

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Efecto de la síntesis de nanopartículas de MnO<sub>2</sub> e inmovilización de lacasas sobre fibras de pseudotallo de plátano para la degradación del colorante carmín de índigo**

**Sara Lucía Mora Gordillo**

Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín  
Facultad de Minas, Departamento de Materiales y Minerales  
Área Curricular de Materiales y Nanotecnología  
Medellín, Colombia

2022

# **Efecto de la síntesis de nanopartículas de MnO<sub>2</sub> e inmovilización de lacasas sobre fibras de pseudotallo de plátano para la degradación del colorante carmín de índigo**

**Sara Lucia Mora Gordillo**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ingeniería – Materiales y Procesos**

Directora:

Ph.D., Edith Marleny Cadena Chamorro

Codirectores:

Ph.D. Robison Buitrago Sierra

Ph.D. Juan Manuel Vélez

Línea de Investigación:

Tecnología y Productos de Fibras Vegetales

Grupo de Investigación:

Biofibras y Derivados Vegetales

Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín

Facultad de Minas, Departamento de Materiales y Minerales.

Área curricular de Materiales y Nanotecnología

Medellín, Colombia

2022

*A mis padres Flor Lucía y Ovidio, porque hacen posibles muchos sueños.*

*A mis hermanos Manuel y Sofi por acompañarme todos los días, son mis mejores amigos y mi ejemplo a seguir.*

*A Jesús por su compañía constante, su amor incondicional y por ser mi compañero.*

*“Cada persona brilla con la luz propia entre todas las demás. No hay dos fuegos iguales. Hay gente de fuegos grandes y fuegos chicos y fuegos de todos los colores. Hay gente de fuego sereno, que ni se entera del viento, y gente de fuego loco, que llena el aire de chispas; algunos fuegos, fuegos bobos, no alumbran ni queman, pero otros arden la vida con tantas ganas que no se puede mirarlos sin parpadear, y quien se acerca se enciende”*

*El libro de los abrazos (Fragmento). Eduardo Galeano.*

## Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Sara Lucia Mora.

---

Nombre: Sara Lucia Mora

23/02/2022

## **Agradecimientos**

Este trabajo es un cúmulo de sueños y confianza que muchos depositaron en mí, principalmente mi directora Edith Marleny Cadena, quien orientó y alentó cada paso de este trayecto, le agradezco su dedicación y generosa amistad. A mi codirector Robison Buitrago, por brindarme las herramientas para mantener este proyecto en curso. A los profesores Juan Manuel Vélez y Juan Felipe Santa por su aporte invaluable en esta investigación.

Mis agradecimientos se extienden al Laboratorio de Procesos Agrícolas y todos lo que hacen parte de él, fundamentalmente a mis amigas Sara Duque, Yuliana Cruz, Yazmín Rendón, María Fernanda Pardo y Laura López, quienes me brindaron su cariño y amistad que trasciende ciudades.

A Oscar Rojas por involucrarse en este proyecto, los resultados obtenidos fueron muy valiosos para culminar el proyecto. Un agradecimiento especial a Yuliana Cadavid quien inspiró parte de esta investigación, conservo sus palabras y consejos.

Finalmente, a mis padres y mis hermanos, les agradezco su paciencia, sus palabras y su tiempo.

## Resumen

### **Efecto de la síntesis de nanopartículas de $MnO_2$ e inmovilización de lacasas sobre fibras de pseudotallo de plátano para la degradación del colorante Carmín de Índigo**

Los colorantes sintéticos se han convertido en una problemática ambiental con graves consecuencias en las fuentes hídricas, en la fauna de los ríos y en la salud pública, esto a raíz de la deficiente disposición de las soluciones coloreadas. Con el fin de brindar alternativas a los procesos de tratamiento, se usaron fibras vegetales extraídas del pseudotallo de plátano como soporte para la inmovilización por adsorción de lacasas y para la síntesis de nanopartículas de  $MnO_2$  con el fin de determinar la efectividad en la remoción de colorante índigo carmín. En la primera fase, se realizó un pretratamiento enzimático sobre la fibra y mediante el uso  $KMnO_4$  como precursor se obtuvo la síntesis de nanopartículas sobre las fibras de plátano que en contacto con el colorante logran una remoción del 98% en 5 minutos, después se evaluó la reutilización de la fibra funcionalizada. La siguiente fase fue la inmovilización de la enzima lacasa sobre fibras pretratadas mecánica y enzimáticamente, los resultados determinaron degradación del 98% índigo carmín con una dosis mínima de lacasa inmovilizada cuando el colorante estuvo en contacto con la fibra por 4h. Finalmente se realizó una revisión bibliográfica para orientar la determinación del mecanismo de acción teórico de la remoción mediada por lacasas y nanopartículas de  $MnO_2$ .

**Palabras clave:** Fibras naturales, inmovilización, lacasa, nanopartículas  $MnO_2$ , índigo carmín, degradación, mecanismo.

## **Abstract**

### **Effect of synthesis of MnO<sub>2</sub> nanoparticles and laccase immobilization onto plantain pseudostem fibers for the degradation of Indigo Carmine dye**

Synthetic dyes have become an environmental problem with serious consequences for water sources, river wildlife and public health, that due to poor availability of colored solutions. In order to offer another possibility to the treatment processes, vegetable fibers extracted from the plantain pseudostem were used as carrier for the immobilization by adsorption of laccases and for the synthesis of MnO<sub>2</sub> nanoparticles in order to recognize the usefulness removal indigo carmine dye. In the first phase, an enzymatic pretreatment was carried out on the fiber, KMnO<sub>4</sub> was used as precursor and the synthesis of nanoparticles was carried out onto plantain fibers, they achieve 98% dye removal in 5 minutes, after functionalized fiber was evaluated for reuse. The next phase was laccase enzyme immobilization. Fibers were pretreated mechanically and enzymatically, results determined 98% indigo carmine degradation with minimum doses of immobilized laccase when the dye was in contact with the fiber for 4h. Finally, a review was performed to guide the theoretical removal mechanism mediated by laccases and MnO<sub>2</sub> nanoparticles.

**Keywords: Natural fibers, immobilization, laccase, MnO<sub>2</sub> nanoparticles, indigo carmine, degradation, mechanism.**

# Contenido

|  | Pág.      |
|--|-----------|
| Resumen .....  | IX        |
| Lista de figuras .....   | XII       |
| Lista de tablas .....  | XIII      |
| Lista de abreviaturas .....  | XIV       |
| Introducción .....   | 15        |
| Objetivos.....   | 18        |
| <br>   |           |
| <b>1. Síntesis de nanopartículas de MnO<sub>2</sub> sobre fibras de plátano para la degradación del colorante carmín de índigo .....</b> | <b>19</b> |
| 1.1 Introducción.....  | 19        |
| 1.2 Materiales y métodos .....   | 23        |
| 1.2.1 Extracción de fibra de plátano .....   | 23        |
| 1.2.2 Pretratamiento enzimático y síntesis de MnO <sub>2</sub> .....   | 23        |
| 1.2.3 Remoción de color con nanopartículas .....   | 24        |
| 1.2.4 Diseño experimental .....  | 24        |
| 1.2.5 Caracterización morfológica y estructural .....  | 25        |
| 1.2.6 Caracterización del colorante residual .....   | 26        |
| 1.3 Resultados y discusión .....   | 27        |
| 1.3.1 Síntesis de MnO <sub>2</sub> y pretratamiento enzimático .....   | 27        |
| 1.3.2 Remoción de color: análisis de varianza y optimización de la Variable respuesta.....   | 30        |
| 1.3.3 Ciclos de degradación .....  | 32        |
| 1.4 Conclusiones.....  | 33        |
| <br>   |           |
| <b>2. Inmovilización de lacasa sobre fibra de plátano para degradación de índigo carmín.....</b>   | <b>43</b> |
| 2.1 Introducción.....  | 43        |
| 2.2 Materiales y métodos.....  | 47        |
| 2.2.1 Remoción de color usando lacasa .....  | 47        |
| 2.2.2 Modificación de fibras de plátano por vía enzimática y mecánica por molinillo .....  | 36        |
| 2.2.3 Medición de la actividad enzimática de la lacasa .....   | 49        |



