatasa, los aglomerados generados suelen ser homogéneos a diferencia de lo reportado en atmosferas de oxígeno o nitrógeno-agua (Choi y Park, 2006). Por otro lado, el uso de una cantidad estequiometrica menor a 4 M de H<sub>2</sub>O por 1 M de precursor ayuda a reducir la velocidad de hidrólisis permitiendo controlar el crecimiento de las partículas (Wright y Sommerdijk, 2001). El resultado del cambio en la concentración de H<sub>2</sub>O y la presencia de surfactante en la reacción de hidrólisis derivó en aglomerados de partículas de menor tamaño (Figura 6.20 c).

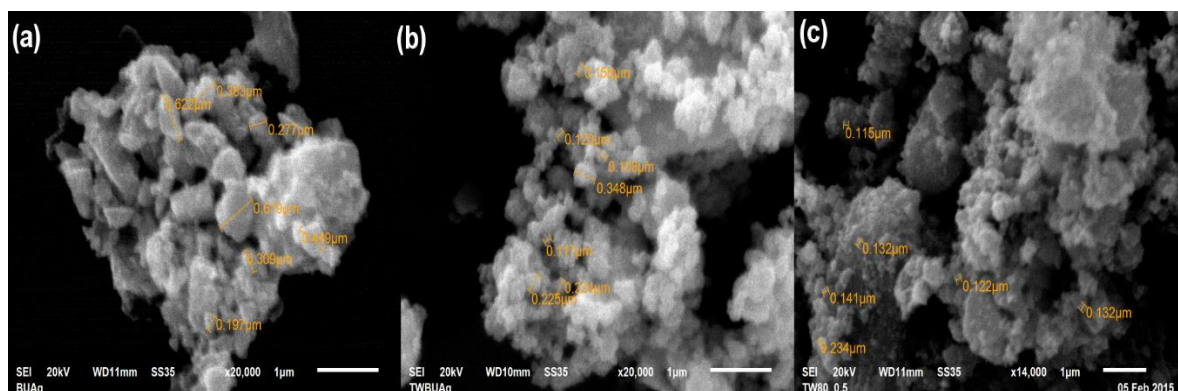


Figura 6.20 Micrografía MEB de partículas de TiO<sub>2</sub>-C-Ag método sol-gel: (a) sin TW80, (b) con 15 CMC TW80/1:18 TTB/H<sub>2</sub>O y (c) 15 CMC TW80/1:0.5 TTB/H<sub>2</sub>O a 20 kV.

Se evaluaron diferentes surfactantes no iónicos (Brij 72, Span 80, Surfapcol G, Emulgin 600) y uno catiónico (CTAB) como agentes dispersantes (Domínguez *et al.* 1997; Choi *et al.* 2006; Medina-Valtierra *et al.* 2006), como se parecía en la Figura 6.21a-f. Sin embargo, fue con TW80 un surfactante no iónico que se pudo controlar el crecimiento de las partículas en la concentración de 0.24 mM. Se omitió la evaluación del

surfactante aniónico ya que requiere de condiciones alcalinas, las cuales se ha demostrado incrementan el tamaño de las partículas (Isley y Penn, 2006).

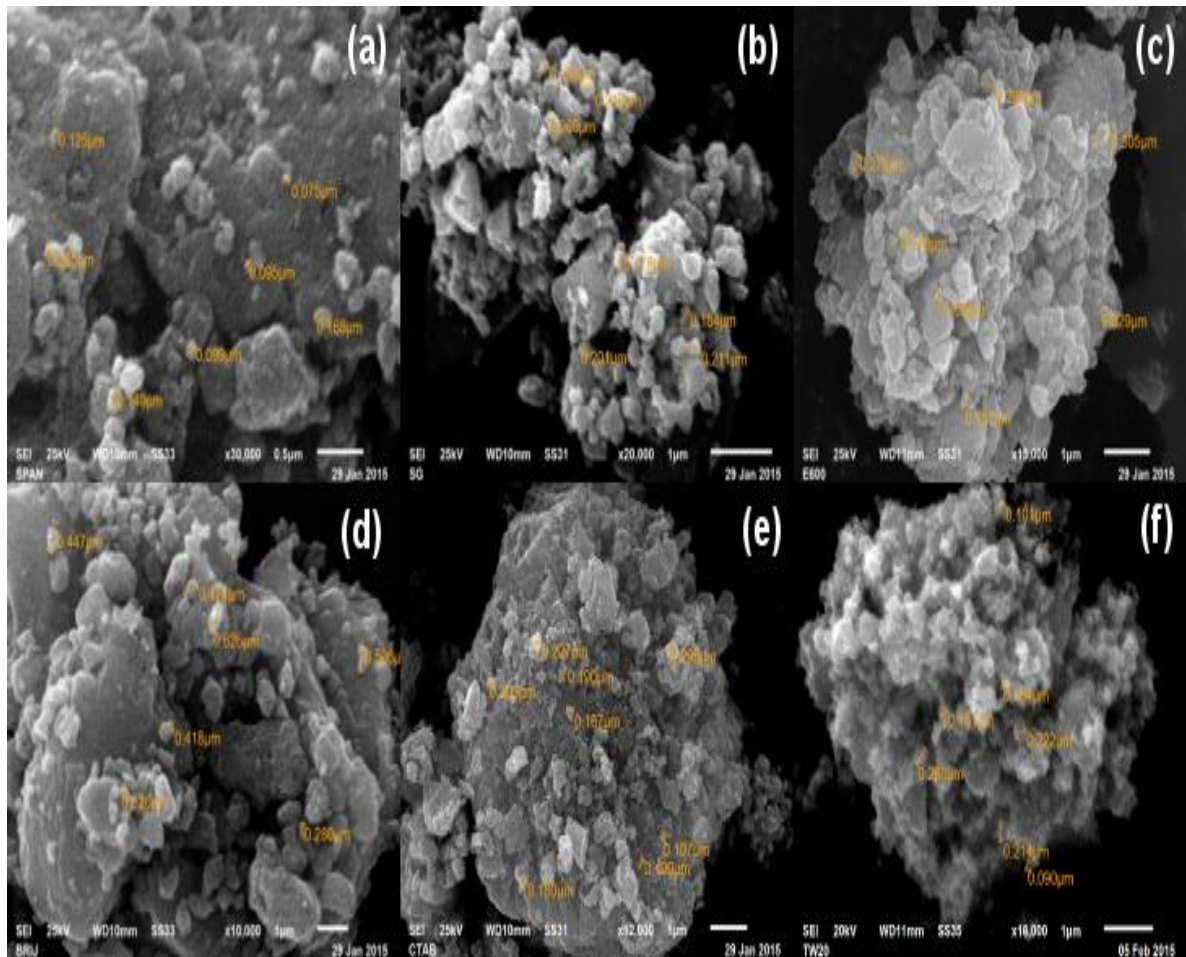


Figura 6.21 Micrografía MEB de la síntesis de partículas de  $\text{TiO}_2\text{-C-Ag}$  con los surfactantes: a) Brij 72, b) Span 80, c) Surfapcol G, d) Emulgin 600, e) CTAB, y f) Tween 20 a 25 kV.

## 6.2.2 Caracterización del material

Los condiciones de hidrólisis influyen en las características morfológicas del  $\text{TiO}_2$  sintetizado, (Santana-Aranda *et al.* 2005) reportan que al usar como precursor tetraisopropoxido de titanio (TTIP) y ajustando el pH con HCl durante la hidrólisis

alcanzan un volumen de poro de 0.187 cm<sup>3</sup>/g, mientras que el área superficial ha alcanzado 80.8 m<sup>2</sup>/g. La síntesis de TiO<sub>2</sub> a partir de tetrabutoxido de titanio ajustando el pH con ácido acético teniendo como agentes dopantes ácido bórico y glicerol alcanzó un área superficial de 156.9 m<sup>2</sup>/g (Yang *et al.* 2014). El uso de TW80 usando como precursor TTIP y ácido acético para regular el pH resultó en un área superficial de 147 m<sup>2</sup>/g y un volumen de poro de 0.221 cm<sup>3</sup>/g (Choi *et al.* 2006).

Los resultados obtenidos del analisis de BET, clasifican a los materiales obtenidos con esta ruta de síntesis como mesoporosos. La síntesis realizada con una proporción 1:0.5 TTB/H<sub>2</sub>O, presentó un diámetro y volumen de poro menores a la de 1:18 TTB/H<sub>2</sub>O (Tabla 6.5).

Tabla 6.5 Determinación de las características morfológicas

Parámetros	TiO <sub>2</sub> /Ag/TW80 1:18 TTB/H <sub>2</sub> O	TiO <sub>2</sub> /Ag/TW80 1:0.5 TTB/H <sub>2</sub> O
Volumen de la monocapa (cm <sup>3</sup> STP/g)	4.6437	4.7206
Área (m <sup>2</sup> /g)	20.212	20.546
Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g)	0.2044	0.04501
Diámetro de poro (nm)	40.461	8.7645
r <sup>2</sup>	0.998	0.999

El tamaño calculado de acuerdo al movimiento browniano de las partículas empleando la técnica de dispersión dinámica de luz para el material TiO<sub>2</sub>-C-Ag sintetizado con 1:0.5 TTB/H<sub>2</sub>O fue estimado en 343.8 nm con un índice de polidispersidad de 0.403 y un intercepto de 0.885 lo que indica que se trató de una buena medición (Figura 6.22).

El pico con intensidad (100%) correspondió a  $273.8 \pm 68.58$  nm, lo que constituyó más de 25% de las partículas. Se encontró que el material obtenido es polidisperso como se observa en el histograma de frecuencia. La prueba se realizó empleando una mezcla DMSO/H<sub>2</sub>O, la cual será usada en las pruebas de degradación a pH neutro, el cuál es reportado como el punto de carga cero con materiales que contienen TiO<sub>2</sub> por lo que se presentaron problemas de formación de agregados de las partículas (Clemente *et al.* 2012), lo anterior derivó en que el análisis no alcanzará un buen reporte de calidad.

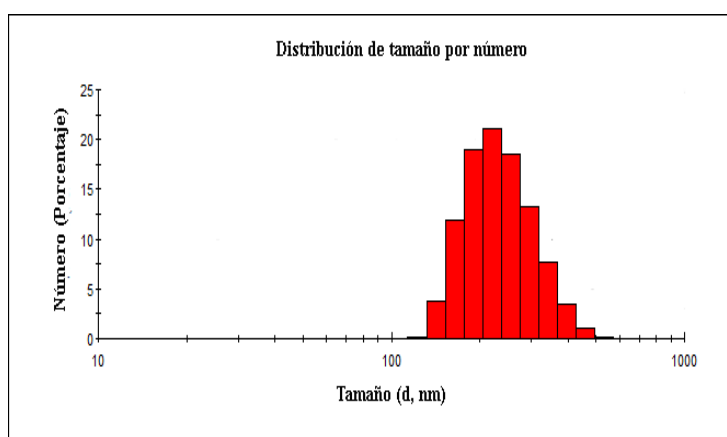


Figura 6.22 Distribución de tamaño de partícula de 6 mg/L de TiO<sub>2</sub>-C-Ag en DMSO/H<sub>2</sub>O (1:10); n=3.

Se ha demostrado que es la temperatura la cual se favorece la fase anatasa (Mahshid *et al.* 2009). En este estudio se calcinó a 500 °C obteniendo un material con estructura cristalina que de acuerdo a la comparación de los planos (101), (004), (200), (105) y (211) del material obtenido con la base de datos de fichas cristalográficas del International Centre for Diffraction Data (ICDD) identificó como fase anatasa (estructura tetragonal I41/amd); al compararla la intensidad de los picos en todos los materiales (Figura 6.23) con la referencia 01-089-4921. El tamaño del cristal de TiO<sub>2</sub>-C-Ag fue



calculado usando el espesor medio del máximo pico (101) mediante la fórmula de Debye-Scherrer ( $D=K\lambda/\beta\cos\theta$ ) en donde K es una constante tomada como 0.891, y  $\lambda$  corresponde a la longitud de onda de rayos-X de  $\text{CuK}\alpha$  de 1.5405 Å. El tamaño del cristal fue de 12.6 y 35.3 nm para las  $\text{TiO}_2\text{-C-Ag}$  1:0.5 TTB/ $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{TiO}_2\text{-C-Ag}$  1:18 TTB/ $\text{H}_2\text{O}$ , respectivamente.

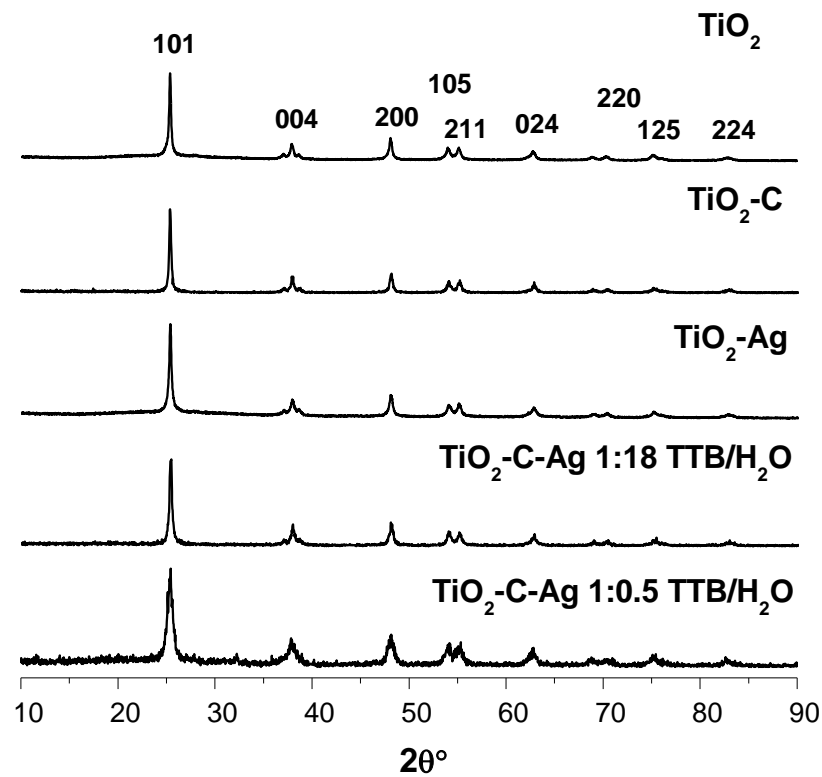


Figura 6.23 Difractograma de  $\text{TiO}_2$  modificado con C y Ag por la técnica sol-gel.

No se encontraron picos de  $\text{Ag}_2\text{O}$ , que es el compuesto que puede derivarse de la presencia de plata; lo anterior podría estar relacionado a que la plata presente se encuentra amorfa o en concentraciones por debajo del límite de detección de equipo por lo que no presenta una señal que pueda ser aislada de la señal de fondo del equipo. El análisis realizado en el MEB EDX del material en polvo presentó 2.25% de

Ag y 16.43% de C. El carbono se encuentra presente como residuo atrapado dentro de los intersticios de las partículas ya que temperaturas por arriba de 400 °C, sólo remueven el carbono superficial (Simonsen y Søggaard, 2010).

Se seleccionó el TiO<sub>2</sub>-C-Ag sintetizado con 1:0.5 TTB/H<sub>2</sub>O ya que el tiempo de gelación fue más largo que con 1:18 TTB/H<sub>2</sub>O. Lo anterior permite llevar a cabo el recubriendo de la fibra de vidrio. Los filtros de fibra de vidrio impregnada con TiO<sub>2</sub>-C-Ag sintetizado con 1:0.5 TTB/H<sub>2</sub>O presentó una película homogénea de TiO<sub>2</sub> sobre las fibras en las que se observa la distribución de partículas de plata como puntos brillantes sobre el material en la imagen de MEB (Figura 6.24a). La presencia de Al, Na, Si, K, Ca y Zn está relacionada con la composición del vidrio (Figura 6.24b). El sustrato resistió el proceso de calcinación sin presentar derretimiento como ha sido reportado por Yu *et al.* (2016).