|   |           |
|---|-----------|
| 2.2.4 Inmovilización de lacasa sobre fibras de plátano.....                                 | 50        |
| 2.2.5 Degradación de colorante con lacasa inmovilizada .....                                | 51        |
| 2.3 Resultados y discusión .....  | 52        |
| 2.3.1 Degradación del colorante índigo carmín con la aplicación de lacasa<br>Libre .....    | 52        |
| 2.3.2 Estabilidad de lacasa libre .....   | 54        |
| 2.3.3 Efecto del pretratamiento enzimático y mecánico sobre la fibra de<br>plátano .....    | 56        |
| 2.3.4 Rendimiento de la inmovilización .....  | 59        |
| 2.3.5 Degradación de colorante a partir de lacasa inmovilizada en fibra<br>de plátano ..... | 61        |
| 2.4 Conclusiones.....   | 65        |
| <br>  |           |
| <b>3. Mecanismo teórico de remoción del colorante Índigo Carmín .....</b>                   | <b>71</b> |
| 3.1 Introducción.....   | 71        |
| 3.2 Clasificación de colorantes .....   | 71        |
| 3.3 Características del Índigo Carmín .....   | 74        |
| 3.3.1 Usos y aplicaciones .....   | 76        |
| 3.4 Mecanismos de remoción del Índigo Carmín .....  | 76        |
| 3.5 Reacción de Índigo Carmín con enzima lacasa .....                                       | 85        |
| 3.6 Reacción de Índigo Carmín con nanopartículas de óxido de manganeso ...                  | 89        |
| 3.7 Comparación de dos metodologías de remoción del índigo carmín.....                      | 91        |
| <br>  |           |
| <b>4. Conclusiones y recomendaciones.....</b>   | <b>94</b> |
| 4.1 Conclusiones.....   | 94        |
| 4.2 Recomendaciones .....   | 95        |

## Lista de figuras

|  | Pág. |
|--|------|
| <b>Figura 1-1:</b> Imágenes de microscopía SEM .....   | 28   |
| <b>Figura 1-2:</b> Efecto de la dosis de Viscozyme L® (F1) y el volumen de la solución KMnO <sub>2</sub> .....   | 31   |
| <b>Figura 1-3:</b> Evolución del colorante durante el proceso de remoción .....  | 33   |
| <b>Figura 1-4:</b> Evolución de las fibras durante el proceso de remoción. ....  | 34   |
| <b>Figura 1-5:</b> Demanda química de oxígeno (DQO) y Cambio de color total (ΔE) .....   | 36   |
| <b>Figura 1-6:</b> Curva DSC de fibras con MnO <sub>2</sub> (FMN) and Fibras después de 5 ciclos .....   | 36   |
| <b>Figura 2-1:</b> Mecanismo de reacción de lacasa.....  | 44   |
| <b>Figura 2-2:</b> Métodos de inmovilización. ....   | 46   |
| <b>Figura 2-3:</b> Efectividad de la lacasa en la degradación de carmín de índigo.....   | 53   |
| <b>Figura 2-4:</b> Efecto del tiempo, temperatura y pH en la actividad relativa (%AR) de lacasa libre .....  | 54   |
| <b>Figura 2-5:</b> Imágenes de microscopía SEM. ....   | 57   |
| <b>Figura 2-6:</b> Comportamiento electrocinético de Fibra inicial (FI) y Fibra tratada enzimáticamente (FV).....  | 58   |
| <b>Figura 2-7:</b> Influencia del tratamiento de la fibra y la dosis de lacasa en el rendimiento de inmovilización (%IY).....                              | 60   |
| <b>Figura 2-8:</b> Degradación de colorante índigo carmín con lacasa inmovilizada sobre FI <sub>LAC</sub> FV <sub>LAC</sub> y FM <sub>LAC</sub> , FI. .... | 62   |
| <b>Figura 3-1:</b> Estructura química del Índigo Carmín .....  | 75   |
| <b>Figura 3-2:</b> Síntesis de índigo Carmín.....  | 75   |
| <b>Figura 3-3:</b> Clasificación de métodos de remoción de índigo carmín .....   | 77   |
| <b>Figura 3-4:</b> Degradación del Índigo Carmín a través de phormidium.....   | 81   |
| <b>Figura 3-5:</b> Mecanismo de degradación de índigo carmín por reducción por Bacillus sp. MZS10.....   | 81   |
| <b>Figura 3-6:</b> Mecanismo de degradación de índigo carmín catalizado por lacasa purificada del hongo Trametes hirsuta .....                             | 83   |
| <b>Figura 3-7:</b> Rompimiento de la molécula de Índigo Carmín tratada con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /yoduro .....     | 84   |
| <b>Figura 3-8:</b> Mecanismo de reducción-oxidación del teñido del Índigo .....  | 85   |
| <b>Figura 3-9:</b> Ciclo catalítico de la lacasa.....  | 87   |
| <b>Figura 3-10:</b> Posible ruta de degradación oxidativa para el tinte Índigo Carmín catalizada por la lacasa.....  | 88   |
| <b>Figura 3-11:</b> Posible ruta de degradación de Índigo Carmín usando MnO <sub>2</sub> .....   | 90   |

## Lista de tablas

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| <b>Tabla 1 1:</b> Diseño central compuesto de dos factores.....   | 35          |
| <b>Tabla 3-1.</b> Clasificación de algunos colorantes según el cromóforo.....   | 73          |
| <b>Tabla 3-2:</b> Métodos realizados para remoción de Índigo Carmín.....  | 79          |
| <b>Tabla 3-3:</b> Características generales de la remoción de IC con nanopartículas de MnO <sub>2</sub> sobre fibras de plátano y con lacasa inmovilizada sobre fibra de plátano..... | 91          |

---

## Lista de abreviaturas

| Abreviatura       | Término   |
|-------------------|---|
| Abs               | Absorbancia   |
| AE                | Actividad enzimática                                      |
| AR                | Actividad relativa  |
| ANOVA             | Análisis de varianza                                      |
| CCD               | Diseño central compuesto                                  |
| DSC               | Calorimetría diferencial de barrido                       |
| DQO               | Demanda química de oxígeno                                |
| EDS               | Espectrometría de energía dispersa                        |
| FE-SEM            | Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo    |
| FI                | Fibra inicial   |
| FV                | Fibra modificada enzimáticamente                          |
| FMN               | Fibras modificadas con nanopartículas de MnO <sub>2</sub> |
| FM                | Fibras modificadas mecánicamente por molinillo            |
| IC                | Índigo carmín   |
| IY                | Rendimiento de inmovilización                             |
| kHz               | kilo Hertz  |
| KMnO <sub>4</sub> | Permanganato de potasio                                   |
| MnO <sub>2</sub>  | Dióxido de manganeso                                      |
| rpm               | Revoluciones por minuto                                   |
| BET               | Brunauer-Emmett-Teller                                    |

## Introducción

La descontaminación y conservación de los efluentes hídricos ha sido uno de los focos principales de las industrias textiles, fundamentalmente por los altos volúmenes de descarga y por la composición del agua residual que incluye: colorantes sintéticos, bases, ácidos, detergentes, sales, oxidantes, surfactantes, grasas, inhibidores entre otros (Gogate & Pandit, 2004). El principal problema de los colorantes es que durante el proceso de tinción, no existe una fijación del 100%, se estima que aproximadamente entre el 10 y 50% de los colorantes se pierde y termina en efluentes (Chequer et al., 2013). La particularidad del colorante índigo carmín es el uso intensificado de los últimos años: solamente en la industria alimenticia se consumen entre 40.000 y 50.000 toneladas, de las cuales el índigo carmín representa cerca del 3.7% de la producción total anual de colorantes alimenticios (MarketWatch, 2020), añadiendo a estas cifras la aplicaciones del sector textil y de salud que incrementan notablemente.

Para contrarrestar este efecto, los métodos de remoción de colorantes se han diversificado, y clasificado fundamentalmente en: químicos, físicos y biológicos; el objetivo principal de estos es la obtención de moléculas simples que mitiguen la contaminación a través de diversas técnicas, algunas usando oxidantes como catalizadores para la degradación (Chacon et al., 2013) y en otros casos se ha implementado el uso de enzimas y microorganismos como herramienta para la remoción de color (Garzón, 2009). Sin embargo, existen limitaciones que dificultan la transición a nivel industrial como la recuperación del catalizador, los costos y tiempos de reacción.

Otra perspectiva no alejada de la problemática ambiental, es la disposición de los residuos agrícolas. La práctica agronómica de la cosecha deja altos volúmenes de residuos que ocasionan un problema en la disposición final, la mayoría de estos terminan incinerados, vertidos en fuentes hídricas o en procesos de compostaje. Un ejemplo de esta situación, se refleja en el cultivo del plátano, del cual sólo el 33% de la planta representa el fruto y el resto se convierte en residuo postcosecha luego de cumplir el ciclo de vida de la planta

(Izquierdo, 2009). El detalle está en el aprovechamiento potencial de la biomasa residual proveniente de estas actividades agrícolas, y de esta forma aportar al desarrollo de los procesos agroindustriales en un marco ambiental en el que se usen los subproductos para generar materiales de alto valor agregado. Esta es una contribución al desarrollo de procesos agrícolas ecológicamente sostenibles, ya que se promueve el aprovechamiento integral de los residuos de las cadenas productivas.

En este sentido, se ha explorado el potencial lignocelulósico del pseudotallo como fuente fibrosa no maderable para la elaboración de productos de alta resistencia (Sosa et al. 2011). La caracterización fisicoquímica de las fibras vegetales de plátano demuestra un alto contenido de celulosa, como fuente de azúcares para la fermentación y producción de combustibles de segunda generación (Mazzeo et al. 2010). Las fibras vegetales conservan propiedades como biocompatibilidad, resistencia al ataque microbiano, resistencia a la compresión, estabilidad mecánica, baja toxicidad, biodegradabilidad, fácil acceso y bajo costo, que las hacen candidatas para el reforzamiento de polímeros y el uso como matrices de soporte (Gañán et al., 2008).

En concordancia con lo anterior, la investigación presentada a continuación profundiza en la remoción del colorante índigo carmín haciendo uso de procesos enzimáticos y oxidativos, con el aprovechamiento de fibras naturales derivadas del pseudotallo de plátano. Todo esto en aras de establecer nuevas alternativas de remoción de colorantes, que además del beneficio competitivo, se conviertan en métodos eficientes y ambientalmente sostenibles. Para la Ingeniería de materiales y procesos se constituye en un reto el hallazgo de opciones de tratamiento que optimicen no solo la degradación de los compuestos residuales sino el uso de la materia prima biodisponible, disminuyendo su potencial contaminación.

Acorte a lo anterior, el proyecto titulado: Efecto de la síntesis de nanopartículas de  $MnO_2$  e inmovilización de lacasas sobre fibras de pseudotallo de plátano para la degradación del colorante carmín de índigo, trazó una ruta de acción enfocada en la revisión teórica y experimental de los mecanismos de remoción del colorante mencionado:

El Capítulo 1 expone una descripción de la utilidad del aprovechamiento de los residuos postcosecha de plátano para la extracción de fibras vegetales, entendiendo que el

departamento de Antioquia es uno de los mayores productores del fruto en el país. A continuación, se expuso el proceso del pretratamiento enzimático con un complejo hidrolítico realizado sobre la fibra, que luego servirá como soporte para nanopartículas de  $MnO_2$  que actúan como un agente oxidante que permite la remoción del colorante índigo carmín. La metodología incluyó un análisis de superficie de respuesta para identificar las mejores dosis de enzima y del precursor de las nanopartículas para obtener un porcentaje eficiente de remoción.

Posteriormente, en el Capítulo 2 se detalla nuevamente la experimentación para la degradación del colorante índigo carmín, usando las fibras de pseudotallo de plátano como soporte de inmovilización de la enzima lacasa, de la familia de las oxidorreductasas, como agente de remoción del índigo carmín. Para este caso, las fibras se sometieron a dos pretratamientos, uno de carácter físico y otro enzimático.

Para finalizar, como respuesta al tercer objetivo específico, se realizó una revisión de literatura que permitiera el entendimiento de las bases teóricas de los diversos mecanismos de remoción que se han estudiado para el colorante índigo carmín, esto con el fin de obtener una orientación en la determinación de lo que podría ser el mecanismo de acción teórico por el cual la enzima lacasa y las nanopartículas de  $MnO_2$  estudiadas consiguen degradar y, en consecuencia, remover el colorante de las fibras vegetales. En este punto se debe hacer la aclaración preliminar en cuanto a los conceptos degradación y remoción del Índigo Carmín, ya que se usan en los capítulos indistintamente debido a que solo durante el proceso de experimentación y luego de la revisión de la literatura se logró determinar que el proceso de remoción de colorante se produce por una degradación de la molécula.

Por último, las consideraciones finales dan a conocer un análisis comparativo con relación a la efectividad de los dos métodos de remoción utilizados, abriendo la puerta a nuevas preguntas referentes a rentabilidad y sostenibilidad ambiental sobre el uso de los procesos.

## Objetivo general

Estudiar la remoción del colorante carmín de índigo a través métodos de oxidación con nanopartículas de  $\text{MnO}_2$  y enzimas oxidorreductasas acopladas en fibras naturales extraídas del pseudotallo de plátano.

## Objetivos específicos

1. Optimizar la síntesis de nanopartículas de  $\text{MnO}_2$  sobre fibras de plátano modificadas con enzimas hidrolíticas con respecto a su efectividad en la degradación del colorante carmín de índigo.
2. Evaluar las condiciones de operación para la inmovilización de la enzima lacasa sobre fibras de plátano en términos de eficiencia catalítica y efectividad en la degradación del colorante.
3. Determinar el mecanismo teórico de degradación del colorante usando fibras de plátano con nanopartículas de  $\text{MnO}_2$  y lacasas inmovilizadas



# **1. Síntesis de nanopartículas de MnO<sub>2</sub> sobre fibras de plátano para la degradación del colorante carmín de índigo.**

## **1.1 Introducción**

El plátano se cultiva en más de 100 países que alcanzan una producción aproximada de 39 millones de toneladas métricas (FAOSTAT, 2018). Un gran aporte a estas cifras procede de países africanos. Por otro lado, en América Latina, Colombia aporta 4.3 millones de toneladas (Agronet, 2018), ubicando al plátano entre los primeros cultivos más cosechados en el territorio. La producción sobresaliente se debe a las condiciones favorables del suelo que permiten el ascenso continuo de la producción anual, con efecto positivo en el incremento del empleo local en las regiones de Arauca, Meta y Antioquia las cuales abarcan los porcentajes mayoritarios en producción.

Acorde a lo anterior, la recolección de plátanos sanos para abastecer la demanda nacional y mundial, acarrea el manejo de la disposición de residuos agrícolas en la postcosecha, ya que tan sólo el 33% de la planta corresponde al fruto y el resto que incluye: pseudotallo, flores, hojas y raquis, constituyen desechos que el hombre no aprovecha (Izquierdo, 2009). No obstante, y de forma general, una gran cantidad de biomasa proveniente de estos residuos, se acumula en sitios destinados para la quema o compostaje, pero la degradación natural de desechos conlleva a la liberación de gases tóxicos como CH<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>S (Bhushan et al., 2019). En este contexto, y respondiendo a políticas medioambientales de reducción de residuos, se han diversificado alternativas responsables como la elaboración de harina de raquis, uso de la inflorescencia para consumo humano, extracción de almidón a partir del pseudotallo, empleo de hojas para elaboración de materiales compuestos (Mazzeo et al., 2010) y extracción de fibras naturales a partir del pseudotallo de plátano, entre otras (Gañán et al., 2008).