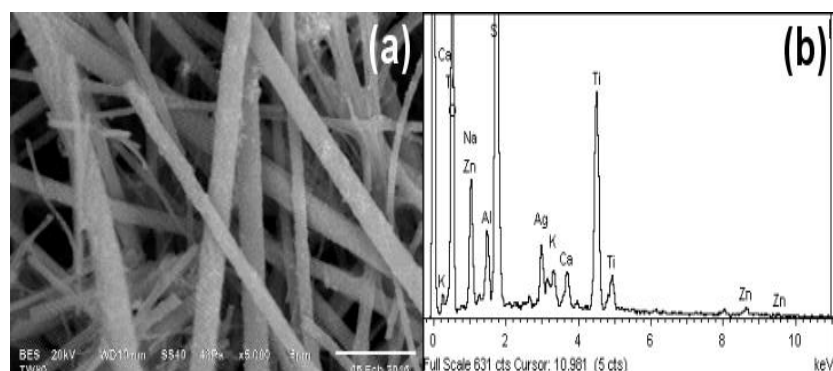


Figura 6.24 Micrografía MED de filtro de fibra de vidrio impregnada con TiO<sub>2</sub>-C-Ag: a) imagen MEB a x5,000 20 kV y b) análisis EDX.

Los filtros de fibra de vidrio presentaron baja resistencia a los efectos de cizalla derivados del mezclado fue baja y el material se fraccionó. Debido a lo anterior se realizó la impregnación del material sintetizado en fibra de vidrio comercial,

correspondiente a  $0.51 \pm 0.18$  g de  $\text{TiO}_2\text{-C-Ag}$  por g de fibra de vidrio. El material también fue analizado por medio de energía dispersiva de rayos X (EDX) sin que se encontraran elementos (As, Sb, Te, Se, etc.) que pudieran afectar el desempeño del catalizador.

El análisis de la morfología del material sintetizado realizado en MET, permitió apreciar la impregnación de  $\text{TiO}_2\text{-C-Ag}$  sobre la fibra de vidrio (Figura 6.25a). Se apreció en la Figura 6.25b-c una distribución homogénea de la Ag sobre la superficie del Ti. Se encontró que las fibras de mayores a  $5 \mu\text{m}$  presentaron fracturas en la formación de la película.

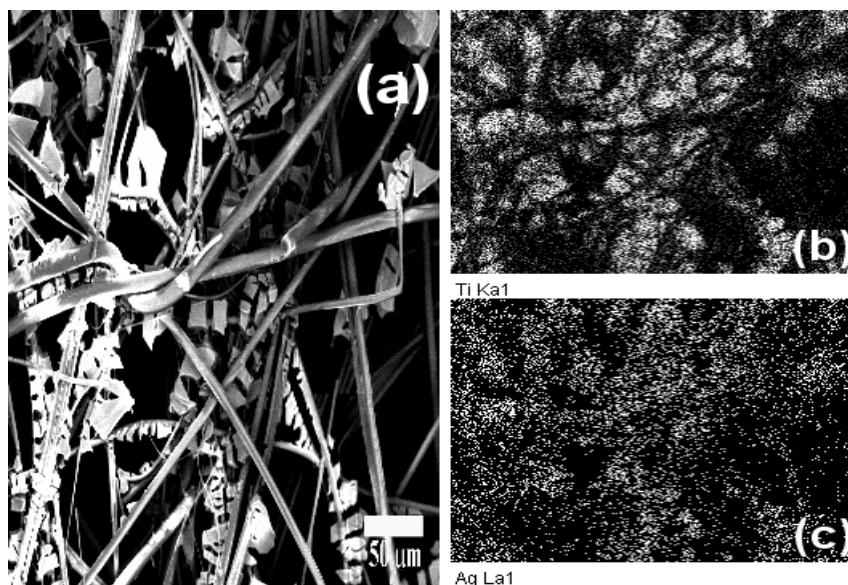


Figura 6.25 Imagen de MET 200 keV del material sintetizado: a)  $\text{TiO}_2\text{-C-Ag}$  en fibra de vidrio comercial, b) distribución de partículas de Ag y c) distribución del Ti.

El análisis de la morfología del material sintetizado realizado en MET, permitió apreciar la fase continua de  $\text{TiO}_2$  que se aprecian como partes claras de la figura 6.26a y la distribución de la plata sobre el material (partes oscuras). Estudios en los cuales se

hace seguimiento de la nucleación han sugerido que las partículas de  $\text{TiO}_2$  son producto de la unión de agregados de los 100 a los 400 nm, en los que la agregación continúa derivada de fenómenos de carga superficial (Simonsen y Søggaard, 2010). El difractograma presenta evidencia de la distribución de las partículas de tamaño nanométrico en el material y su orientación (Figura 6.26b). Además del aglomerado se detectó la presencia de partículas menores a 13 nm (Figura 6.31c). El análisis de distribución de tamaño en la Figura 6.26d de las partículas de plata con tamaño medio de  $7.3 \pm 2.1$  nm.

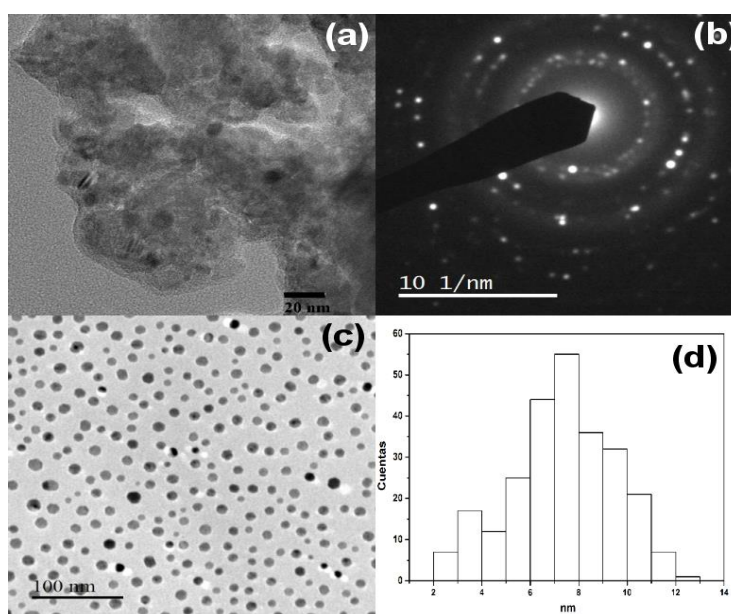


Figura 6.26 Micrografía MET 200x de: (a)  $\text{TiO}_2\text{-C-Ag}$ , (b) difractograma, (c) nanopartículas, y (d) distribución del tamaño de partículas de Ag;  $n=257$ .

La presencia de nanopartículas de plata incrementó el área superficial del material, obteniéndose las isothermas de adsorción de la Figura 6.27a-c. Las isothermas indican la fibra de vidrio y la fibra de vidrio recubierta con  $\text{TiO}_2\text{-C}$  no son materiales porosos. Contrario a lo anterior, el  $\text{TiO}_2\text{-C-Ag}$  soportado en fibra de vidrio (Figura 6.27c)

presento una isoterma tipo IV con un ciclo de histéresis H3, la cual corresponde a un material mesoporoso según lo descrito por (Rouquerol *et al.* 2014). Las fibras impregnadas presentaron un área superficial de 359.8 m<sup>2</sup>/g en TiO<sub>2</sub>-C-Ag, 225.7 m<sup>2</sup>/g en TiO<sub>2</sub>-C y de 108.5 m<sup>2</sup>/g en la fibra de vidrio.

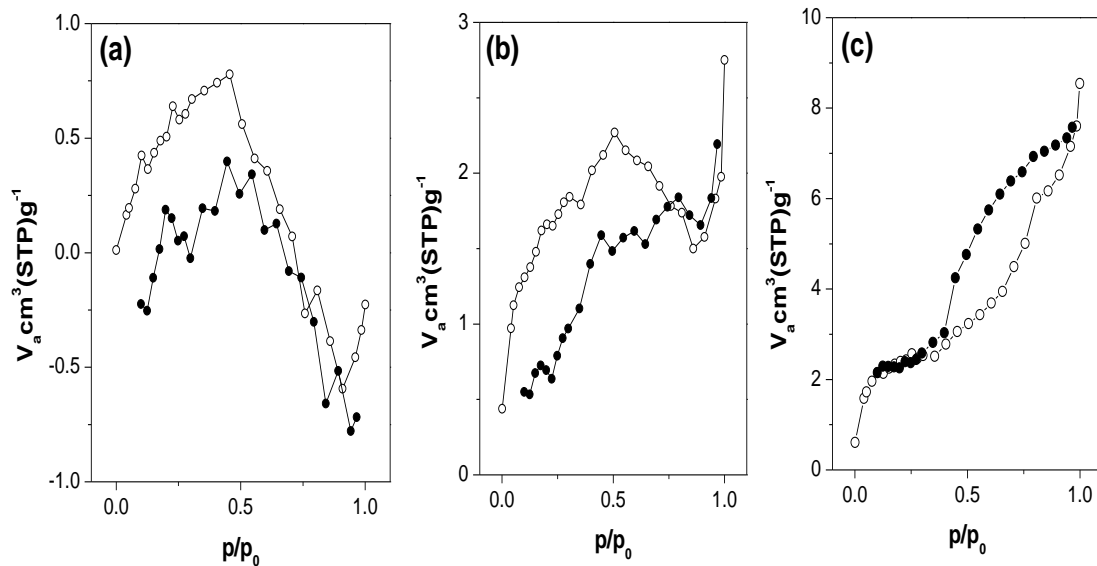


Figura 6.27 Análisis BET de (a) fibra de vidrio, (b) TiO<sub>2</sub>-C/fibra de vidrio y (c) TiO<sub>2</sub>-C-Ag/fibra de vidrio donde: ○ adsorción y ● desorción.

El análisis de la composición superficial fue llevado a cabo por XPS en un barrido 10 escaneos, 400 μm, CAE 200.0, 0.3 eV en de TiO<sub>2</sub>-C y TiO<sub>2</sub>-C-Ag inmovilizado; y se realizó un análisis del soporte como se muestra en la Figura 6.28. Empleando el software v4.87: Build 02815 del equipo se detectaron picos correspondientes a Ti, O, C y Ag en los orbitales 2p, 1s, 1s y 3d, respectivamente.

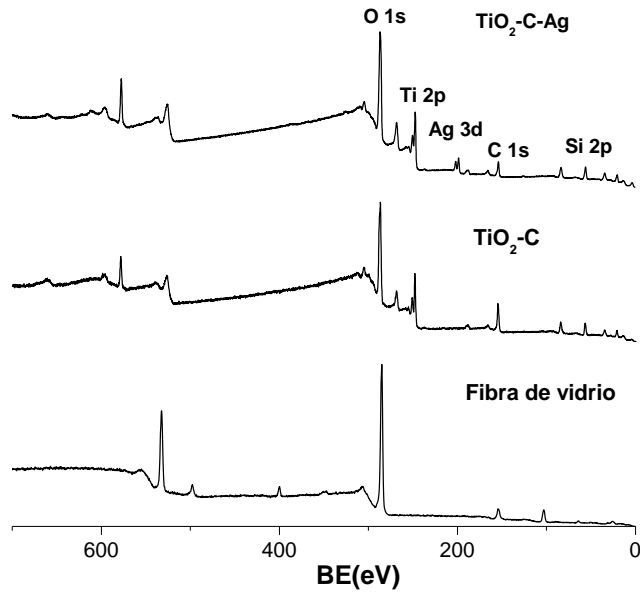


Figura 6.28 Análisis XPS de la superficie de los materiales.

Los análisis de superficie de los espectros XPS se realizaron por medio de un ajuste no lineal de tipo Gaussiano-Lorentziano con línea base de tipo Shirley con el método estático y ajuste de C a 284.8 eV ( $r^2$  de 0.98 y 0.98 para Ag y C, respectivamente) en la Figura 6.29a-b. Se identificó los centros de los grupos carbón epoxi (O-C-O) y carbón carboxilato (O-C=O). Lo anterior coincide con lo reportado por Hassan *et al.* (2014) para la síntesis de TiO<sub>2</sub> dopado con C usando como agente precursor dopante TW80. Los dobletes con centros correspondientes a las especies Ag<sup>0</sup> y Ag<sup>+3</sup> mantuvieron su correspondiente separación de 6 eV en el orbital 3d y coinciden con lo reportado en la base de datos NIST para XPS (Figura 6.29). La mezcla de óxidos como AgO/Ag<sub>2</sub>O resulta en desplazamientos en las energías de enlace de Ag<sup>+</sup> y Ag<sup>3+</sup> de acuerdo a lo descrito por Ferrara *et al.* (2012), este fenómeno se presentó en el material sintetizado. Se encontró la presencia de otras especies que pudieran ser derivadas de nanopartículas menores a los 4 nm cuyos centros corresponden a 369.4 eV (Calderon

*et al.* 2013). De acuerdo a lo observado en MET podría tratarse de partículas primarias que están alrededor de las de mayor tamaño como lo observado por Shin *et al.* (2004) en donde se presentaron corrimientos en la energía de enlace dependiendo el tamaño de las nanopartículas. La presencia de plata metálica usando como precursor  $\text{AgNO}_3$ , ha sido descrito como el producto de la fusión de iones  $\text{Ag}^+$  libres por (Lai *et al.* 2008; Mandal y Bhattacharyya, 2012).

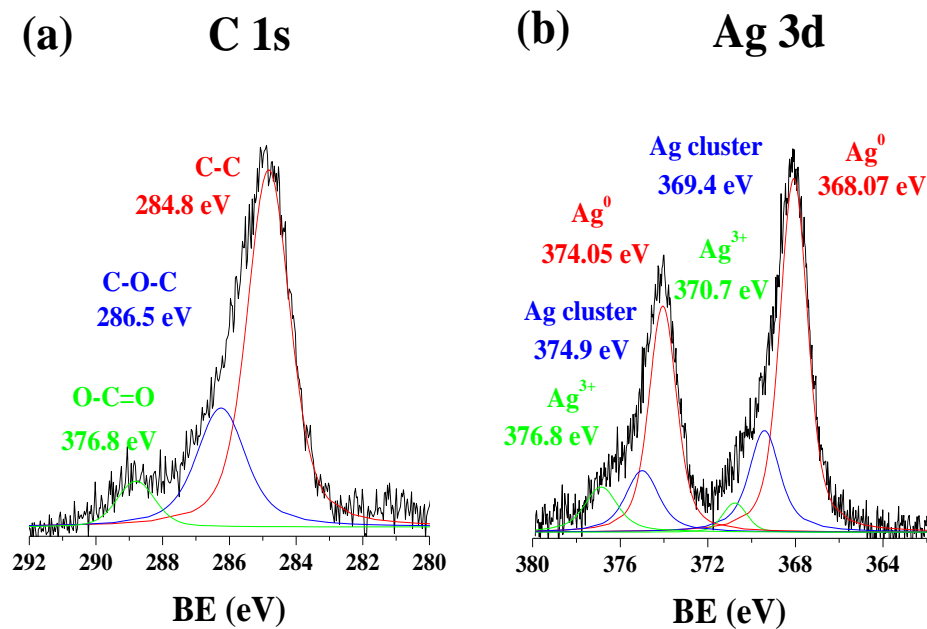


Figura 6.29 Análisis de superficie XPS de las regiones (a) C 1s y (b) Ag 3d de la fibra de vidrio impregnada con  $\text{TiO}_2\text{-C-Ag}$ .

El tratamiento térmico de la solución resulta en la formación de islas de plata metálica en la superficie del  $\text{TiO}_2$ , de acuerdo a lo propuesto por Mohammadi y Fray, (2011) el mecanismo se describe en las Ecuaciones 6.6 a 6.10:





Las nanopartículas de Ag se mantienen unidas a la superficie del TiO<sub>2</sub> como resultado de las interacciones coulombicas entre los átomos de Ag y O (Ferraria *et al.* 2012), mientras que el C forma enlaces Ti-O-C (Neville *et al.*, 2012; Hassan *et al.* 2014). El efecto sinérgico entre dopantes metálicos y no-metálicos puede ser explicado como un incremento en la absorción del TiO<sub>2</sub> en la luz visible por iones no-metálicos, mientras que en los iones metálicos se pueden inducir trampas de electrones reduciendo la velocidad de recombinación de los pares electrón-hueco (Schneider *et al.* 2014). El uso de soportes en material nanoparticulado, previene la liberación de nanopartículas en el ambiente facilitando su recuperación y reúso.

### 6.2.3 Pruebas de degradación de PHE en el reactor fotocatalítico

El espectro de absorbancia de la solución PHE/DMSO/TW80 por medio de espectroscopia UV-Vis permitió seguir los cambios en el PHE gracias a la presencia de enlaces  $\pi$  en su molécula. Las pruebas de degradación se realizaron con luz UVC (254 nm) y luz UVA (365-465 nm), encontrándose una relación en los cambios de las especies de C en la superficie del catalizador y la intensidad de la luz UV.