Las fibras naturales de origen vegetal han tenido un impacto significativo en la disminución de la problemática ambiental, ya que dan un valor agregado al material agrícola de desecho partiendo fundamentalmente de la exploración de los componentes lignocelulósicos que demuestran su viabilidad como fuente fibrosa no maderable, para la elaboración de productos de alta resistencia (Sosa et al., 2011). El aprovechamiento del material vegetal depende en esencia de la estructura química que determina las características de funcionalidad y eficiencia en los procesos.

La estructura elemental de la fibra se basa en arreglos de microfibrillas en forma de tubos alineados que conforman la pared celular vegetal, la cual está constituida por cadenas de celulosa, lignina y hemicelulosa (Jörg, 2010). La celulosa (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub> es el compuesto de mayor porcentaje y presenta múltiples interacciones de puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, que generan fibrillas elementales que a su vez se asocian íntimamente para formar microfibrillas y matrices rígidas e insolubles, destacándose las zonas cristalinas y amorfas. El gran valor de la celulosa de fuentes vegetales se relaciona con la biofuncionalidad y biodegradabilidad de los materiales o productos fabricados con ella (Zhang & Lynd, 2004).

Por otra parte, la hemicelulosa recubre la estructura externa de la celulosa con un grupo heterogéneo de polisacáridos que varía según la fuente vegetal, entre ellos: xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, glucosa y ácido glucurónico. La naturaleza ramificada de la hemicelulosa determina su carácter amorfo y la facilidad con que transcurren las reacciones de hidrólisis de los polímeros para dar lugar a los azúcares constituyentes. Por último, la lignina, segundo polímero más abundante, que a diferencia de los anteriores está conformado por unidades con diversas estructuras aromáticas, es un agente cementante en la pared celular y actúa enmascarando la celulosa con el complejo lignina/hemicelulosa a través de enlaces covalentes dentro de las paredes celulares de las plantas y es responsable de la resistencia, rigidez y protección contra patógenos (Jörg, 2010).

La morfología, composición y estructura química de las fibras naturales determinan las propiedades y características del material que se pueden aprovechar en diversas áreas. La industria automotriz ha fijado su interés en las fibras como refuerzo de matrices poliméricas debido a su bajo costo, baja densidad y biodegradabilidad en la era de la sostenibilidad y el reciclaje (Shahzad, 2012), no obstante, las fibras vegetales son

---

propensas a absorber humedad y esto puede generar una decaída de las propiedades mecánicas y pérdida de estabilidad lo cual reduce el potencial de adhesión a la matriz polimérica (Ferreira et al., 2018). En la industria textil, por ejemplo, se ha estudiado la capacidad antimicrobiana en fibras de algodón, que se caracterizan por su alto contenido de celulosa, sin embargo, la naturaleza cristalina de este polímero hace que la mayor parte de la molécula sea impenetrable por reactivos químicos. Por lo tanto, antes de realizar la funcionalización del material para cualquier tipo de reacción, fue fundamental interrumpir las regiones cristalinas con pre tratamientos que provocaron la modificación de la superficie y de la conformación molecular nativa de la fibra para optimizar sus propiedades en el proceso (Prysiashnyi et al., 2013).

Entre los pretratamientos usados para la modificación de las fibras, se conocen los tratamientos físicos, químicos y biológicos. Dentro del primer grupo se destaca el tratamiento con plasma, que usa una descarga eléctrica por medio de un gas parcialmente ionizado que induce una modificación física en la superficie a través del endurecimiento de la fibra por el efecto de la erosión superficial (Bhushan et al., 2019), sin embargo, una de las limitaciones en el procedimiento es que el inyector de plasma solo puede aplicarse del lado del material tratado que se encuentra directamente frente al inyector, lo cual impide que las propiedades del material se extiendan de manera homogénea a lo largo de toda el área de la fibra; esta categoría también incluye la molienda o triturado de la materia prima vegetal en partículas más pequeñas, en ocasiones este procedimiento puede acarrear altos costos energéticos. De forma alterna, también se aplican métodos químicos como tratamientos alcalinos, por medio de silanos, peróxido, acetilación entre otros; los agentes que se usan provocan reacciones con los constituyentes del material vegetal y originan enlaces covalentes entre la fibra y los grupos funcionales (Kalia et al., 2013; Panyasart et al., 2014). El resultado de estas investigaciones demostró un aumento en el área superficial y disociación parcial o total del complejo celulosa-lignina, estas modificaciones se encuentran fuertemente relacionadas con las concentraciones y condiciones de operación del proceso (Cadavid et al., 2016)

Por su parte, los pretratamientos biológicos captan el interés de muchas investigaciones debido al reducido daño ambiental de las enzimas incorporadas al proceso de hidrólisis de los polímeros que componen la pared celular. Dentro del grupo de enzimas que hidrolizan

la celulosa están: endoglucanasas, que actúan sobre enlaces glicosídicos de las regiones amorfas liberando residuos de varias longitudes y por ende nuevos extremos de la cadena de celulosa, secuencialmente las celobiohidrolasas o exoglucanasas se unen a estos extremos reductores y no reductores produciendo disacáridos de celobiosa y finalmente estos residuos pueden ser hidrolizados por las  $\beta$ -glucosidasas hasta glucosa. Este mecanismo de acción ha sido aprovechado por la industria textil para la limpieza de fibras de lino en el proceso de enriado, donde se revela la modificación de la fibra y su área superficial (González et al., 2015).

Simultáneamente, la acción en sinergia de las celulasas con otras enzimas puede producir mejores resultados deseados en la fibra. Estudios realizados sobre fibras de lino y cáñamo tratados con diferentes sistemas enzimáticos (xilanasa, xilanasa + celulasa, poligalacturonasa, lacasa, pectinmetilesterasa) reportaron una remoción de la hemicelulosa y pectina dando paso al aumento de la exposición individual del haz y mejorando las propiedades superficiales y térmicas de las fibras (George et al., 2014).

El material vegetal se ha abordado en diversas aplicaciones donde la porosidad y reactividad en la superficie de las fibras pueden ser aprovechadas para promover reacciones químicas y ayudar a la creación de biocompuestos con interés ambiental, este tipo de soporte hace viable una distribución homogénea de nanopartículas y otras moléculas a lo largo de la superficie respaldado también por las condiciones de operación y los pretratamientos del proceso, además las fibras vegetales promueven la posibilidad de reuso o de biodegradabilidad del material.

En sentido coherente con el cuidado ambiental, las fibras naturales están vinculadas a alternativas amigables que le hacen frente a problemáticas relacionadas con el tratamiento de aguas residuales, por ejemplo en la remoción de colorantes usualmente utilizados en procesos de la industria textil. Para esta tarea, se ha investigado la elaboración de filtros o membranas con fibras naturales funcionalizadas con actividad oxidativa o fotocatalítica que ejercen dos funciones: fibras que retienen impurezas por medio de una barrera física y a través de un proceso químico o biológico (Kim et al., 2007; Riahi et al., 2009). También la acción exitosa de biocompuestos ha comprobado efectos positivos en la degradación de colorantes, se han usado oxidantes fuertes como TiO<sub>2</sub> y MnO<sub>2</sub> sobre fibras naturales (Chacón-Patiño et al., 2013; Djuris, 2013), una de las ventajas de usar estos adsorbentes

además de las propiedades como oxidantes fuertes que pueden formar diversas morfologías del tamaño de nanopartículas, nanohojas, nanotubos, nanoflores (Syed M. et al., 2020)

En consecuencia, en este trabajo, las nanopartículas de MnO<sub>2</sub> fueron sintetizadas in-situ sobre las fibras de plátano pretratadas con una mezcla de enzimas hidrolíticas, estas fibras se usaron para evaluar la degradación del colorante índigo carmín y su reuso para ciclos de degradación.

## 1.2 Materiales y métodos

### 1.2.1 Extracción de fibra de plátano

Los pseudotallos de plátano (*Musa x Paradisiaca*) provenientes del municipio de Barbosa – Antioquia, se pasaron por una máquina desfibradora con motor diesel dispuesta con dos cilindros que despojaron el material vegetal de las vainas foliares del pseudotallo, se obtuvieron fibras de 70 cm de longitud aproximadamente, las cuales fueron sumergidas en agua durante 24 horas para remover el bagazo residual por fermentación espontánea; luego fueron lavadas y sometidas a secado solar. Finalmente, las fibras pasan al proceso de escarmenado que consiste en desenredar y despegar las hebras para obtener fibras individuales, denominadas fibra inicial (FI).

### 1.2.2 Pretratamiento enzimático y síntesis de MnO<sub>2</sub>

El tratamiento enzimático se realizó utilizando Viscozyme L® (complejo de enzimas hidrolíticas) y 30 mL de buffer de acetato a pH 5 con 1 g de la fibra inicial de 5 cm de longitud a 50°C durante 4 h, las condiciones de este ensayo hacen parte de estudios preliminares. Para la síntesis de nanopartículas, 58.5 mg de KMnO<sub>4</sub> (Merck) se usó como precursor de las nanopartículas y se varió el volumen del solvente.

Las fibras enzimáticamente modificadas (FV) se lavaron con agua destilada y exprimieron manualmente hasta retirar la mayor cantidad de agua, luego fueron sumergidas en la solución KMnO<sub>4</sub> durante 45 minutos en un baño ultrasónico (42 kHz, 100 W) (Chacon et al., 2013). Finalmente, las fibras modificadas con nanopartículas de MnO<sub>2</sub> (FMN) se

lavaron exhaustivamente con agua destilada para eliminar el exceso de KMnO<sub>4</sub> y se secaron a 60°C durante 24 h.

### 1.2.3 Remoción de color con nanopartículas

1 g de FMN fueron sumergidos en 50 mL de índigo carmín (IC), solución de 40 ppm y pH 2.5 ajustado con ácido acético, bajo agitación constante (300 rpm). La absorbancia a 610 nm fue monitoreada usando un espectrofotómetro UV-vis (Thermo Fisher, GENESYS 10S, USA) cada minuto por 5 minutos. El porcentaje de remoción de índigo carmín fue calculado por la ecuación 1-1.

$$\%R = \left( \frac{(Abs_{t0} - Abs_{tf})}{Abs_{t0}} \right) \times 100 \quad 1-1$$

Donde %R corresponde al porcentaje de remoción,  $Abs_{t0}$  y  $Abs_{tf}$  se refieren a la absorbancia inicial y final, respectivamente.

Para evaluar el reuso de la fibra (FMN), se realizaron ciclos de reuso; cada uno consistió en agregar la fibra con nanopartículas a una solución de colorante (40 ppm) y tras pasar 5 minutos se midió la absorbancia, luego la misma muestra de fibra se lava con abundante agua destilada, se escurre y pasa al siguiente ciclo con una nueva solución de colorante a la misma concentración, el número de ciclos estará dado por el porcentaje de remoción, en este caso, que sea superior al 50%

### 1.2.4 Diseño experimental

Por medio del software Design Expert 8.0 5, realizó un Diseño Compuesto Central (CCD) seleccionado a razón de la eficiencia con respecto al número de corridas requeridas para ajustar un modelo de superficie de respuesta de segundo orden (Subramonian et al., 2015). Se emplearon doce corridas experimentales incluidas cuatro réplicas en el punto central y 4 puntos estrella, estos últimos,we con el fin de estimar la curvatura de la superficie respuesta. Los factores del modelo evaluados corresponden a la dosis de Viscozyme L® (F1) en un rango de 80 – 200 µL y la concentración de KMnO<sub>4</sub> que varió en función del volumen del solvente (F2) entre 40 – 100 mL de agua destilada. La configuración de los experimentos se muestra en la Tabla 1-1. Los resultados obtenidos se ajustaron al modelo para establecer la combinación de parámetros y optimización de la variable respuesta %R,

que corresponde al porcentaje de remoción de color. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA con un nivel de confianza del 95% de acuerdo con el valor-p.

**Tabla 1-1:** Diseño central compuesto de dos factores.

| Corrida | Tipo      | Dosis de enzima | Volumen de solución |
|---------|-----------|-----------------|---------------------|
|         |           | F1 (µL)         | F2 (mL)             |
| 1       | Axial     | 140             | 28                  |
| 2       | Axial     | 140             | 112                 |
| 3       | Factorial | 200             | 100                 |
| 4       | Factorial | 200             | 40                  |
| 5       | Factorial | 80              | 40                  |
| 6       | Axial     | 55              | 70                  |
| 7       | Axial     | 225             | 70                  |
| 8       | Factorial | 80              | 100                 |
| 9       | Centro    | 140             | 70                  |
| 10      | Centro    | 140             | 70                  |
| 11      | Centro    | 140             | 70                  |
| 12      | Centro    | 140             | 70                  |

### 1.2.5 Caracterización morfológica y estructural

Las fibras se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM) y espectrometría de energía dispersiva (EDS) en un microscopio electrónico JEOL JSM-7100F equipado con un detector de silicio (X-MAXn, OXFORD), antes y después de la síntesis de nanopartículas de MnO<sub>2</sub>. En principio, las muestras fueron recubiertas con oro por pulverización catódica al vacío y seguidamente las fibras se examinaron entre ciclos para verificar los cambios en la superficie. A partir de las imágenes obtenidas, se calculó el diámetro promedio y el área que comprenden en la fibra utilizando el software Image J 1.49v.

El área superficial se estudió usando el método Brunauer-Emmett-Teller, mediante adsorción de gas nitrógeno en las fibras usando un analizador Micrometrics ASAP 2020 (Hwang & Barron R, 2011).

El análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) se llevó a cabo en un SDT-Q600 de TA Instruments y las muestras se calentaron de 30 a 800°C bajo flujo de N<sub>2</sub> con una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

Con el fin de conocer el Manganeso adherido en las fibras después del proceso de síntesis, se realizó la cuantificación de las cenizas de acuerdo con el método estándar TAPPI T 211 om-02 modificado, se compararon los valores de FMN y fibra inicial (4 g cada una) con un contenido de humedad previamente determinado, los crisoles pasaron a un horno de mufla a 650 °C durante 3 h. Con el mismo fin, se realizaron pruebas de absorción atómica con un espectrofotómetro AVANTA® de GBC, para verificar la cantidad de Mn elemental en contraste con las cenizas, según el estándar NTC 5151.

### 1.2.6 Caracterización del colorante residual

Después de cada ciclo, el color de la solución se midió usando un espectrofotómetro de esfera X-rite SP60 con coordenadas CIELa\*b\*, D65/10° (condiciones de iluminante/observador) y una constante de opacidad SPEX (Specular Excluded). El equipo se usó para determinar las coordenadas a\* (cambio de verde a rojo), b\* (cambio de azul a amarillo) y L que corresponde a la claridad de la solución de tinte. Además, el cambio total de color se calculó por la ecuación (1-2) (Zafra & Celemin, 2012).

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2} \quad (1-2)$$

Donde  $\Delta E$ , significa cambio de color total,  $\Delta L$  ( $L_0-L_5$ ) se refiere a la desviación de la claridad,  $\Delta a$  ( $a_0 - a_5$ ) y  $\Delta b$  ( $b_0-b_5$ ) corresponden a la desviación de cromaticidad, cuyos subíndices 0 y 5 marcan el tiempo inicial y final de la solución de tinte en contacto con las fibras (FMN).