### 6.2.3.1 Pruebas de degradación de PHE en el reactor fotocatalítico irradiado con luz UVC

En las pruebas que se realizaron en presencia de DMSO, el espectro presentó un efecto hipercrómico de los 240 nm a los 300 nm en las pruebas realizadas con luz UVC (Figura 6.30a-d). El efecto es mayor en los tratamientos con DMSO irradiado con luz UVC, ya que la presencia de este solvente polar puede desestabilizar los orbitales moleculares del PHE y sus derivados en estado basal o excitado (Figura 6.30c y d). La máxima absorbancia característica del PHE en las pruebas con TiO<sub>2</sub>-C/TW80, TiO<sub>2</sub>-C-Ag/TW80 y TiO<sub>2</sub>-C-Ag /TW80/DMSO irradiado con luz UVC fue a ~250 nm sin que se presentaran corrimientos en los picos.

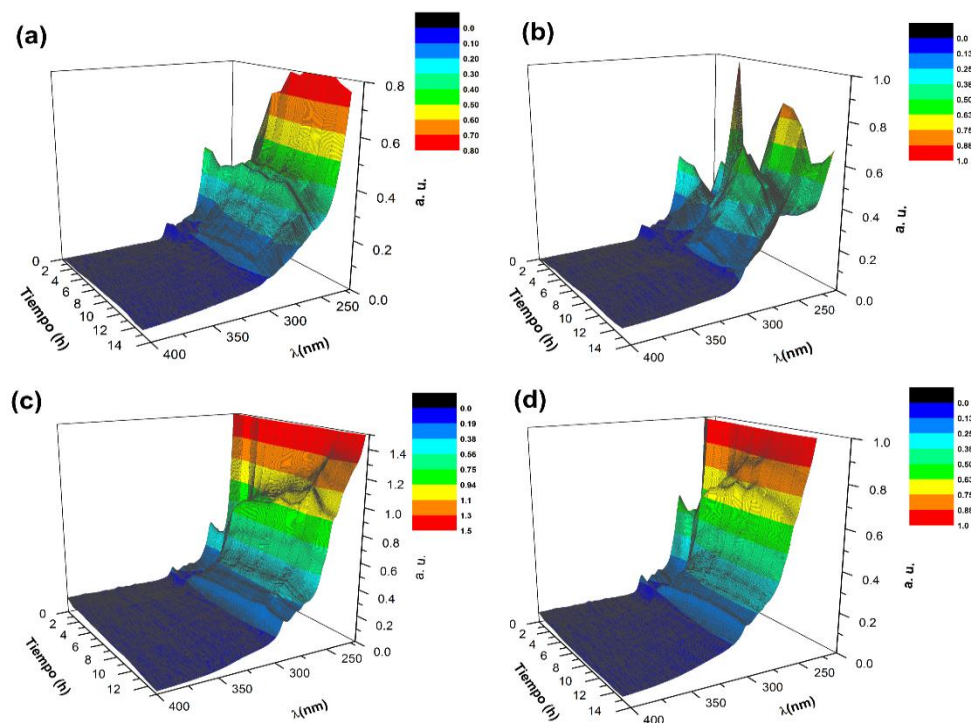


Figura 6.30 Espectro UV-Vis de los tratamientos en el reactor fotocatalítico irradiado con luz UVC por: (a) TiO<sub>2</sub>-C/TW80, (b) TiO<sub>2</sub>-C-Ag/TW80, (c) DMSO/TW80 y (d) TiO<sub>2</sub>-C-Ag/TW80/DMSO.

El seguimiento de pH de las pruebas preliminares se muestra en la Figura 6.31, en donde se aprecia un pH más ácido en los tratamientos con DMSO. El pH de los tratamientos alcanzado con DMSO (pH ~1.9) a las 13 h, fue menor al que sólo contenía TW80 (pH ~ 4.2). Este fenómeno puede ser derivado de la transformación de DMSO a ácido metilsulfónico ( $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$ ), que es uno de los principales productos reportados de la fotooxidación de DMSO (Gollnick y Stracke, 1973; Abellán *et al.* 2009).

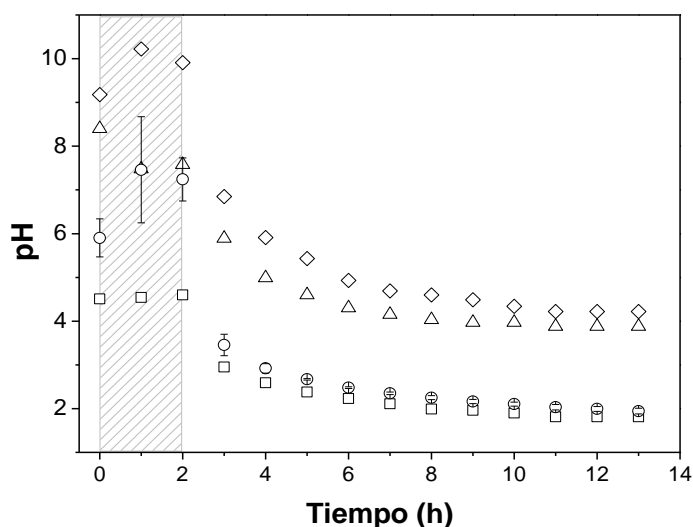


Figura 6.31 Seguimiento del pH de los tratamientos en el reactor fotocatalítico:  $\triangle$  TiO<sub>2</sub>-C/TW80,  $\diamond$  TiO<sub>2</sub>-C-Ag/TW80,  $\square$  TW80/DMSO y  $\circ$  TiO<sub>2</sub>-C-Ag/TW80/DMSO; n=3.

Los porcentajes de remoción alcanzados en los tratamientos irradiados con luz UVC superaron el 90% de remoción de PHE en todos los tratamientos ( $98.7 \pm 1.0$  % luz UVC,  $98.2 \pm 1.05$  % TiO<sub>2</sub>-C y  $99.7 \pm 0.4$  % TiO<sub>2</sub>-C-Ag) como se observa en la Figura 6.32. La prueba de fotólisis con luz UVC no presentó diferencias significativas a las 13 h de tratamiento con respecto a los tratamientos con el catalizador en la prueba LSD ( $P=0.28$ ,  $\alpha= 0.05$ , ANOVA distribución F). La intensidad de la luz UV y la longitud de onda tienen el mayor impacto en las velocidades y porcentajes de degradación alcanzados en TiO<sub>2</sub> (Zhu *et al.* 2012). La absorción de PHE por la fibra de vidrio

recubierta con TiO<sub>2</sub>-C-Ag fue significativamente superior (LSD  $\alpha= 0.05$ ,  $r^{+/-}=0.0003$ ,  $P= 0.13$ , ANOVA F) las primeras 2 horas con respecto a TiO<sub>2</sub>-C como se aprecia en la Figura 6.32. La fibra de vidrio impregnada con TiO<sub>2</sub>-C-Ag no presento diferencias significativas en la degradación de PHE en la longitud de onda de 254 nm, lo cual indica que la presencia de Ag no afecto la actividad fotocatalítica del TiO<sub>2</sub>. La presencia de Ag modifica la carga positiva del TiO<sub>2</sub> a una negativa lo que puede incrementar la interacción de las moléculas de PHE sobre la superficie del TiO<sub>2</sub> (Mandal y Bhattacharyya, 2012). Mientras que la irradiación con luz ultravioleta de alta energía ocasiona transferencia de electrones de las moléculas orgánicas que absorben fotones al semiconductor, lo cual origina la formación de radicales orgánicos y afectando la recombinación de pares electrón-hueco como fue descrito por Agrios *et al.* (2004) en la formación de complejos a partir de clorofenoles.

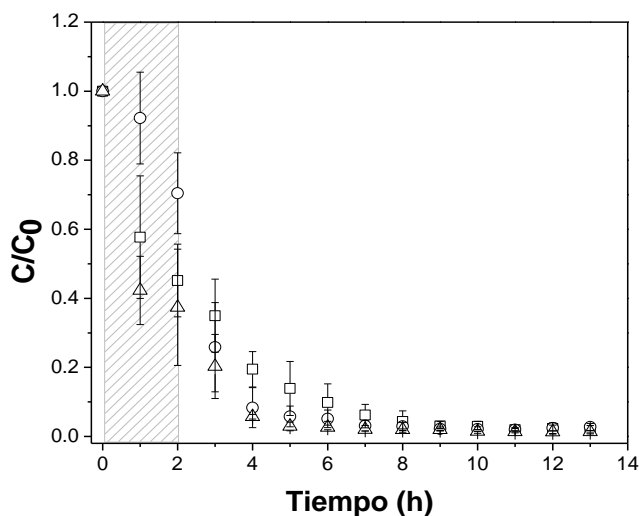


Figura 6.32 Remoción de PHE en los tratamientos con: □ UVC, ○ TiO<sub>2</sub>-C/UVC y △TiO<sub>2</sub>-C-Ag/UVC; n=3.

En los tratamientos no se registraron variaciones en el pH durante las primeras 2 h de oscuridad como se aprecia en la Figura 6.33. El pH de los tratamientos fue de ~1.9 a

las 13 h, este fenómeno se presentó en las pruebas preliminares sólo en presencia de DMSO. El cambio en pH se atribuyó a la transformación de DMSO a  $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$ , que es uno de los principales productos reportados de la irradiación con luz UV de DMSO.

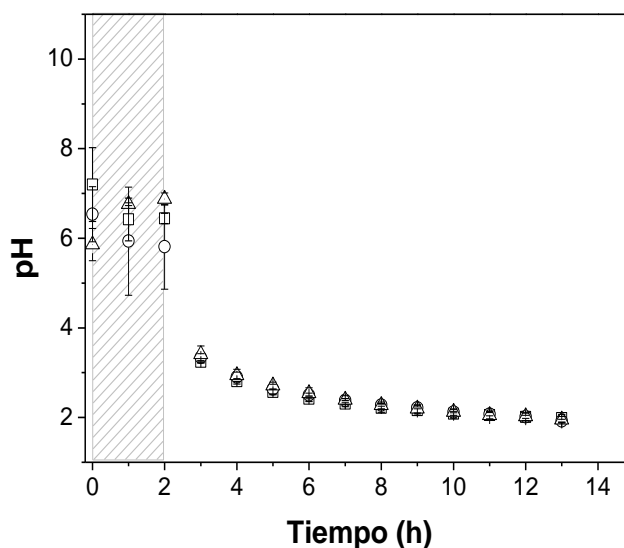


Figura 6.33 Seguimiento del pH de los tratamientos de PHE:  $\square$  UVC,  $\circ$   $\text{TiO}_2\text{-C/UVC}$  y  $\triangle$   $\text{TiO}_2\text{-C-Ag/UVC}$ ;  $n=3$ .

El seguimiento de la absorbancia por medio de espectroscopia UV-Vis permitió seguir los cambios en el PHE gracias a la presencia de enlaces  $\pi$  en su molécula, cuyo espectro presentó un efecto hipercrómico en todas las pruebas de los 240 nm a los 300 nm (Figura 6.34). La presencia de DMSO puede desestabilizar los orbitales moleculares del PHE y sus derivados en estado basal o excitado (Figura 6.34 a-c). La máxima absorbancia característica del PHE en las pruebas fue a  $\sim 250$  nm, sin que se presentaran corrimientos en los picos. El incremento de absorbancia predominó en los espectros UV-Vis de los tratamientos con catalizador. En todos los tratamientos predominó un efecto hipercrómico a los 230 nm.

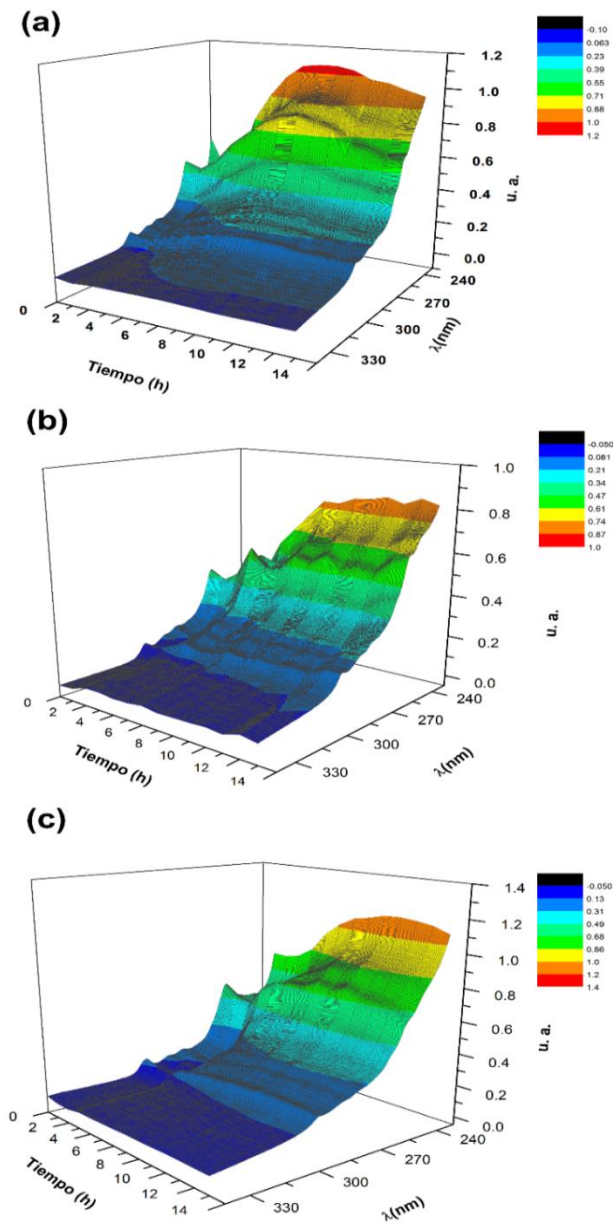


Figura 6.34 Espectro UV-Vis de los tratamientos en el reactor fotocatalítico por: (a) UVC, (b) TiO<sub>2</sub>-C/UVC y (c) TiO<sub>2</sub>-C-Ag/UVC.

Se realizó un análisis composicional de la superficie del catalizador TiO<sub>2</sub>-C por medio de XPS, el cual se muestra en la Figura 6.35. La deconvolución de los datos del análisis XPS fue por el método estático con un ajuste Gaussiano-Lorentziano con la línea base tipo Shirley y corrección al carbón adventicio a los 284.8 eV (C-C). Los ajustes de las

regiones C 1s, O 1s y Ti 2p, para los tratamientos fueron de  $r^2=0.98$  para C 1s,  $r^2=0.99$  para O 1s y  $r^2=0.96$  para Ti 2p a las 0 h y de  $r^2=0.98$  para C 1s,  $r^2=0.99$  para O 1s y  $r^2=0.87$  para Ti 2p. Se puede observar en la región C 1s, la presencia de grupos carbono epoxi (C-O-C) y carbón carboxilato (O-C=O) a las 0 h de tratamiento. En tanto que el tratamiento por 13 h, resultó en la presencia de grupos carbón hidroxilo (C-O) y carbón carbonilo (C=O). En la región O 1s, no se presentaron cambios importantes en las especies; al igual en la región Ti 2p. La adsorción de grupos carboxilo en la superficie de TiO<sub>2</sub> (cuya carga es negativa), es el resultado de las fuerzas de interacción ó Van der Waals (Sugimoto *et al.* 2003).

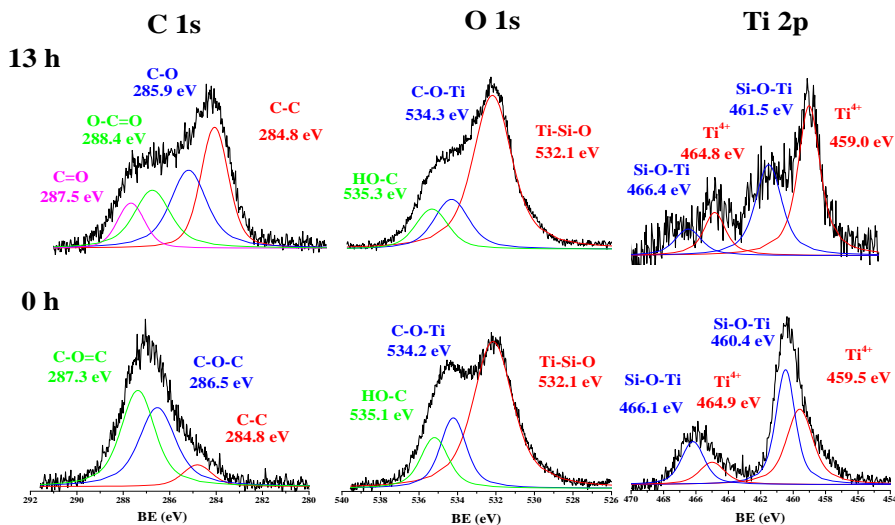


Figura 6.35 Análisis de superficie XPS de TiO<sub>2</sub>-C antes y después de los tratamientos irradiados con luz UVC.