Las mediciones de la demanda química de oxígeno (DQO) se realizaron utilizando viales reactivos (HI 93754C-25 Hanna Instruments) de acuerdo con el método estándar ISO 15705: 2002. Se requirió una digestión para oxidar la materia orgánica en la muestra y el



---

reactivo de cromo hexavalente se redujo a cromo trivalente. La intensidad del color se determinó mediante un fotómetro compatible (HI83224) con una lámpara especial de tungsteno y la concentración final se expresó en ppm.

## 1.3 Resultados y discusión

### 1.3.1 Síntesis de MnO<sub>2</sub> y pretratamiento enzimático

A partir del pseudotallo se obtienen fibras con un rendimiento del 10% en la extracción (Cadavid et al., 2016), posteriormente las fibras pasan por el escarmenado donde se remueve el bagazo excedente presente en la fibra cruda y se reduce la longitud de la fibra con fin de facilitar el manejo del material. Las imágenes de microscopía electrónica de la fibra inicial (FI) y la fibra modificada enzimáticamente y con las nanopartículas, se observan en Figura 1-1, donde se detalla en FI (Figura 1-1a), el conjunto de filamentos huecos que corresponden a células alargadas del esclerénquima del pseudotallo alineadas longitudinalmente, la rigidez de la pared celular varía respecto al contenido de componentes lignocelulósicos presentes y al tiempo de madurez de la planta (Sfiligoj et al., 2012). El siguiente paso fue aplicar el tratamiento enzimático a FI (Figura 1-1b), donde se observa el desprendimiento de láminas superficiales del material vegetal, que corresponden a las regiones vulnerables al efecto hidrolítico. El mecanismo de la modificación de la superficie está relacionado con la escisión de los enlaces  $\beta$ -1-4 por las xilanasas y celulasas, que eliminan parcialmente la capa de xilano dispuesta en la pared secundaria abriendo espacios interfibrilares (Gangwar et al., 2014) que permiten localizar otros componentes presentes en la fibra susceptibles al mecanismo de acción de celulasas, arabinasas, B-glucanasas y carbohidrasas, presentes en el complejo enzimático Viscozyme.

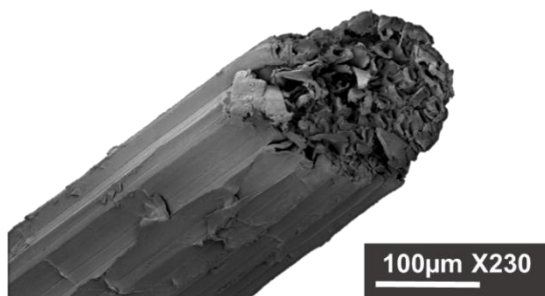
Debido a este aumento de área superficial generado por la acción enzimática, la síntesis in-situ de las nanopartículas de MnO<sub>2</sub> se realizó con éxito como se observa en la Figura 1-1c, donde existe distribución homogénea de las nanopartículas sin que se detecten aglomeraciones de estas en la superficie. Chacon et al., (2013), reportaron que la síntesis de MnO<sub>2</sub> sobre la fibra es promovida por la presencia de grupos hidroxilo presentes en la fibra, en este caso, la presencia del grupo funcional fue suscitada con tratamientos

alcalinos que generan una despolimerización parcial de la celulosa, deslignificación y remoción de hemicelulosa.

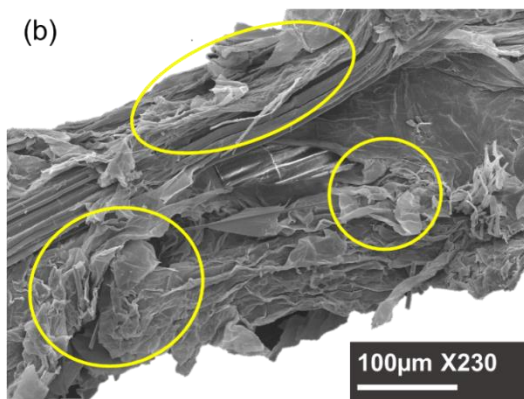
La unión del óxido con la fibra, se ha explicado a través de un tratamiento alcalino sobre fibras de algodón, donde luego de aplicar  $\text{NaOH}$  se obtiene un celulosa activada con sodio, la investigación encontró que los enlaces  $\beta(1-4)$  glucosídicos presentes en el monómero de la celulosa facilitan que las fibras de algodón construyan una matriz flexible en forma de red con abundantes superficies hidrofílicas que convenientemente reaccionan con el  $\text{MnO}_2$  (Jiao et al., 2017).

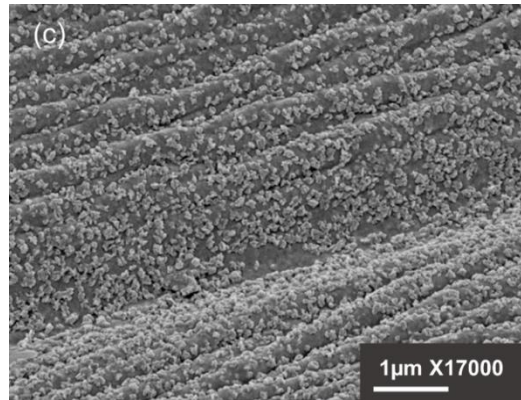
**Figura 1-1:** Imágenes de microscopía SEM. A). Fibra inicial (FI). B). Tratamiento enzimático (FV) C) Nanopartículas de  $\text{MnO}_2$  sobre fibras pretratadas (FMN)

(a)



(b)





Por otro lado, también se ha reportado la capacidad de adsorción de MnO<sub>2</sub> por parte de la lignina a través del mecanismo que describe una reacción entre el permanganato y el polímero aromático con doble enlace en el anillo aromático seguido de la ruptura de este (Zhai et al., 2020). Por consiguiente, y debido a que el tratamiento enzimático se efectúa principalmente la celulosa y la hemicelulosa presente en la fibra de plátano por la naturaleza de las enzimas que componen Viscozyme (carbohidrasas, arabinasas, celulasas, β-glucanasas, hemicelulasas y xilanasas), los residuos de lignina pueden reaccionar como se describe anteriormente.

La obtención de las nanopartículas de MnO<sub>2</sub> ha sido investigada por otros autores quienes demostraron que existe una liberación de radicales durante el proceso de sonicación, donde se evidencia un aumento de temperatura y presión debido a la generación de burbujas; estos radicales libres se involucran en la reducción de los iones metálicos de KMnO<sub>4</sub> a nanopartículas metálicas de óxido (Blanco et al., 2016), una vez terminó el proceso de sonicación las fibras adoptaron un color marrón, que es consecuente con la coloración que pertenece al MnO<sub>4</sub>.

Por otro lado, se encontró que el diámetro medio de las partículas fue de  $69 \pm 0.11$  nm, y el área comprendida por las nanopartículas ocupó aproximadamente  $53 \pm 2.8\%$  de la superficie de las fibras. Los resultados de las cenizas en la Fibra inicial FI fueron  $2.49 \pm 0.45\%$  y de FMN  $5.23 \pm 0.13\%$ , la diferencia de estos dos corresponde al contenido de Mn que no se calcinó en el proceso, este fue  $2.74 \pm 0.16\%$ .

El análisis de Brunauer-Emmett-Teller (BET) se realizó sobre FV y FMN. El área de superficie fue 3.52 m<sup>2</sup>/g y después de la síntesis se incrementó a 6.11 m<sup>2</sup>/g, efecto asociado a la presencia de nanopartículas sobre la superficie. La modificación del área superficial ha sido estudiada anteriormente por Sahu et al., (2017) usando fibras de jute con nanopartículas Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> donde el área de la superficie incrementó considerablemente después de la funcionalización (95.43 m<sup>2</sup>/g), la fibra inicial presentó un área superficial más pequeña (1.6 m<sup>2</sup>/g) que el biocompuesto modificado con nanopartículas. El mismo comportamiento se reportó en la investigación de Cordeiro et al., (2011), quienes estudiaron el efecto del tratamiento alcalino sobre fibras de sisal y reportaron el incremento del área superficial desde 1.633 m<sup>2</sup>/g hasta 2.392 m<sup>2</sup>/g después del tratamiento, en este caso, el aumento corresponde a la alta concentración de sitios activos dispuestos en la fibra de sisal modificada.

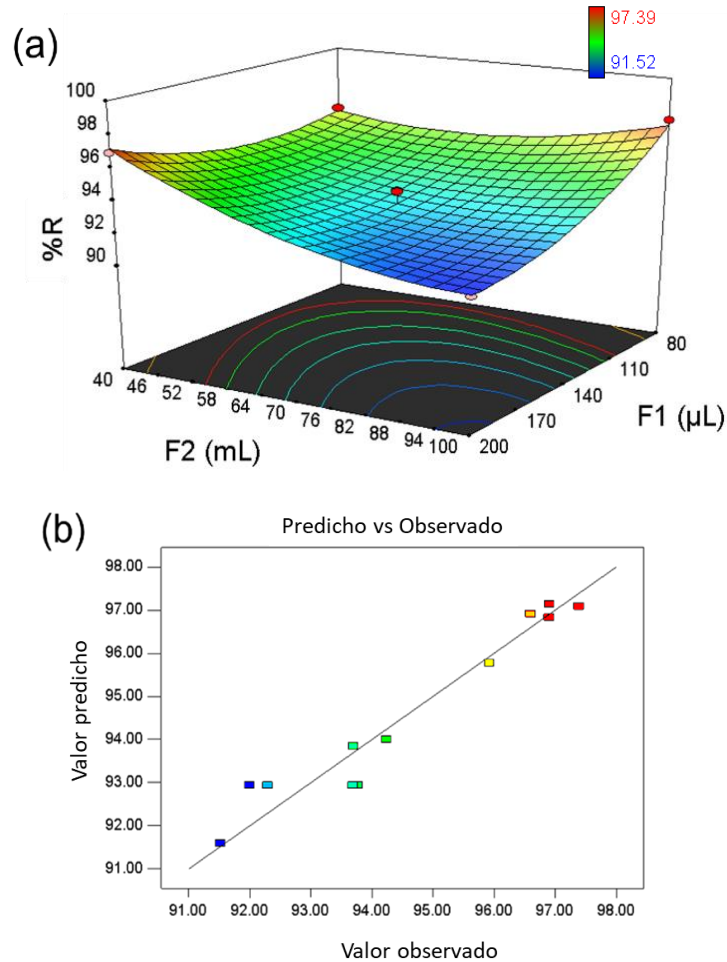
### 1.3.2 Remoción de color: análisis de varianza y optimización de la variable respuesta

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) del diseño experimental usado para el estudio de efecto de las dosis de Viscozyme L (F1) y el volumen de solución de KMnO<sub>4</sub> (F2) sobre la remoción de color, demostraron una diferencia significativa usando un valor  $p < 0.05$ , de acuerdo con este, con un ajuste del modelo del 93.30%. Además, se determinó que F1 y F2 fueron factores significativos. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) mostró que el modelo puede explicar el 94% de variabilidad del porcentaje de remoción. Por otra parte, el polinomio cuadrado de la ecuación (1-3) puede ser usado para predecir la remoción.

$$R(\%) = 101.84497 - 0.048350 * F1 - 0.088282 * F2 - 9.51834E - 4 * F1 * F2 + 3.49458E - 4 * F1^2 + 1.33118E - 3 * F2^2 \quad (1-3)$$

El efecto de los parámetros F1 y F2 sobre la remoción de color (%R) fue representado en la superficie de respuesta Figura 1-2(a), donde el valor de remoción más alto corresponde a 80  $\mu$ L de F1 y 100 mL de F2. Los valores de remoción de colorante predichos en el Modelo de Superficie de Respuesta, frente a los valores observados se presentan en la Figura 1-2(b). En este caso, la falta de ajuste no fue significativa y los valores cercanos a la diagonal dan una variabilidad al modelo para usarse en una predicción teórica de remoción de color.

**Figura 1-2.** Efecto de la dosis de Viscozyme L® (F1) y el volumen de la solución  $KMnO_4$  (F2) sobre el porcentaje de remoción (%R). (a) Gráfico de superficie de respuesta 3D. (b) Probabilidad normal de la remoción



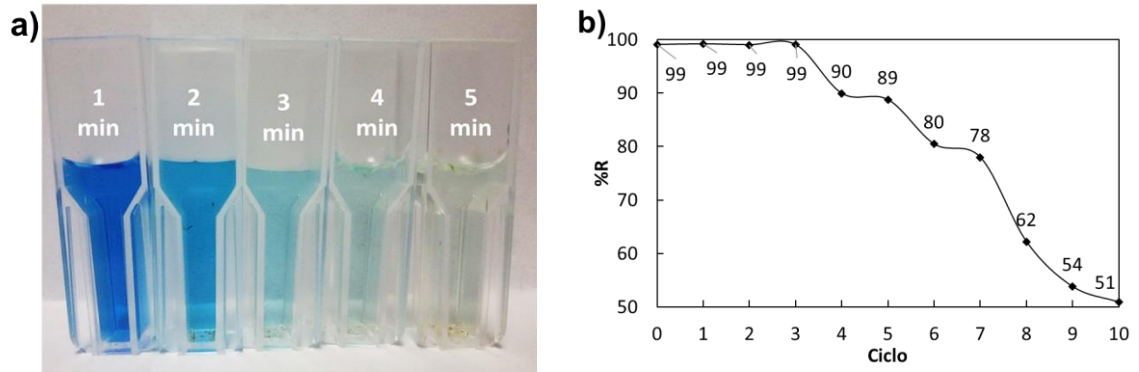
Basado en el modelo diseñado y con el objetivo de minimizar los residuos de agentes químicos provenientes del proceso, la optimización se llevó a cabo usando dos variables independientes para maximizar la variable respuesta (%R). De acuerdo con esto, las condiciones óptimas para el máximo valor de remoción bajo las constantes descritas son 80  $\mu$ l para la dosis enzimática y 100 mL de  $KMnO_4$ . Bajo estas condiciones, el modelo predijo 97.4% como máximo teórico de remoción de color. El resultado óptimo fue validado experimentalmente y se encontró una remoción del 99.8%.

### 1.3.3 Ciclos de degradación

La remoción exitosa de color en corto tiempo, abrió una puerta para el estudio del reuso de la fibra, de esta forma, el material FMN se reutilizó en ciclos consecutivos de remoción para estudiar su eficiencia. La Figura 1-3 presenta la evolución de la solución de IC después de 5 minutos de contacto con las fibras modificadas (FMN) durante el primer ciclo y el resultado de la remoción de color de 10 ciclos. La Figura 1-3a) expone un evidente cambio de color a medida que transcurren los minutos, en el minuto 5 del proceso de remoción ya no se percibe el color característico del índigo carmín y el porcentaje corresponde al 100% de la remoción. Por su parte, la eficiencia de FMN frente al número de ciclos (Figura 1-3b), las fibras demostraron una eliminación completa del tinte hasta el cuarto ciclo, luego de este, la eficiencia se reduce a medida que aumenta el número de ciclos y después de 10 ciclos la eficiencia de eliminación es del 51%. El reuso de fibras naturales fue estudiado con un nanocompuesto elaborado con jacinto de agua impregnado con nanopartículas de MnO<sub>2</sub> donde se evaluaron los reciclos usando una concentración de IC de 20 ppm, cada ciclo fue de 5 minutos, y luego del séptimo ciclo de degradación ya existía un 30% de degradación (Blanco et al., 2016), en el caso de las FMN, en el ciclo número 7, las fibras removieron el 78% del color y realizando una proyección el 30% se alcanzará después de reusar las fibras 12 veces.