En este trabajo se presentaron porcentajes de remoción similares en los tratamientos usando el TiO<sub>2</sub>-C y TiO<sub>2</sub>-C-Ag; sin embargo, se observa una mayor cantidad de especies de C en presencia de Ag en la Figura 6.36 en comparación con la Figura 6.35 después de 13 h de tratamiento. Lo anterior puede ser asociado a una mayor oxidación

de las moléculas depositadas en la superficie de TiO<sub>2</sub>-C-Ag. Por lo que presencia de Ag distribuida en la superficie de TiO<sub>2</sub> ha demostrado beneficiar la afinidad de PHE en el material y la actividad fotocatalítica. La deconvolución de los datos del análisis XPS fue realizada como se describió en TiO<sub>2</sub>-C. Los ajustes de las regiones C 1s, O 1s, Ti 2p y Ag 3d, para los tratamientos fueron de  $r^2=0.98$  para C 1s,  $r^2=0.99$  para O 1s,  $r^2=0.99$  para Ti 2p y  $r^2=0.98$  para Ag 3d a las 0 h y de  $r^2=0.98$  para C 1s,  $r^2=0.99$  para O 1s,  $r^2=0.94$  para Ti 2p y  $r^2=0.98$  para Ag 3d a las 13 h de tratamiento.

El efecto de la presencia de Ag en TiO<sub>2</sub> ha sido descrito como la inhibición en la recombinación de los pares electrón-hueco (Mandal y Bhattacharyya, 2012). Las nanopartículas de Ag son altamente reactivas al oxígeno y pueden transferir electrones a muchos aceptores orgánicos e inorgánicos (Henglein *et al.* 1991). Los estados químicos en los que se encuentra distribuida la plata son directamente afectados por la cantidad de precursor empleado, lo cual puede interferir en la actividad fotocatalítica (Zhao y Chen, 2011). El incremento de la energía de enlace en las especies de Ag se atribuye a la ganancia de electrones resultado de la formación de enlaces derivados de la irradiación con luz UV de alta energía. Se presentó un doblete en la órbita de la división del espín Ag 3d<sup>5/2</sup> con centro en la energía de enlace (BE) 367.3 eV, el cual no pudo ser identificado debido a que no se cuenta con la información suficiente para poder asociarlo a una especie de Ag de acuerdo a los reportes en la base de datos del NIST para XPS.

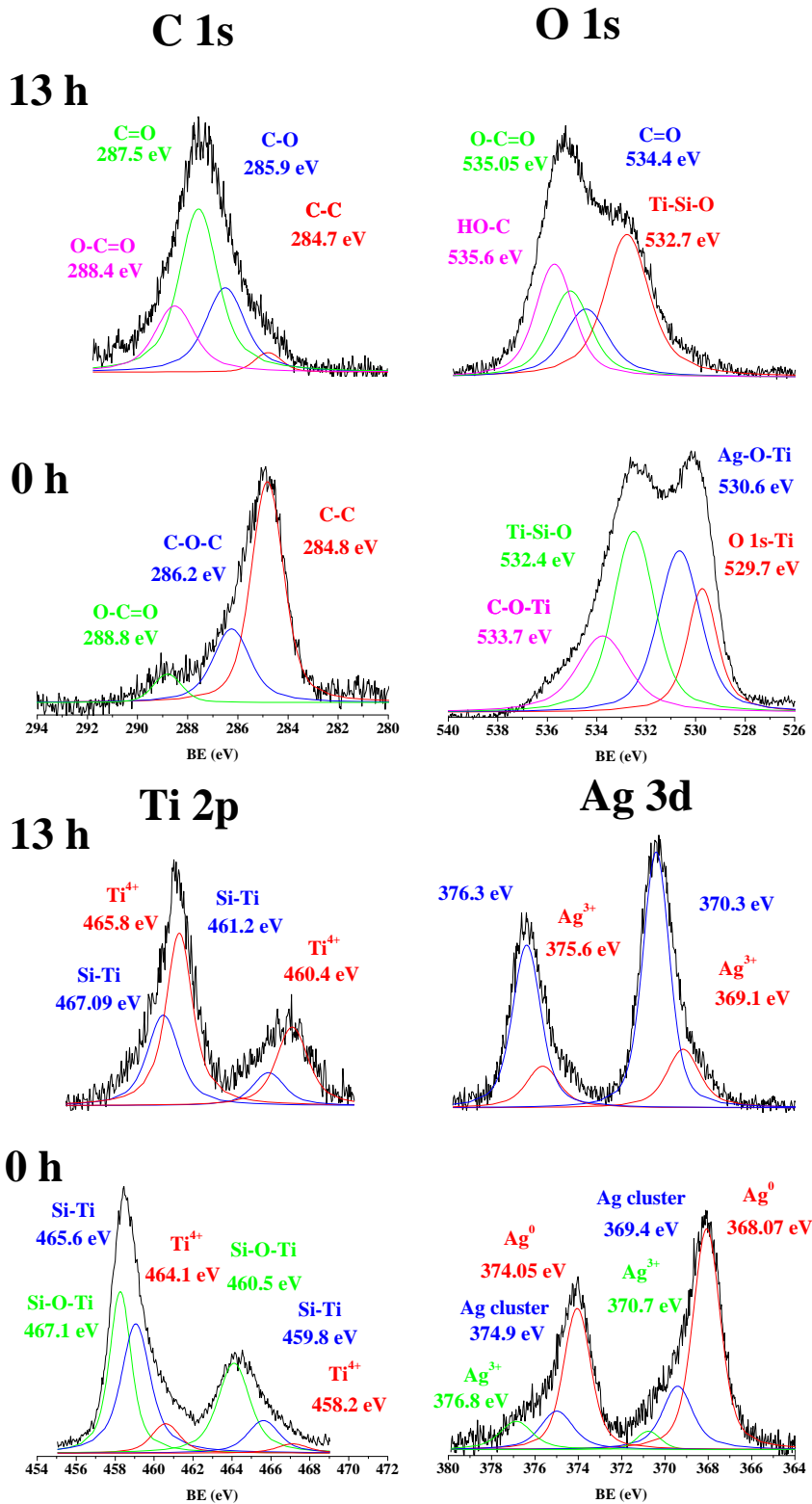


Figura 6.36 Análisis de superficie XPS de TiO<sub>2</sub>-C-Ag antes y después de los tratamientos irradiados con luz UVC.



En el análisis por GC-MS no se detectó la presencia de productos derivados de la degradación de PHE. El rompimiento de los enlaces endocíclicos C-C en los hidrocarburos cíclicos es más lento que en los alifáticos como resultado de la tendencia del catión alquenilo de reciclar (formado por la división  $\beta$  de un catión cicloalquilo), o debido a una menor velocidad de división  $\beta$  en los iones de cationes cicloalquilo debido a una orientación no favorable del orbital  $\pi$  en el átomo de C cargado positivamente y en el rompimiento del enlace  $\beta$  (Du *et al.* 2005). En el caso de los tratamientos con luz UVC, la molécula de PHE fue modificada ya que es parte de reacciones fotoquímicas con una alta energía de longitud de onda de 100 a 315 nm (De Lima y Ferreira, 2005; De Bruyn *et al.* 2012). La energía entre el HOMO y el LUMO de PHE es de 8.2, por lo que se requiere una alta intensidad para hacer modificaciones en la molécula (De Lima y Ferreira, 2015). La luz UVC empleada fue de 254 nm, la cual es energía de alta intensidad capaz de producir vibraciones en los enlaces C-C del PHE. Lo anterior fue confirmado con la remoción de  $98.7 \pm 1.0$  % en el tratamiento sin catalizador después de irradiar la solución PHE/DMSO/TW80 por 11 h.

### **6.2.3.2 Pruebas de degradación de PHE en el reactor fotocatalítico irradiado con luz UVA**

Las pruebas de degradación en luz UVA presentaron una remoción de  $91.1 \pm 5.2$ % de PHE en presencia de TiO<sub>2</sub>-C-Ag (Figura 6.37). En ausencia del catalizador no se presentó remoción encontrando  $23.6 \pm 6.4$ % en el líquido y  $86.8 \pm 6.1$ % en las paredes del reactor. El PHE se deposita en la superficie del TiO<sub>2</sub>-C-Ag debido a la carga

negativa que produce la presencia de la Ag en el material reduciendo la capacidad de adsorción (Chuang y Chen, 2009).

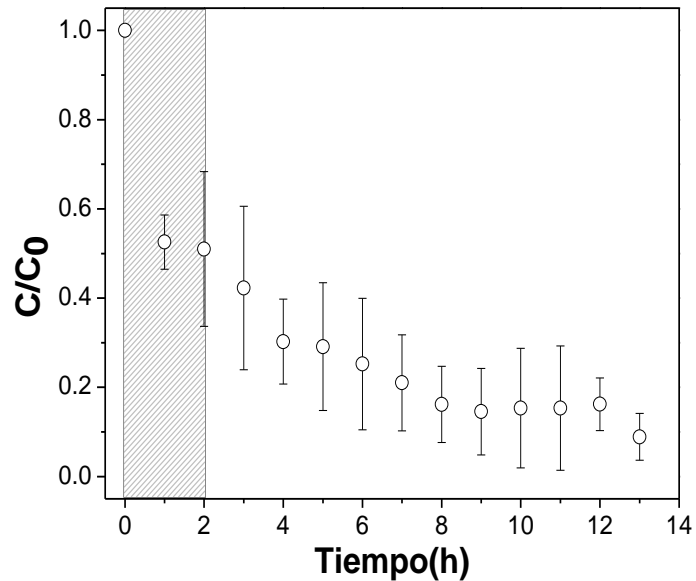


Figura 6.37 Remoción de PHE en los tratamientos irradiados con luz UVA; n=3.

El medio alcanzó un pH cercano a 4.5 y de 5.5 después de 13 h de tratamiento en presencia y ausencia del catalizador bajo luz UVA (Figura 6.38). Lo anterior confirma el efecto de degradación de DMSO por la luz UVC, que disminuye el pH del medio, aunque este no influye en la degradación de PHE (Henglein *et al.* 1991).

El espectro de absorbancia de los 240 a los 300 nm en los tratamientos irradiados con UVA presentaron fluctuaciones en la intensidad. No se observaron corrimientos hacia el rojo en los tratamientos (Figura 6.39). A diferencia de los tratamientos con luz UVC, no se presentaron efectos hipercrómicos en el espectro.

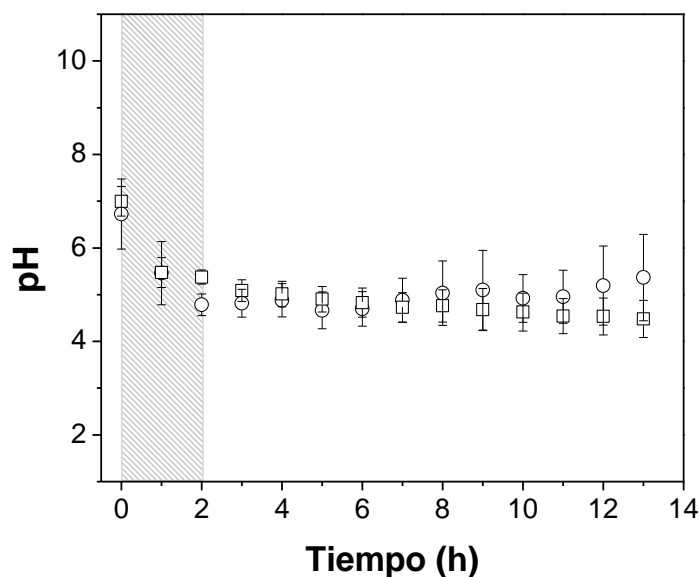


Figura 6.38 Seguimiento del pH de los tratamientos irradiados con: □ UVA y ■ TiO<sub>2</sub>-C-Ag/UVA; n=3.

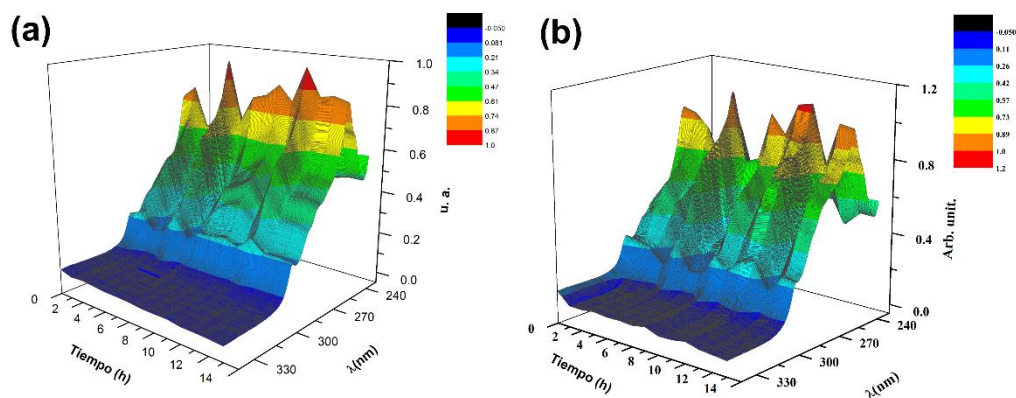


Figura 6.39 Espectro UV-Vis de los tratamientos en el reactor fotocatalítico por: (a) UVA y (b) TiO<sub>2</sub>-C-Ag/UVA.

En el análisis composicional por XPS de C 1s, se aprecia la presencia de una mayor cantidad de especies de carbón que en los tratamientos irradiados con luz UVC (Figura 6.40). La deconvolución de los datos del análisis XPS fue por el método estático con un ajuste Gaussiano-Lorentziano con la línea base tipo Shirley y corrección al carbón adventicio a los 284.8 eV (C-C). Los ajustes de las regiones C 1s, O 1s Ti 2p y Ag 3d, para los tratamientos fueron de  $r^2=0.98$  para C 1s,  $r^2=0.99$  para O 1s,  $r^2=0.99$  para Ti

2p y  $r^2=0.98$  para Ag 3d a las 0 h y de  $r^2=0.97$  para C 1s,  $r^2=0.99$  para O 1s,  $r^2=0.97$  para Ti 2p y  $r^2=0.93$  para Ag 3d a las 13 h de tratamiento. Estudios realizados en diferentes frecuencias de luz UV, han probado que en rangos bajos del espectro electromagnético se produce una mayor degradación en tratamientos fotocatalíticos (Agrios *et al.* 2003; Hurum *et al.* 2004). Lo anterior se asocia a la excitación que se produce en los enlaces de la molécula de PHE en longitudes de onda de  $\sim 250$  nm (De Lima, 2005; De Bruyn *et al.* 2012).

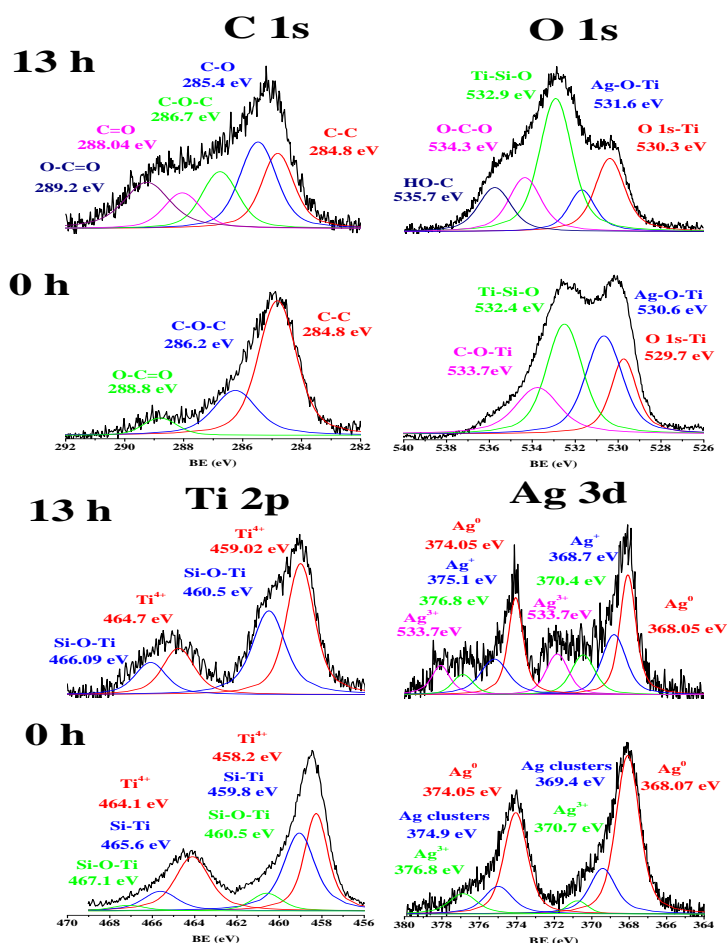


Figura 6.40 Análisis de superficie XPS de TiO<sub>2</sub>-C-Ag antes y después del tratamiento irradiado con luz UVA.

### 6.3 Pruebas de degradación de PHE en el sistema enzimático acoplado al fotocatalítico

El acoplamiento del sistema enzimático seguido del tratamiento fotocatalítico se realizó bajo la irradiación de luz UVA. Se seleccionó la luz UVA, ya que el tratamiento con luz UVC se encuentra dentro de los límites máximos permisibles de PHE son 0.0067 mg/L en agua dulce y salada según la USEPA y WFD UE. Mientras que un estudio realizado por Wu *et al.* (2014) establece 0.051- 0.0427 mg/L de PHE para especies acuáticas. El porcentaje de remoción alcanzado fue de  $94.9 \pm 2.1\%$  (Figura 6.41).

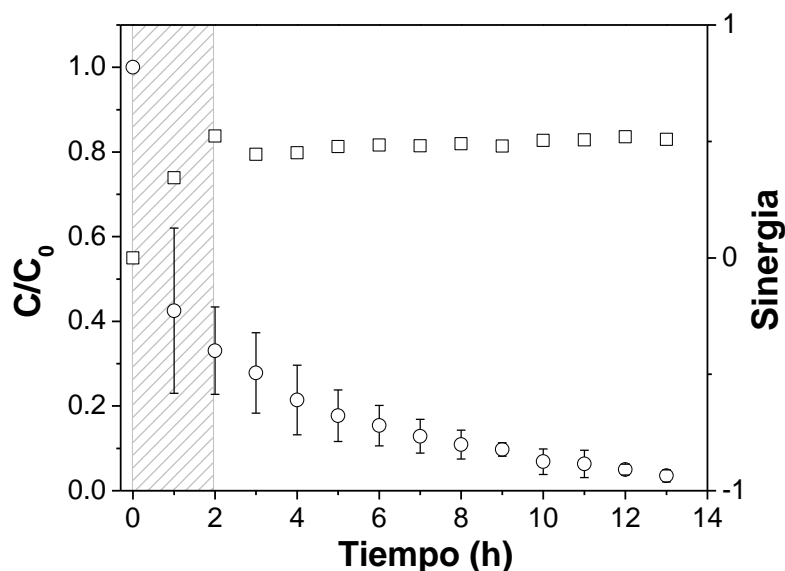


Figura 6.41 Remoción de PHE en el tratamiento enzimático/fotocatalítico irradiado con luz UVA; n=3.

Se realizaron los análisis de sinergia de acuerdo a lo reportado por Torres *et al.* (2008), tomando en consideración el porcentaje de remoción de los tratamientos individuales y en conjunto como se aprecia en la Figura 6.41. En este análisis valores arriba de 1 indican un efecto aditivo y valores menores a -1 un efecto antagónico. En este trabajo

la interacción del tratamiento enzimático y el tratamiento biológico no tuvo un efecto, aunque se mejoró el porcentaje de remoción de PHE del tratamiento con  $\text{TiO}_2\text{-C-Ag}$  irradiado con luz UVA.

Lo anterior indica que no ambos tratamientos presentaron superficies activas en la remoción de PHE, y que los productos de transformación de la mezcla PHE/TW80/DMSO del proceso fotocatalítico no inhiben la actividad de las enzimas crudas atrapadas en hidrogel de alginato. La presencia de productos de degradación no pudo ser detectada en UPLC-MS, bajo las condiciones ensayadas. Sin embargo, el cambio en el pH del sistema que se mantuvo cercano a 4.5 durante el tratamiento (Figura 6.42), es un indicador al igual de la transformación del DMSO.

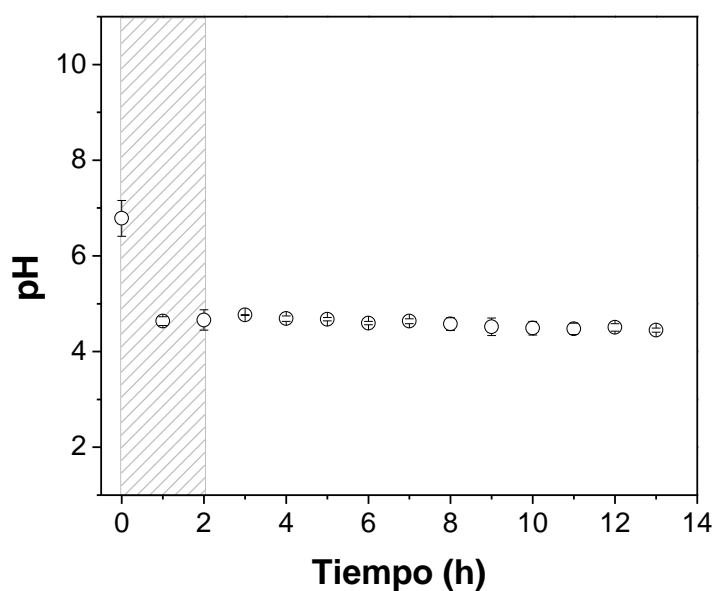


Figura 6.42 Seguimiento del pH el tratamiento enzimático/fotocatalítico irradiado con luz UVA de PHE; n=3.

Mientras que el cambio en el espectro de absorbancia UV-Vis del tratamiento acoplado de la Figura 6.43, presenta un efecto hipocrómico marcado entre los 260 y 280 nm.

Este fenómeno no se presentó en los tratamientos fotocatalíticos individuales, únicamente en el tratamiento enzimático. Lo que indica, que transformación de los compuestos presentes en la solución pudo ser mayor en el sistema acoplado.

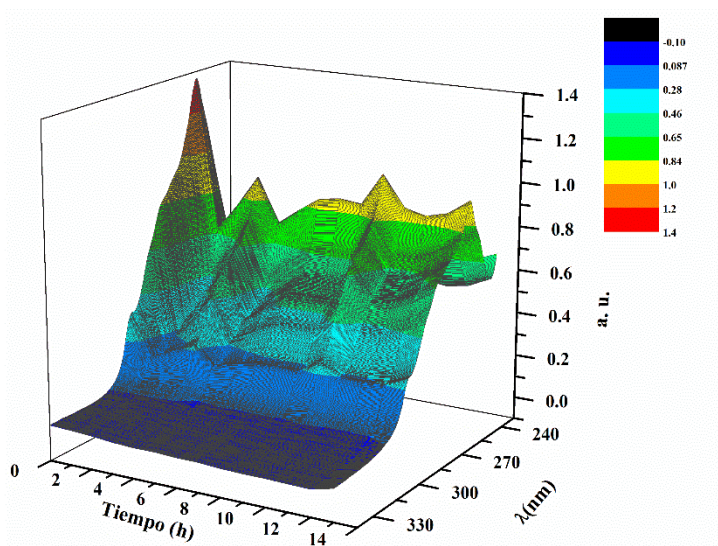


Figura 6.43 Espectro de absorbancia el tratamiento enzimático/fotocatalítico irradiado con luz UVA de PHE.

La transformación de los compuestos, fue apreciada en la superficie del hidrogel. El cual presenta una menor cantidad de especies de carbono a diferencia del tratamiento individual como se observa en la Figura 6.44a. La deconvolución de los datos del análisis XPS fue por el método estático con un ajuste Gaussiano-Lorentziano con la línea base tipo Shirley y corrección al carbón adventicio a los 284.8 eV (C-C). Los ajustes de las regiones C 1s, O 1s Ti 2p y Ag 3d, para los tratamientos fueron de  $r^2=0.98$  para C 1s,  $r^2=0.99$  para O 1s,  $r^2=0.99$  para Ti 2p y  $r^2=0.98$  para Ag 3d a las 0 h y de  $r^2=0.97$  para C 1s,  $r^2=0.99$  para O 1s,  $r^2=0.97$  para Ti 2p y  $r^2=0.93$  para Ag 3d a las 13 h de tratamiento.

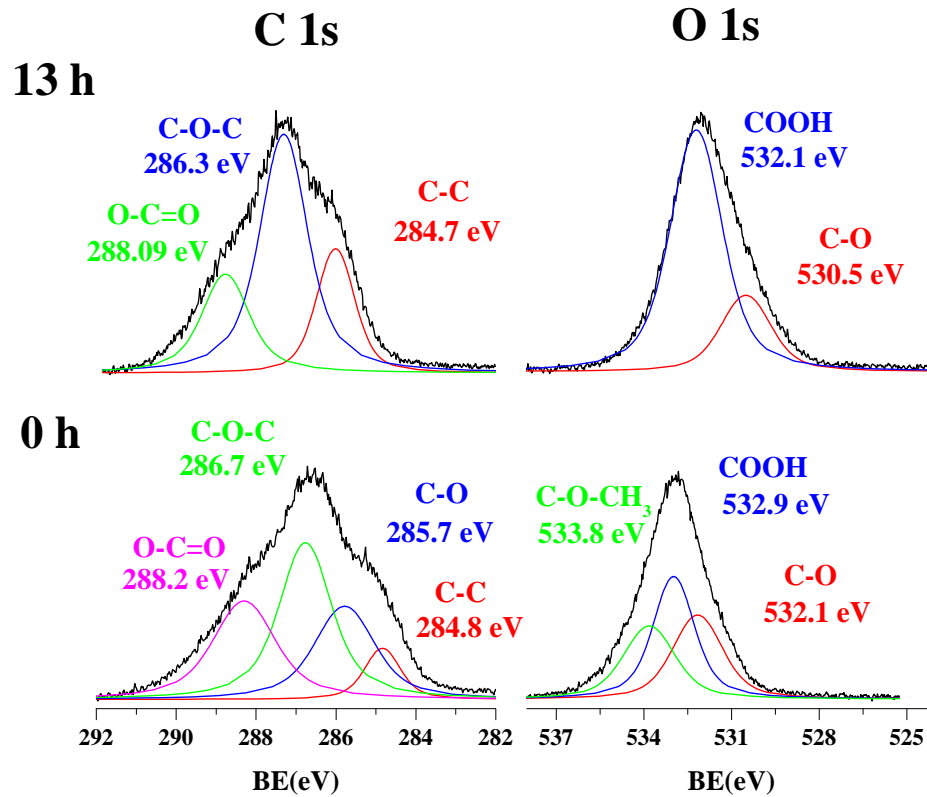


Figura 6.44 Análisis superficial XPS del tratamiento enzimático acoplado de PHE.

El TiO<sub>2</sub>-C-Ag presentó un comportamiento similar al tratamiento individual con una mayor diversidad de especies de C a diferencia del tratamiento irradiado con luz UVC como se aprecia en la Figura 6.45. La deconvolución de las regiones C 1s, O 1s Ti 2p y Ag 3d se realizó conforme a lo establecido para los hidrogeles con enzima obteniendo los siguientes ajustes:  $r^2=0.98$  para C 1s,  $r^2=0.99$  para O 1s,  $r^2=0.99$  para Ti 2p y  $r^2=0.98$  para Ag 3d a las 0 h y de  $r^2=0.99$  para C 1s,  $r^2=0.99$  para O 1s,  $r^2=0.95$  para Ti 2p y  $r^2=0.93$  para Ag 3d a las 13 h de tratamiento.



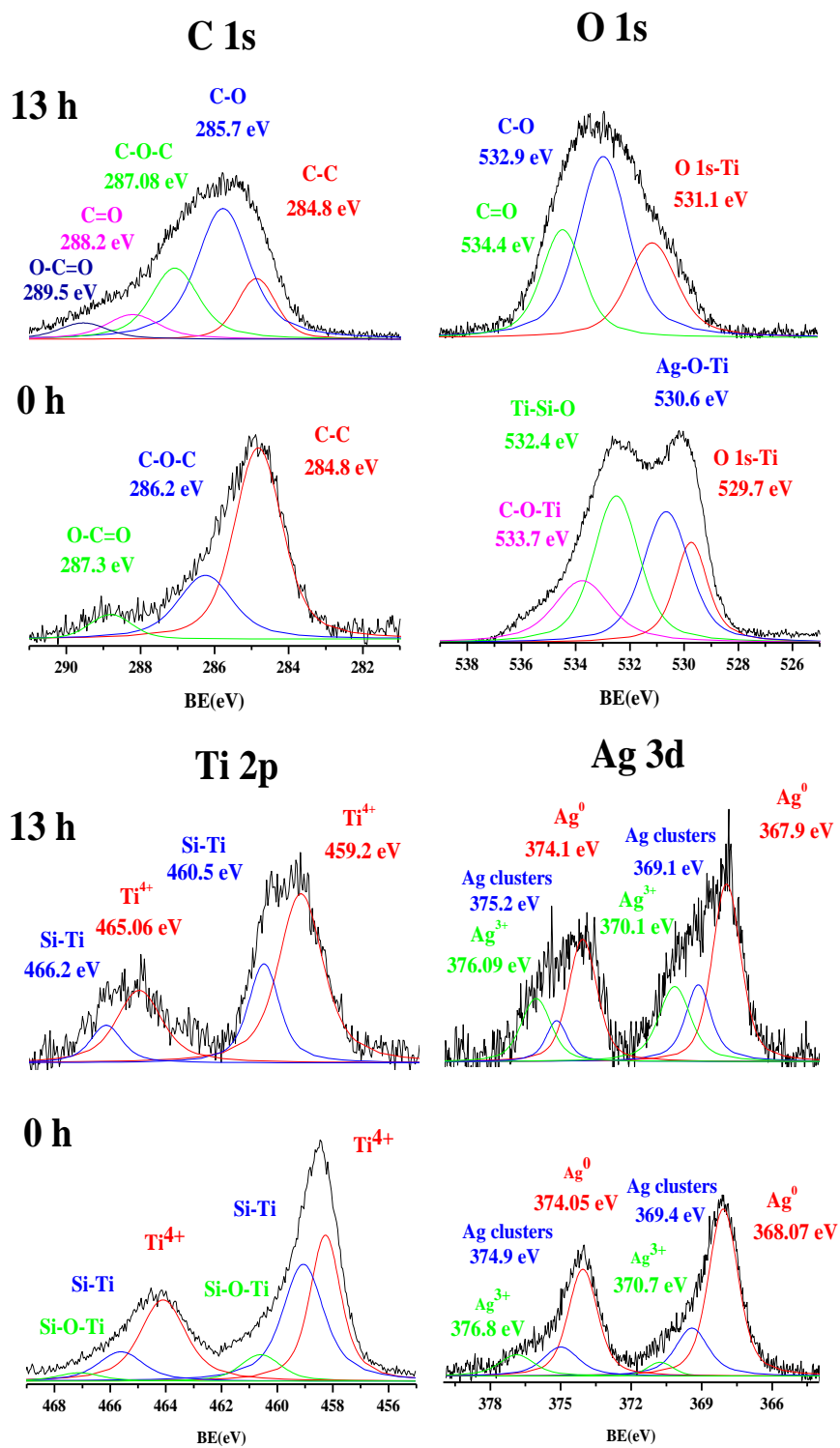


Figura 6.45 Análisis superficial XPS del tratamiento acoplado fotocatalítico irradiado con luz UVA de PHE.

Las concentraciones alcanzadas a las 13 h de tratamiento, fueron inferiores para el TiO<sub>2</sub>-C-Ag irradiado con luz UVC (Tabla 6.6). El tratamiento acoplado mejoró el porcentaje de remoción del tratamiento de TiO<sub>2</sub>-C-Ag irradiado con luz UVA, pero no supero el uso de luz de alta frecuencia. Los tratamientos acoplados presentan remociones inferiores que de manera individual en tratamientos con O<sub>3</sub>, sonicación y fotocátalisis (Torres-Palma *et al.* 2010; Chen *et al.* 2014). En este trabajo la eficiencia de los procesos no se ve comprometida al adaptar el funcionamiento del sistema a uno de los tratamientos.

Tabla 6.7 Porcentajes de remoción de PHE alcanzados en los diferentes tratamientos, n=3.

Tratamiento	Concentración (mg/L)	Porcentaje de remoción
UVC	0.29 ± 0.2	98.7 ± 1.0
TiO <sub>2</sub> -C UVC	0.33 ± 0.2	98.2 ± 1.05
TiO <sub>2</sub> -C –Ag UVC	0.0002 ± 2.9 × 10 <sup>-5</sup>	99.7 ± 0.4
UVA	28.03 ± 0.3	N. D.
TiO <sub>2</sub> -C –Ag UVA	2.94 ± 1.8	90.9 ± 5.6
Hidrogel	10.87 ± 4.7	45.3 ± 23.9
Hidrogel con enzimas	0.83 ± 0.11	94.3 ± 0.7
Hidrogel con enzimas/TiO <sub>2</sub> -C –Ag UVA	0.84 ± 0.35	94.9 ± 2.1

## CONCLUSIONES

El uso de cultivos mixtos permite incrementar la actividad Lcc de *T. maxima*, cuando es inoculada con *P. carneous* usando como fuente de carbono 20 g/L de glicerol y una proporción de inóculo 1 a 1. Lo anterior indica que *P. carneous* es un inductor biológico que favorece la actividad Lcc en *T. maxima*. El extracto precipitado con 83.3% de acetona presentó baja actividad Lcc y MnP; sin embargo, el contenido de proteínas fue más alto que con 75% de acetona. El atrapamiento en gel de alginato del precipitado con 83.3%, presentó actividad en la superficie de las perlas en comparación con las perlas sin enzimas. Las pruebas de degradación de PHE en presencia de DMSO y TW80 en la columna empacada con el hidrogel con enzimas presentaron eficiencias comparables con el sistema fotocatalítico alcanzando un  $94.3 \pm 0.7\%$  de remoción. Los ensayos enzimáticos son insuficientes para poder definir el conjunto de enzimas responsables de la remoción de PHE en las perlas de alginato. Sin embargo, los análisis de superficie por medio de espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X permitieron sugerir una posible relación entre el incremento de especies de carbono oxidadas en la superficie de hidrogeles con enzimas y la remoción de PHE.

La síntesis del catalizador para el sistema fotocatalítico empleando el método sol-gel permite incorporar agentes metálicos y no metálicos en la formación de la película de TiO<sub>2</sub>. La Ag y el C se incorporan como islas en la superficie del material, el análisis de superficie por medio de espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X confirmó la presencia de especies de Ag y C. La fibra de vidrio comercial

presentó resistencia a las fuerzas de cizalla del mezclado y no afectó el desempeño de los tratamientos fotocatalíticos permitiendo la recuperación del catalizador.

La remoción de PHE en el sistema fotocatalítico en presencia de DMSO y TW80 no fue afectado por la presencia de estos competidores de fotones en las frecuencias de la luz UVA y UVC. El sistema fotocatalítico alcanzó  $99.7 \pm 0.4\%$  de remoción de PHE con  $\text{TiO}_2\text{-C-Ag}$  y  $98.2 \pm 1.05\%$  de remoción de PHE con  $\text{TiO}_2\text{-C}$  irradiado con luz UVC, mientras en las pruebas con luz UVA el  $\text{TiO}_2\text{-C-Ag}$  alcanzó un  $90.9 \pm 5.6\%$  de remoción de PHE. De todos los tratamientos, la combinación de luz UVC y  $\text{TiO}_2\text{-C-Ag}$ , resultó en cambios en la superficie del catalizador y una menor generación de especies de carbono. En el tratamiento  $\text{TiO}_2\text{-C-Ag/UVC}$  se alcanzaron concentraciones de PHE inferiores a los límites máximos permisibles establecidas para PHE en agua ( $6.7 \mu\text{g/L}$  de PHE). Lo anterior indica que la presencia de C y Ag en el  $\text{TiO}_2$  es efectiva en la degradación de PHE.

En el tratamiento acoplado se alcanzó una remoción de  $94.9 \pm 2.1\%$  de PHE quedando  $0.84 \pm 0.35 \text{ mg/L}$  en agua tratada. Lo anterior indica que la remoción de PHE por el acoplamiento del sistema enzimático/fotocatalítico en las condiciones ensayadas no es inferior a los límites máximos permisibles para PHE en al agua. Sin embargo, el uso de  $\text{TiO}_2\text{-C-Ag/UVA}$  y enzimas crudas atrapadas en alginato mejoró la remoción alcanzada por el tratamiento fotocatalítico individual en la presencia de DMSO y TW80. La aplicación del tratamiento acoplado en la remoción de PHE en agua marca un precedente para el desarrollo de tratamientos enzimáticos y fotocatalíticos que no requieren condiciones especiales para su aplicación.

## RECOMENDACIONES

Se sugiere la determinación de parámetros cinéticos y termodinámicos en el sistema de los tratamientos de manera individual y acoplados, con el propósito de conocer la eficiencia del sistema y tener las bases para poder desarrollar estudios de optimización, así como realizar dichas pruebas en un simulador de radiación solar después de determinar la energía de activación del catalizador.

Debido a la complejidad de la solución PHE/DMSO/TW80, se requiere el uso de cartuchos de extracción en fase sólida con afinidad a compuestos polares y ácidos orgánicos, con el propósito de elucidar los productos de degradación de tratamiento.

Una alternativa para la determinación del ácido metilsulfónico producto de degradación del dimetil sulfóxido puede ser la formación de complejos que absorben en el rango de la luz visible empleando sales de diazonio.

Aunado a lo anterior, llevar a cabo pruebas de toxicidad en el agua tratada permitiría tener un panorama más amplio de los alcances del tratamiento y su aplicabilidad.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abellán M. N., Dillert R., Giménez J., Bahnemann D. (2009) Evaluation of two types of TiO<sub>2</sub>-based catalysts by photodegradation of DMSO in aqueous suspension. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **202**(2-3):164–171.
- Agrios A. G., Gray K. A., Weitz E. (2003) Photocatalytic transformation of 2,4,5-trichlorophenol on TiO<sub>2</sub> under sub-band-gap illumination. *Langmuir* 19(4):1402–1409.
- Agrios A. G., Gray K. A., Weitz E. (2004) Narrow-band irradiation of a homologous series of chlorophenols on TiO<sub>2</sub>: charge-transfer complex formation and reactivity. *Langmuir* 20(14):5911–5917.
- Ahmed E. M. (2015) Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research* 6(2):105–121.
- Alkaim A. F., Kandiel T. A., Hussein F. H., Dillert R., Bahnemann D. W. (2013) Enhancing the photocatalytic activity of TiO<sub>2</sub> by pH control: a case study for the degradation of EDTA. *Catalysis Science & Technology* 3(12):3216.
- Arun A., Raja P. P., Arthi R., Ananthi M., Kumar K. S., Eyini M. (2008) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) biodegradation by basidiomycetes fungi, *Pseudomonas Isolate*, and their cocultures: comparative in vivo and in silico approach. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 151(2-3):132–142.
- Asgher M., Shahid M., Kamal S., Iqbal H. M. N. (2014) Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 101:56–66.

- Bader J., Mast-Gerlach E., Popović M. K., Bajpai R., Stahl U. (2009) Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology* 109(2):371–387.
- Baldrian P. (2004) Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 50(3):245–253.
- Baldrian P., Valášková V., Merhautová V., Gabriel J. (2005) Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. *Research in Microbiology* 156(5-6):670–676.
- Barr T. L. (1995) Nature of the use of adventitious carbon as a binding energy standard. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films* 13(3):1239-1246.
- Bezalel L., Hadar Y., Fu P. P., Freeman J. P., Cerniglia C. E. (1996) Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 62(7):2547-2553.
- Bhushan B., Pal A., Jain V. (2015) Improved enzyme catalytic characteristics upon glutaraldehyde cross-linking of alginate entrapped xylanase isolated from *Aspergillus flavus* MTCC 9390. *Enzyme Research* 2015:1–9.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2): 248–254.
- Brakhage A. A. (2012) Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology* 11(1), 21–32.
- Cai, O. C. (2014) Influences of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the transport of hydrophobic organic contaminant in soil. *Advanced Materials Research*, 1010-1012:55–68.

- Calderon V. S., Galindo R. E., Benito N., Palacio C., Cavaleiro A., Carvalho S. (2013) Ag<sup>+</sup> release inhibition from ZrCN–Ag coatings by surface agglomeration mechanism: structural characterization. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 46(32):325-303.
- Chen Q., Jiang D., Shi W., Wu D., Xu Y. (2009) Visible-light-activated Ce–Si co-doped TiO<sub>2</sub> photocatalyst. *Applied Surface Science*, 255(18):7918–7924.
- Chen, Y., Xie, Y., Yang, J., Cao, H., & Zhang, Y. (2014) Reaction mechanism and metal ion transformation in photocatalytic ozonation of phenol and oxalic acid with Ag<sup>+</sup>/TiO<sub>2</sub>. *Journal of Environmental Sciences* 26(3):662–672.
- Chi Y., Hatakka A., Maijala P. (2007) Can co-culturing of two white-rot fungi increase lignin degradation and the production of lignin-degrading enzymes?. *International Biodeterioration & Biodegradation* 59(1):32–39.
- Choi H., Stathatos E., Dionysiou D. D. (2006) Sol–gel preparation of mesoporous photocatalytic TiO<sub>2</sub> films and TiO<sub>2</sub>/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> composite membranes for environmental applications. *Applied Catalysis B: Environmental* 63(1-2):60–67.
- Choi J. G., Park K. Y. (2006) Effect of reaction atmosphere on particle morphology of TiO<sub>2</sub> produced by thermal decomposition of titanium tetraisopropoxide. *Journal of Nanoparticle Research* 8(2):269–278.
- Chuang H.-Y., Chen D.-H. (2009) Fabrication and photocatalytic activities in visible and UV light regions of Ag@TiO<sub>2</sub> and NiAg@TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Nanotechnology* 20(10):105704 (10 pp).
- Clemente Z., Castra V. L., Jonsson C. M., Fraceto L. F. (2012) Ecotoxicology of Nano-TiO<sub>2</sub> – An evaluation of its toxicity to organisms of aquatic ecosystems. *Int. J. Environ. Res.* 6(1):33-50.



- CONAGUA. (2014) Inventario nacional de plantas municipales de potabilización y de tratamiento de aguas residuales en operación. Diciembre 2014. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 301 pp.
- Da Silva G. P., Mack M., Contiero, J. (2009) Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances* 27(1):30–39.
- De Bruyn W. J., Clark C. D., Ottelle K., Aiona P. (2012) Photochemical degradation of phenanthrene as a function of natural water variables modelling freshwater to marine environments. *Marine Pollution Bulletin* 64(3):532–538.
- De la Peña M. E., Ducci J., Zamora V. (2013) Tratamiento de aguas residuales en México. Banco Interamericano de desarrollo. 40 pp.
- De Lasa H., Serrano B., Salaices M. (2005) Photocatalytic reaction engineering. Springer.
- De Lima Ribeiro F.A., Ferreira M.M.C. (2005) QSAR model of the phototoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 719(1-3):191–200.
- Dekker N., Tommassen J., Lustig A., Rosenbusch J. P., Verheij H. M. (1997) Dimerization regulates the enzymatic activity of *Escherichia coli* outer membrane phospholipase A. *Journal of Biological Chemistry* 272(6):3179–3184.
- Domínguez A., Fernández A., González N., Iglesias E., Montenegro L. (1997) Determination of critical micelle concentration of some surfactants by three techniques. *Journal of Chemical Education* 74(10):1227-1231.
- Dong Y.-C., Wang W., Hu Z.-C., Fu M.-L., Chen Q.-H. (2011) The synergistic effect on production of lignin-modifying enzymes through submerged co-cultivation of

- Phlebia radiata*, *Dichomitus squalens* and *Ceriporiopsis subvermispora* using agricultural residues. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35(5):751–760.
- Dragan E. S. (2014) Design and applications of interpenetrating polymer network hydrogels. A review. *Chemical Engineering Journal* 243:572–590.
- Du H., Fairbridge C., Yang H., Ring Z. (2005) The chemistry of selective ring-opening catalysts. *Applied Catalysis A: General*, 294(1):1–21.
- Elisashvili V., Kachlishvili E. (2009) Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. *Journal of Biotechnology* 144(1):37–42.
- Englard S., Seifter S. (1990) Precipitation techniques. *Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology* 182:285–300.
- Epifani M., Giannini C., Tapfer L., Vasanelli L. (2004) Sol-Gel synthesis and characterization of Ag and Au nanoparticles in SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, and ZrO<sub>2</sub> Thin Films. *Journal of the American Ceramic Society*, 83(10):2385–2393.
- Eriksson K.-E. L., Bermek H. (2009) Lignin, lignocellulose, ligninase. *Encyclopedia of Microbiology* 373–384.
- Fatta-Kassinos D., Kalavrouziotis I. K., Koukoulakis P. H., Vasquez M. I. (2011) The risks associated with wastewater reuse and xenobiotics in the agroecological environment. *Science of The Total Environment* 409(19):3555–3563.
- Ferraria A. M., Carapeto A. P., Botelho do Rego A. M. (2012) X-ray photoelectron spectroscopy: Silver salts revisited. *Vacuum* 86(12): 1988–1991.
- Floger H.S. (1999) *Elements of chemical reaction engineering*. 3<sup>o</sup> Edition. Prentice Hall International Editions. 967 pp.

- Fujishima A., Zhang X., Tryk D. (2008) TiO<sub>2</sub> photocatalysis and related surface phenomena. *Surface Science Reports* 63(12):515–582.
- Fukui K. (1982) Role of frontier orbitals in chemical reactions. *Science*, 218(4574):747–754.
- Galhaup C., Wagner H., Hinterstoisser B., Haltrich D. (2002) Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(4):529–536.
- Gaya U. I. (2014) Heterogeneous photocatalysis using inorganic semiconductor solids. Intergovernmental Panel on Climate Change. Dordrecht: Springer Netherlands, 9789400777, 123 pp.
- Gollnick K., Stracke H.-U. (1973) Direct and sensitized photolysis of dimethyl sulfoxide in solution. *Pure and Applied Chemistry* 33(2-3).
- Gombotz W. R., Wee S. F. (2012). Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64:194–205.
- Haritash A. K., Kaushik C. P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1-3):1–15.
- Harris-Valle C., Esqueda M., Sánchez A., Beltrán-García M., Valenzuela-Soto E. M. (2007) Polar vineyard pruning extracts increase the activity of the main ligninolytic enzymes in *Lentinula edodes* cultures. *Canadian Journal of Microbiology* 53(10):1150–1157.
- Hassan M. E., Cong L., Liu G., Zhu D., Cai J. (2014) Synthesis and characterization of C-doped TiO<sub>2</sub> thin films for visible-light-induced photocatalytic degradation of methyl orange. *Applied Surface Science* 294:89–94.

- Henglein A., Mulvaney P., Linnert T. (1991). Chemistry of Ag<sub>n</sub> aggregates in aqueous solution: non-metallic oligomeric clusters and metallic particles. *Faraday Discussions* 92:31-44.
- Hurum D. C., Gray K. A., Rajh T., Thurnauer M. C. (2004). Photoinitiated reactions of 2,4,6 TCP on Degussa P25 formulation TiO<sub>2</sub>: wavelength-sensitive decomposition. *J. Phys. Chem. B*, 108(42):16483–16487.
- INEGI (2015) Censo General de Población y Vivienda 2010. INEGI.
- Isley S. L., Penn R. L. (2006) Relative brookite and anatase content in sol-gel-synthesized titanium dioxide nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* 110(31):15134–15139.
- Kachlishvili E., Metreveli E., Elisashvili V. (2014). Modulation of *Cerrena unicolor* laccase and manganese peroxidase production. *SpringerPlus* 3(1):463.
- Kawahara K., Suzuki K., Ohko Y., Tatsuma T. (2005). Electron transport in silver-semiconductor nanocomposite films exhibiting multicolor photochromism. *Physical Chemistry Chemical Physics* 7(22):3851-3855.
- Klassen N. V., Marchington D., McGowan H. C. E. (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Determination by the I<sup>3-</sup> method and by KMnO<sub>4</sub> titration. *Anal. Chem.* 66(18):2921–2925.
- Koroleva O. V., Gavrilova V. P., Stepanova E. V., Lebedeva V. I., Sverdlova N. I., Landesman E. O., Yavmetdinov I. S., Yaropolov A. I. (2002). Production of lignin modifying enzymes by co-cultivated White-rot fungi *Cerrena maxima* and *Coriolus hirsutus* and characterization of laccase from *Cerrena maxima*. *Enzyme and Microbial Technology* 30(4):573–580.

- Kuo C.-N., Chen H.-F., Lin J.-N., Wan B.-Z. (2007). Nano-gold supported on TiO<sub>2</sub> coated glass-fiber for removing toxic CO gas from air. *Catalysis Today*, 122(3-4):270–276.
- Lai Y., Chen Y., Zhuang H., Lin C. (2008) A facile method for synthesis of Ag/TiO<sub>2</sub> nanostructures. *Materials Letters*, 62(21-22):3688–3690.
- Landmann M., Rauls E., Schmidt W. G. (2012). The electronic structure and optical response of rutile, anatase and brookite TiO<sub>2</sub>. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 24(19), 195503 (6 pp).
- Lee Y., von Gunten U. (2012). Quantitative structure–activity relationships (QSARs) for the transformation of organic micropollutants during oxidative water treatment. *Water Research* 46(19):6177–6195.
- Li D., Chen Z., Chen Y., Li W., Huang H., He Y., Fu X. (2008). A new route for degradation of volatile organic compounds under visible light: using the bifunctional photocatalyst Pt/TiO<sub>2-x</sub>N<sub>x</sub> in H<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> atmosphere. *Environ. Sci. Technol.* 42(6):2130–2135.
- Li P., Wang H., Liu G., Li X., Yao J. (2011). The effect of carbon source succession on laccase activity in the co-culture process of *Ganoderma lucidum* and a yeast. *Enzyme and Microbial Technology* 48(1):1–6.
- Lin H. F., Valsaraj K. T. (2003) A titania thin film annular photocatalytic reactor for the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in dilute water streams. *Journal of Hazardous Materials* 99(2):203–219.
- Liu G., Wang L., Yang H. G., Cheng H.-M., (Max) Lu G. Q. (2010). Titania-based photocatalysts—crystal growth, doping and heterostructuring. *J. Mater. Chem.* 20(5):831–843.

- Liu Z., Fang P., Wang S., Gao Y., Chen F., Zheng F., Liu Y., Dai Y. (2012). Photocatalytic degradation of gaseous benzene with CdS-sensitized TiO<sub>2</sub> film coated on fiberglass cloth. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 363-364:159–165.
- López M. I. S., Guerra G., Hechevarria Y., Domínguez O., Manzano A. M., Torres G., Arguelles J., Leal M. R. (2010) Estabilidad y actividad del crudo enzimático del cultivo de *Trametes maxima*, decoloración in vitro de colorantes sintéticos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* 41:1-13.
- Macmanus L. F., Walzak M. J., Mcintyre N. S. (1999) Study of ultraviolet light and ozone surface modification of polypropylene. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 37:2489-2501.
- Mahshid S., Askari M., Ghamsari S. M., Afshar N., Lahuti S. (2009) Mixed-Phase TiO<sub>2</sub> nanoparticles preparation using sol-gel method. *Journal of Alloys and Compounds* 478:586-589.
- Maitra J., Shukla V. K. (2014) Cross-linking in hydrogels - A review. *American Journal of Polymer Science* 4(2):25–31.
- Manavalan T., Manavalan A., Heese K. (2015) Characterization of lignocellulolytic enzymes from white-rot fungi. *Current Microbiology* 70(4):485–498.
- Mandal S. S., Bhattacharyya A. J. (2012) Electrochemical sensing and photocatalysis using Ag–TiO<sub>2</sub> microwires. *Journal of Chemical Sciences* 124(5):969–978.
- Matijošyte I., Arends I. W. C. E., de Vries S., Sheldon R. A. (2010) Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 62(2):142–148.

- Medina-Valtierra J., Sánchez-Cárdenas M., Frausto-Reyes C., Calixto, S. (2006) Formation of smooth and rough TiO<sub>2</sub> thin films on fiberglass by sol-gel method. J. Mex. Chem. Soc. 50(1):8–13.
- Miller G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 31(3):426–428.
- Minussi R. C., De Moraes S. G., Pastore G. M. and Durán, N. (2001) Biodecolorization screening of synthetic dyes by four white-rot fungi in a solid medium: Possible role of siderophores. Letters in Applied Microbiology 33(1):21–25.
- Mirjam Blokker E. J., van de Ven B. M., de Jongh C. M., Nellie Slaats P. G. G. (2013) Health implications of PAH release from coated cast iron drinking water distribution systems in the Netherlands. Environmental Health Perspectives 121(5):600–606.
- Mistry, B. D. (2009) A Handbook of Spectroscopic Data: Chemistry. Oxford Book Company.
- Mita L., Sica V., Guida M., Nicolucci C., Grimaldi T., Caputo L., Bianco M., Rossi S., Bencivenga U., Eldin M. S. M., Tufano M. A., Mita D. G., Diano N. (2010) Employment of immobilised lipase from *Candida rugosa* for the bioremediation of waters polluted by dimethylphthalate, as a model of endocrine disruptors. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 62(2):133–141.
- Mogharabi M., Faramarzi M. A. (2014) Laccase and laccase-mediated systems in the synthesis of organic compounds. Advanced Synthesis & Catalysis 356(5):897–927.

- Mohammadi M. R., Fray D. J. (2011) Synthesis of nanostructured and nanoporous TiO<sub>2</sub>-AgO mixed oxide derived from a particulate sol-gel route: Physical and sensing characteristics. *Metallurgical and Materials Transactions A: Physical Metallurgy and Materials Science* 42(8):2481–2492.
- Mukheibir P. (2010) Water access, water scarcity, and climate change. *Environmental Management* 45(5):1027–1039.
- Mukherjee P. S., Ray A. K. (1999) Major challenges in the design of a large-scale photocatalytic reactor for water treatment. *Chemical Engineering & Technology* 22(3):253–260.
- Neville E. M., Mattle M. J., Loughrey D., Rajesh B., Rahman M., Macelroy J. M. D., Sullivan J. A., Thampi K. R. (2012) Carbon-Doped TiO<sub>2</sub> and carbon, tungsten-codoped TiO<sub>2</sub> through sol – gel processes in the presence of melamine borate: reflections through photocatalysis. *The Journal of Physical Chemistry C* 116:16511–16521.
- NIST (2012) X-ray Photoelectronic Spectroscopy Database Version 4.1. Gaithersburg: National Institute of Standards and Technology. Available at: <http://srdata.nist.gov/xps/>.
- Okuda K., Urabe I., Yamada Y., Okada H. (1991) Reaction of glutaraldehyde with amino and thiol compounds. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 71(2):100–105.
- Palmieri G., Giardina P., Desiderio B., Marzullo L., Giamberini M., Sannia G. (1994) A new enzyme immobilization procedure using copper alginate gel: Application to a fungal phenol oxidase. *Enzyme and Microbial Technology* 16(2):151–158.



- Pérez S., Guillamón M., Barceló D. (2001) Quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge from wastewater treatment plants. *Journal of Chromatography A* 938(1–2):57–65.
- Puigagut J., García J., Salvadó H. (2009) Microfauna Community as an Indicator of Effluent Quality and Operational Parameters in an Activated Sludge System for Treating Piggery Wastewater. *Water, Air, and Soil Pollution* 203:207-216.
- Răileanu M., Crișan M., Nițoi I., Ianculescu A., Oancea P., Crișan D., Todan L. (2013) TiO<sub>2</sub>-based nanomaterials with photocatalytic properties for the advanced degradation of xenobiotic compounds from water. A literature survey. *Water, Air, and Soil Pollution* 224(6):1548 (45 pp).
- Rajeeva S., Lele S. S. (2011) Three-phase partitioning for concentration and purification of laccase produced by submerged cultures of *Ganoderma sp.* WR-1. *Biochemical Engineering Journal* 54(2):103–110.
- Revankar M. S., Lele S. S. (2007) Synthetic dye decolorization by white rot fungus, *Ganoderma sp.* WR-1. *Bioresource Technology* 98(4):775–780.
- Rouquerol F., Rouquerol J., Sing K. S. W., Llewellyn P., Maurin G. (2014) Adsorption by powders and porous solids: Principles, Methodology and Applications. Elsevier Ltd.
- Sack U., Heinze T. M., Deck J., Cerniglia C. E., Martens R., Zadrazil F., Fritsche W. (1997) Comparison of phenanthrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 63(10):3919–3925.
- Santana-Aranda M. A., Morán-Pineda M., Hernández J., Castillo S. (2005) Physical properties of TiO<sub>2</sub> prepared by sol-gel under different pH conditions for

- photocatalysis. *Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnologia de Superficies y Materiales* 18(1):46–49.
- Schneider J., Matsuoka M., Takeuchi M., Zhang J., Horiuchi Y., Anpo M., Bahnemann, D. W. (2014) Understanding TiO<sub>2</sub> Photocatalysis: Mechanisms and Materials. *Chemical reviews* 114:9919–9986.
- Shin H. S., Choi H. C., Jung Y., Kim B. S., Song H. J., Shin, H. J. (2004) Chemical and size effects of nanocomposites of silver and polyvinyl pyrrolidone determined by X-ray photoemission spectroscopy. *Chemical Physics Letters* 383(3–4): 418–422.
- Simonsen M. E., Søgaaard E. G. (2010) Sol-gel reactions of titanium alkoxides and water: Influence of pH and alkoxy group on cluster formation and properties of the resulting products. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 53(3):485–497.
- Singh H. (2006) *Mycoremediation: Fungal bioremediation*. John Wiley and Sons.
- Singh P., Ojha A., Borthakur A., Singh R., Lahiry D., Tiwary D., Mishra P. K. (2016) Emerging trends in photodegradation of petrochemical wastes: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 1–25.
- Sirisaksoontorn W., Thachepan S., Songsasen A. (2009) Photodegradation of phenanthrene by N-doped TiO<sub>2</sub> photocatalyst. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 44(9):841–846.
- Sugimoto T., Zhou X., Muramatsu A. (2003) Synthesis of uniform anatase TiO<sub>2</sub> nanoparticles by gel-sol method: 4. Shape control. *Journal of Colloid and Interface Science* 259(1):53–61.

- Suryaman D., Hasegawa K. (2010) Biological and photocatalytic treatment integrated with separation and reuse of titanium dioxide on the removal of chlorophenols in tap water. *Journal of Hazardous Materials* 183(1–3):490–496.
- Torres L. G., Sánchez-De-La-Vega, A., Beltrán, N. A., Jiménez, B. E. (1998) Production and characterization of a Ca-alginate biocatalyst for removal of phenol and chlorophenols from wastewaters. *Process Biochemistry* 33(6):625–634.
- Torres R. A., Nieto J. I., Combet E., Pétrier, C. and Pulgarin, C. (2008) Influence of TiO<sub>2</sub> concentration on the synergistic effect between photocatalysis and high-frequency ultrasound for organic pollutant mineralization in water. *Applied Catalysis B: Environmental* 80(1–2):168–175.
- Torres-Palma R. A., Nieto J. I., Combet E., Pétrier C., Pulgarin C. (2010) An innovative ultrasound, Fe<sup>2+</sup> and TiO<sub>2</sub> photoassisted process for bisphenol a mineralization. *Water Research* 44(7):2245–2252.
- Torretta V. (2012) PAHs in wastewater: removal efficiency in a conventional wastewater treatment plant and comparison with model predictions. *Environmental Technology* 33:851–855.
- Tryba B., Piszcz M., Morawski A. W. (2010) Photocatalytic and self-cleaning properties of Ag-doped TiO<sub>2</sub>. *The Open Materials Science Journal* 4:5–8.
- Tsakalacos T., Ovid'ko I. A., Vasudevan A. K. (2003) *Nanostructures: Synthesis, Functional Properties and Applications*. Kluwer Academic Publishers.
- UNEP (2010) Environmental performance Index. Available at: [http://www.unwater.org/fileadmin/user\\_upload/unwater\\_new/docs/Publications/MEX\\_pagebypage.pdf](http://www.unwater.org/fileadmin/user_upload/unwater_new/docs/Publications/MEX_pagebypage.pdf).

- USNLM. 2013. ChemIDplus by Syracuse Research Corporation. Disponible en:  
<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus>.
- Vermonden T., Klumperman B. (2015) The past, present and future of hydrogels. *European Polymer Journal* 72:341–343.
- Wolfenden B. S., Willson R. L. (1982) Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one- electron transfer reactions: Pulse radiolysis studies of 2,2'-Azinobis- (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* 805–811.
- Wright J. D., Sommerdijk, N. A. J. (2001) *Sol-Gel materials chemistry and applications*. Gordon and Breach Science Publishers.
- Wu J. C. S., Chen C. H. (2004) A visible-light response vanadium-doped titania nanocatalyst by sol-gel method. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 163(3):509–515.
- Wu J.-Y., Yan Z.-G., Liu Z.-T., Liu J.-D., Liang F., Wang X.-N., Wang W.-L. (2014) Development of water quality criteria for phenanthrene and comparison of the sensitivity between native and non-native species. *Environmental pollution* 196:141–146.
- Xu J., Xiao X., Ren F., Wu W., Dai Z., Cai G., Zhang S., Zhou J., Mei F., Jiang C. (2012) Enhanced photocatalysis by coupling of anatase TiO<sub>2</sub> film to triangular Ag nanoparticle island. *Nanoscale Research Letters* 7:239 (6 pp).
- Yamanaka R., Soares C. F., Matheus D. R., Machado K. M. G. (2008) Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB176 under different culture conditions. *Brazilian Journal of Microbiology* 39(1):78–84.

- Yang H., Wang Y., Xue X. (2014) Influences of glycerol as an efficient doping agent on crystal structure and antibacterial activity of B-TiO<sub>2</sub> nano-materials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 122:701–708.
- Yaropolov A. I., Skorobogat'ko O. V., Vartanov S. S., Varfolomeyev S. D. (1994) Laccase: Properties, catalytic mechanism, and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 49(3):257–280.
- Yasmeen Q., Asgher M., Sheikh M. A., Nawaz H. (2013) Optimization of ligninolytic enzymes production through response surface methodology. *BioResources* 8(1):944–968.
- Yoshikawa N., Kimura T., Kawase Y. (2003) Oxidative degradation of nonionic surfactants with TiO<sub>2</sub> photocatalyst in a bubble column reactor. *Canadian Journal of Chemical Engineering* 81(3–4):719–724.
- Yu H., Lee S. C., Yu J., Ao C. H. (2006) Photocatalytic activity of dispersed TiO<sub>2</sub> particles deposited on glass fibers. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 246(1–2):206–211.
- Zahmatkesh M., Tabandeh F., Ebrahimi S. (2010) Biodegradation of reactive orange 16 by *Phanerochaete Chrysosporium* fungus: application in a fluidized bed bioreactor. *Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng.* 7(5):385–390.
- Zaleska A. (2008) Doped-TiO<sub>2</sub>: A review. *Recent Patents on Engineering* 2:157–164.
- Zeng X., Lin Z., Gui H., Shao W., Sheng G., Fu J., Yu Z. (2010) Occurrence and distribution of polycyclic aromatic carbons in sludges from wastewater treatment plants in Guangdong, China. *Environmental Monitoring and Assessment* 169(1–4):89–100.

- Zhang H., Hong Y. Z., Xiao Y. Z., Yuan J., Tu X. M., Zhang X. Q. (2006) Efficient production of laccases by *Trametes sp.* AH28-2 in cocultivation with a *Trichoderma strain*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73(1):89–94.
- Zhang W., Zou L., Wang L. (2009) Photocatalytic TiO<sub>2</sub>/adsorbent nanocomposites prepared via wet chemical impregnation for wastewater treatment: A review. *Applied Catalysis A: General* 371:1–9.
- Zhao B., Chen Y. W. (2011) Ag/TiO<sub>2</sub> sol prepared by a sol-gel method and its photocatalytic activity. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 72(11):1312–1318.
- Zhu X., Zhou D., Cang L., Wang Y. (2012) TiO<sub>2</sub> photocatalytic degradation of 4-chlorobiphenyl as affected by solvents and surfactants. *Journal of Soils and Sediments* 12(3):376–385.

## ANEXO A

### A.1 Estimación de azúcares reductores

#### Reactivo DNS

Disolver 10 g de reactivo DNS y 10 g de NaOH en 1416 mL de agua destilada. Después de la completa dilución agregar 2.0 g de fenol derretido (a 50 °C), y 0.5 g de metabisulfito de sodio, y mezcle bien. El reactivo DNS puede ser almacenado en la oscuridad a 4 °C por al menos un mes.

#### Procedimiento

Colocar 250 µL la muestra en el tubo de ensayo y agregar 750 µL de reactivo DNS, posteriormente pasar el tubo a agua hirviendo por 10 minutos. Enfriar a temperatura ambiente. Incluir un estándar con glucosa preparado y diluido como las muestras. Leer a 540 nm con un blanco de agua (Miller, 1959).

### A.2 Determinación de Proteínas

La determinación de proteínas por el método de Bradford; en donde 0.5 mL de muestra se agrega a 0.5 mL del reactivo de Bradford a temperatura ambiente. La concentración de proteínas es determinada por comparación con una curva de calibración estándar con HSA, mediante la medición de la absorbancia a 595 nm (Bradford, 1976).

### A.3 Determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Se empleó la técnica modificada de Kiassen *et al.* (1994) en donde se adicionaron 1.5 mL del reactivo A (66 g/L de yoduro de potasio, 2.0 g/L de hidróxido de sodio y 0.2 g/L de molibdato de amonio tetrahidratado) y 1.5 mL del reactivo B (20 g/L de biftalato de potasio) a 1.5 mL del sobrenadante. Se dejó reaccionar por 5 min y se leyó la absorbancia de la muestra a 351 nm.

#### **A.4 Determinación de Lcc**

La Lcc se determinó usando ABTS como sustrato, monitoreando los cambios de absorbancia a 420 nm ( $\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) por 3 min. La mezcla de reacción contenía 600  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y 300  $\mu\text{L}$  de buffer acetato de sodio 0.1 M pH 4.5. La reacción se inició agregando 100  $\mu\text{L}$  de ABTS 1.0 mM (Wolfenden y Wilson, 1982).

#### **A.5 Determinación de MnP**

La MnP se determinó a través del monitoreo de la oxidación de rojo de fenol a 610 nm ( $\epsilon = 4460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) por 5 min por la técnica modificada de Minussi *et al.* (2001). La mezcla de reacción contenía 700  $\mu\text{L}$  de sobrenadante, 50  $\mu\text{L}$  de rojo fenol (Sigma Aldrich) 0.2 %, 50  $\mu\text{L}$  de lactato de sodio 25 mM (pH 4.5), 50  $\mu\text{L}$  de 2 mM  $\text{MnSO}_4$ , 50  $\mu\text{L}$  de 0.1 % albumina bovina (Sigma Aldrich) y 50  $\mu\text{L}$  de succinato de sodio 2 mM pH 4.5. Para iniciar la reacción se agregó 50  $\mu\text{L}$  de 100 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , una vez transcurrido los 5 min se detuvo la reacción con 40  $\mu\text{L}$  de 2 N NaOH.



## ANEXO B

### B.1 Pruebas de diferencia mínima significativa en el cultivo mixto empleado glucosa como fuente de carbono

#### Azúcares reductores 240 h

##### Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	31.2554	2	15.6277	4284.88	0.0000
Intra grupos	0.0109415	3	0.00364717		
Total (Corr.)	31.2663	5			

#### Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
TP (1:2)	2	0.365513	X
T	2	0.384459	X
TP (1:1)	2	5.2166	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
T - TP(1:1)	*	4.83215	0.192194
T - TP(1:2)	*	4.85109	0.192194
TP(1:1) - TP(1:2)		0.0189458	0.192194

\* indica una diferencia significativa.

#### Proteínas 240 h

##### Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.00508102	2	0.00254051	1914.35	0.0000
Intra grupos	0.00000398127	3	0.00000132709		
Total (Corr.)	0.005085	5			

#### Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
T	2	0.0364473	X
TP(1:2)	2	0.0375763	X
TP(1:1)	2	0.0987355	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
T - TP(1:1)	*	-0.0622882	0.00366616
T - TP(1:2)		-0.00112903	0.00366616
TP(1:1) - TP(1:2)	*	0.0611591	0.00366616

\* indica una diferencia significativa.

Lcc

**Tabla ANOVA**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.51449E8	2	7.57243E7	10.19	0.0460
Intra grupos	2.23028E7	3	7.43426E6		
Total (Corr.)	1.73751E8	5			

**Pruebas de Múltiple Rangos**

Método: 95.0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
G_20_TP(1:1)	2	72056.3	X
G_20_T	2	79121.5	XX
G_20_TP(1:2)	2	84315.2	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
G_20_T - G_20_TP(1:1)		7065.2	8677.22
G_20_T - G_20_TP(1:2)		-5193.72	8677.22
G_20_TP(1:1) - G_20_TP(1:2)	*	-12258.9	8677.22

\* indica una diferencia significativa.

**B.2 Análisis de correlación Pearson de la producción de Lcc, MnP y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> usando glicerol como fuente de carbono**

Fuente de carbono	Inóculo	Lcc/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	MnP/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
15 g/L de glicerol	<i>T. maxima</i>	-0.02	0.73
	<i>T. maximalP. carneous</i> (1:1)	-0.18	0.56
	<i>T. maximalP. carneous</i> (1:2)	-0.01	0.38
20 g/L de glicerol	<i>T. maxima</i>	0.21	0.47
	<i>T. maximalP. carneous</i> (1:1)	0.25	0.32
	<i>T. maximalP. carneous</i> (1:2)	0.28	0.88

**B.3 ANOVA del diseño factorial 2<sup>2</sup> de la actividad enzimática del cultivo mixto empleando glicerol como fuente de carbono**

Lcc

**ANOVA**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	592302023	3	197434008	7.27021803	0.0426
Concentración de glicerol	18242386.6	1	18242386.6	0.67174915	0.4585
Proporción de inóculo	92241.0853	1	92241.0853	0.00339664	0.9563
Concentración de glicerol/ Proporción de inóculo	573967395	1	573967395	21.1355083	0.0101
Error	108626183	4	27156545.6		
Cor Total	700928205	7			

Desviación estándar	5211.19426	R <sup>2</sup>	0.84502524
Media	56296.3626	Ajuste R <sup>2</sup>	0.72879416
C.V.	9.25671574	Predicha R <sup>2</sup>	0.38010095
PRESS	434504730	Adeq Precisión	5.41694013

## MnP ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	113477700.4	3	37825900.12	16.18623139	0.0106
Concentración de glicerol	3548910.223	1	3548910.223	1.518628291	0.2853
Proporción de inóculo	59106330.98	1	59106330.98	25.2924252	0.0073
Concentración de glicerol/ Proporción de inóculo	50822459.16	1	50822459.16	21.74764066	0.0096
Error	9347673.148	4	2336918.287		
Cor Total	122825373.5	7			

Desviación estándar	1528.69823	R <sup>2</sup>	0.92389461
Media	23593.598	Ajuste R2	0.86681556
C.V.	6.47929254	Predicha R2	0.69557843
PRESS	37390692.6	Adeq Precisión	9.69259408

## B.4 Pruebas de diferencia mínima significativa en el tratamiento fotocatalítico

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3.62931E-9	4	9.07328E-10	2.22	0.1393
Intra grupos	4.08024E-9	10	4.08024E-10		
Total (Corr.)	7.70955E-9	14			

### Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
TiO <sub>2</sub> -C UVC_2 h	3	0.0000491826	X
UVC_2 h	3	0.0000550845	XX
TiO <sub>2</sub> -C-Ag UVC_2 h	3	0.0000630166	XX
UVA_2 h	3	0.0000850148	XX
TiO <sub>2</sub> -C-Ag UVA_2 h	3	0.0000873534	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
UVC_2 h - TiO <sub>2</sub> -C UVC_2 h		0.00000590193	0.0000367486
UVC_2 h - TiO <sub>2</sub> -C-Ag UVC_2 h		-0.0000079321	0.0000367486
UVC_2 h - UVA_2 h		-0.0000299302	0.0000367486
UVC_2 h - TiO <sub>2</sub> -C-Ag UVA_2 h		-0.0000322689	0.0000367486
TiO <sub>2</sub> -C UVC_2 h - TiO <sub>2</sub> -C-Ag UVC_2 h		-0.000013834	0.0000367486
TiO <sub>2</sub> -C UVC_2 h - UVA_2 h		-0.0000358322	0.0000367486
TiO <sub>2</sub> -C UVC_2 h - TiO <sub>2</sub> -C-Ag UVA_2 h	*	-0.0000381708	0.0000367486
TiO <sub>2</sub> -C-Ag UVC_2 h - UVA_2 h		-0.0000219981	0.0000367486
TiO <sub>2</sub> -C-Ag UVC_2 h - TiO <sub>2</sub> -C-Ag UVA_2 h		-0.0000243368	0.0000367486
UVA_2 h - TiO <sub>2</sub> -C-Ag UVA_2 h		-0.00000233867	0.0000367486

\* indica una diferencia significativa.

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2.49975E-10	2	1.24988E-10	8.19	0.0193
Intra grupos	9.16168E-11	6	1.52695E-11		
Total (Corr.)	3.41592E-10	8			

### Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
TiO <sub>2</sub> -C-Ag UVC_6 h	3	0.00000179911	X
TiO <sub>2</sub> -C UVC_6 h	3	0.00000446198	X
UVC_6 h	3	0.0000140699	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
UVC_6 h - TiO <sub>2</sub> -C UVC_6 h	*	0.00000960792	0.00000780703
UVC_6 h - TiO <sub>2</sub> -C-Ag UVC_6 h	*	0.0000122708	0.00000780703
TiO <sub>2</sub> -C UVC_6 h - TiO <sub>2</sub> -C-Ag UVC_6 h		0.00000266287	0.00000780703

\* indica una diferencia significativa.

#### Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	5.64182E-8	4	1.41045E-8	636.37	0.0000
Intra grupos	2.2164E-10	10	2.2164E-11		
Total (Corr.)	5.66398E-8	14			

#### Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
TiO <sub>2</sub> -C-Ag UVC_13 h	3	2.67442E-7	X
UVC_13 h	3	0.00000167278	X
TiO <sub>2</sub> -C UVC_13 h	3	0.0000018639	X
TiO <sub>2</sub> -C-Ag UVA_13 h	3	0.0000165279	X
UVA_13 h	3	0.000157685	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
UVC_13 h - TiO <sub>2</sub> -C UVC_13 h		-1.91116E-7	0.00000856489
UVC_13 h - TiO <sub>2</sub> -C-Ag UVC_13 h		0.00000140534	0.00000856489
UVC_13 h - UVA_13 h	*	-0.000156012	0.00000856489
UVC_13 h - TiO <sub>2</sub> -C-Ag UVA_13 h	*	-0.0000148552	0.00000856489
TiO <sub>2</sub> -C UVC_13 h - TiO <sub>2</sub> -C-Ag UVC_13 h		0.00000159645	0.00000856489
TiO <sub>2</sub> -C UVC_13 h - UVA_13 h	*	-0.000155821	0.00000856489
TiO <sub>2</sub> -C UVC_13 h - TiO <sub>2</sub> -C-Ag UVA_13 h	*	-0.000014664	0.00000856489
TiO <sub>2</sub> -C-Ag UVC_13 h - UVA_13 h	*	-0.000157418	0.00000856489
TiO <sub>2</sub> -C-Ag UVC_13 h - TiO <sub>2</sub> -C-Ag UVA_13 h	*	-0.0000162605	0.00000856489
UVA_13 h - TiO <sub>2</sub> -C-Ag UVA_13 h	*	0.000141157	0.00000856489

\* indica una diferencia significativa.

## ANEXO C

### C.1 Artículo aceptado

#### Removal of phenanthrene in aqueous solution containing photon competitors by TiO<sub>2</sub>-C-Ag film supported on fiberglass

DENISSE FABIOLA GONZÁLEZ-RAMÍREZ<sup>1</sup>, PEDRO ÁVILA-PÉREZ<sup>2</sup>, LUIS G. TORRES-BUSTILLOS<sup>3</sup>, RICARDO AGUILAR-LÓPEZ<sup>1</sup>, MARÍA C. MONTES-HORCASITAS<sup>1</sup>, FERNANDO J. ESPARZA-GARCÍA<sup>1</sup>, and REFUGIO RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Departamento Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, A.P. 14-740, Col. Zacatenco, Ciudad de México 07360, México.*

<sup>2</sup>*Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Dirección de Investigación Tecnológica, Carr. México-Toluca S/N, La Marquesa, Ocoyoacac, Estado de México 52750, México.*

<sup>3</sup>*Departamento de Bioprocesos, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional, Av. Acueducto S/N Col. Barrio La Laguna Ticomán, Ciudad de México 97340, México.*

#### ABSTRACT

Surface interactions with pollutants and photons are key factors that affect the applications of TiO<sub>2</sub> in environmental remediation. In this study, the solubilizing agents dimethylsulfoxide and polyoxyethylene sorbitan monooleate, which act as photon competitors, had no effect on the photocatalytic activity of TiO<sub>2</sub>-C-Ag film in phenanthrene (PHE) removal. Fiberglass with TiO<sub>2</sub>-C-Ag coating removed 91.1 ± 5.2% and 99.7 ± 0.4% of PHE in treatments using UVA (365–465 nm) and UVC (254 nm) irradiation, respectively. The use of fiberglass as a support increased the superficial area, thus allowing PHE sorption. C and Ag, which are electrically active impurities in TiO<sub>2</sub>, enhanced its photocatalytic activity and thus the attraction of the pollutant to its surface. The use of high-frequency UV light (UVC) decreased the amount of carbon species deposited on the TiO<sub>2</sub>-C-Ag film surface. X-ray photoelectron spectroscopy of the TiO<sub>2</sub>-C-Ag film revealed extensive oxidation of the carbon deposited on the film under UVC light and loss of electrons from Ag clusters by conversion of Ag<sup>0</sup> to Ag<sup>3+</sup>.

**Keywords:** Cosolvent, Doping, Heterogeneous catalysis, Hydrocarbons, Nanocomposite, Surfactant

---

\*Address correspondence to Refugio Rodríguez-Vázquez, Department of Biotechnology and Bioengineering, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Mexico City 07279, Mexico; Phone: 52 (55) 57473316; fax: 52 (55) 5747002; E-mail: [rodrig@cinvestav.mx](mailto:rodrig@cinvestav.mx)

## C.2 Artículo enviado

### Effects of Dimethyl Sulfoxide and Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate on the Phenanthrene Removal by a Crude Enzymatic Extract from a Mixed Culture entrapped in Alginate Hydrogels

D. F. González-Ramírez<sup>1</sup>, R. Rodríguez-Vázquez<sup>1</sup>, P. Ávila-Pérez<sup>2\*</sup>, L. G. Torres-Bustillos<sup>3</sup>, R. Aguilar-López<sup>1</sup>, M. C. Montes-Horcasitas<sup>1</sup>, F. J. Esparza-García<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Depto. Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, A.P. 14-740, Col. Zacatenco, C.P. 07360, Ciudad de México, México.

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Dirección de Investigación Tecnológica. Laboratorio Nacional de Investigaciones en Forense Nuclear. Carretera México-Toluca S/N, La Marquesa, Ocoyoacac, C.P. 52750, Estado de México, México.

<sup>3</sup> Depto. de Bioprocesos, UPIBI, Instituto Politécnico Nacional, Av. Acueducto S/N Col. Barrio La Laguna Ticomán, C. P. 97340, Ciudad de México, México.

#### ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a group of persistent organic pollutants naturally present in the environment. The anthropogenic contribution is related to incomplete combustion of fossil fuels and oil spills. PAHs are highly stable molecules and they are resistant to conventional wastewater treatments. The PAHs are reintegrated into the environment through the sludge. The biotechnological treatment presents the advantage that it does not require detrimental chemicals. However, the application is restricted by the special conditions to keep the microorganisms alive. The use of crude enzymes entrapped in alginate beads in a fixed-packed bed reached  $94.3 \pm 0.7\%$  of phenanthrene removal after 13 hours of continuous treatment under non-sterile conditions. The presence of dimethyl sulfoxide and polyoxyethylene sorbitan monooleate as well as glutaraldehyde crosslinker agent in the hydrogels did not affect the crude enzyme activities produced by the mixed culture of *Trametes maxima* and *Paecilomyces carneous*. There was an enhancement in laccase and manganese peroxidase production by the use of 20 g/L of glycerol as carbon source. The surface of the alginate beads presented oxidative activity in relation with those without enzymes, as observed in the increase in the C=O group and in the X-ray spectroscopy analyses of the C 1s and O 1s regions.

**Keywords:** Co-solvent, Crude enzymatic extract, Hydrocarbon, Hydrogel, Surfactant

---

\*Address correspondence to Pedro Ávila Pérez, Dirección de Investigación Tecnológica, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Laboratorio Nacional de Investigaciones en Forense Nuclear. Carretera México-Toluca S/N, La Marquesa, Ocoyoacac, C.P. 52750, Estado de México, México. Email: pedro.avila@inin.gob.mx