Este colorante demuestra una degradación del color cuando se expone a luz UV, en este caso, y debido a que las mediciones no se realizaron en la oscuridad, podría ocurrir este efecto, sin embargo, la solución coloreada se expone muy corto tiempo a la luz mientras ocurre el proceso de remoción. Así mismo, existen evidencias de adsorción física del colorante sobre el material fibroso, lo cual se comprobó con las fibras sin tratar (FI), siguiendo la misma metodología del proceso de remoción y luego del tiempo de contacto adquieren coloración azul, sin embargo, el porcentaje que se reporta de la remoción no es significativo y el proceso se realiza en corto tiempo que suceda una adsorción física favorable.

**Figura 1-3:** Evolución del colorante durante el proceso de remoción a). Aspecto de la solución de IC durante el primer ciclo de degradación b). Porcentaje de remoción de color en cada ciclo

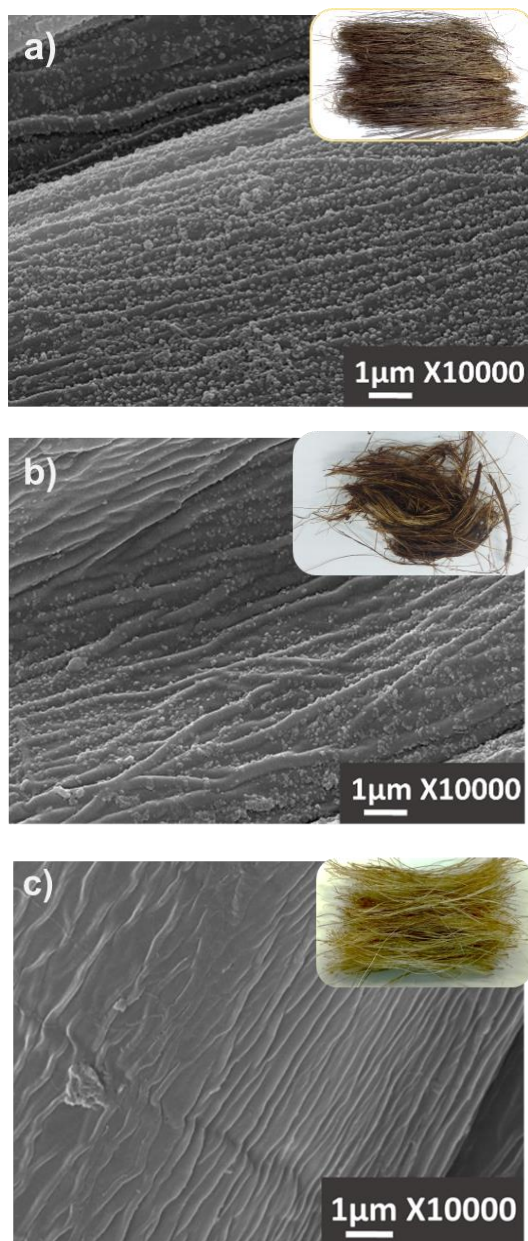


El método de síntesis in situ de nanopartículas MnO<sub>2</sub> se ha realizado con fibras naturales pre tratadas con NaOH y HCl, obteniendo una degradación del colorante índigo carmín en 15 minutos (Cadavid et al., 2016). El tratamiento enzimático puede tener un efecto beneficioso al reducir este tiempo a solo 5 minutos. La causa está relacionada con la morfología fibrilar de la pared celular que tiene un sistema de poros con vacíos e intersticios, los tratamientos de mercerización concluyen en una disminución de diámetro de los poros y una mejora de la superficie de los microporos, mientras que los tratamientos enzimáticos agrandan los poros existentes, lo cual permitiría una mejor disposición de las nanopartículas dentro y alrededor de los intersticios.

Con respecto al reuso de las fibras FMN para la eliminación del colorante, la Figura 1-4 muestra el progreso de las nanopartículas sobre la superficie de las fibras a medida que transcurre el proceso. La eliminación gradual del óxido de la superficie responde a la acción sobre el colorante y al efecto de cizalla que se produce durante la agitación mecánica en cada uno de los ciclos, este fenómeno puede provocar un desprendimiento o lixiviación de las nanopartículas durante los ciclos de degradación. La fibra FMN (Figura 1-4 a) posee coloración marrón que se extiende de manera homogénea sobre toda la superficie y de forma análoga, las nanopartículas ocupan el área superficial sin aglomeraciones. El análisis por EDS cuantificó Mn (%p/p) con un valor igual a 6.83%±1.33, transcurrido el primer ciclo (Figura 1-4b) el valor del manganeso fue de 6.18% ± 2.05, previamente se demostró el potencial de la fibra con estas características efectuando el 90% de remoción

de color. Posteriormente el reporte en la cuantificación decae hasta  $1.86\% \pm 0.53$  en el quinto ciclo, a pesar de disminuir seis veces la cantidad del Oxido presente en FMN, las fibras cumplen su función significativamente hasta el ciclo 10 Figura 1-4c, cuando ya no se observan nanopartículas y las fibras pierden completamente el color marrón característico del  $\text{MnO}_2$ , sin embargo, la funcionalidad del material continua.

**Figura 1-4:** Evolución de las fibras durante el proceso de remoción. (a) FMN. (b) Después de 1 cycle. (c) Después de 10 ciclos.

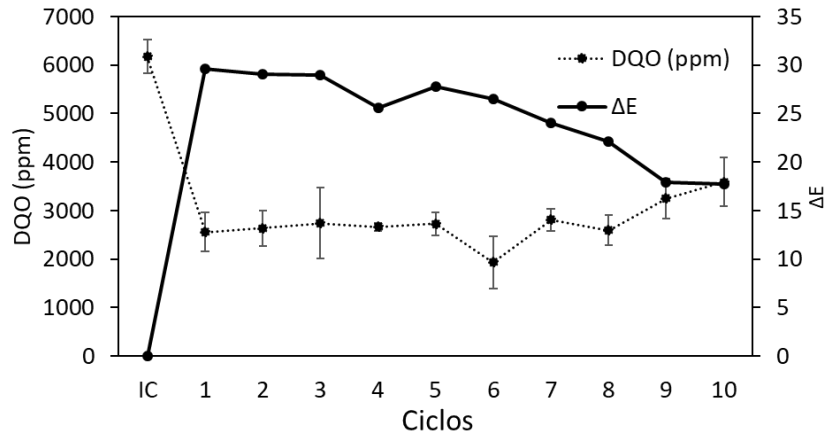




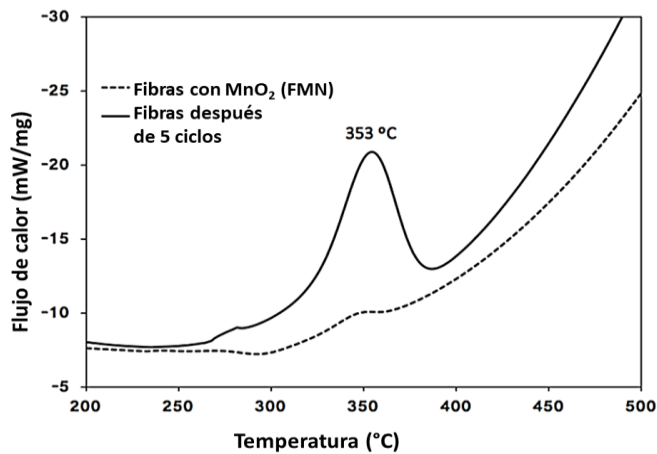
---

Con el fin de analizar la calidad del agua obtenida después de la remoción, se realizaron análisis de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y el cambio de color total ( $\Delta T$ ), los resultados se presentan en la Figura 1-5. Para realizar una comparación frente a la carga del Índigo Carmín, la figura Figura 1-5, relaciona los ciclos y la concentración inicial de contaminantes de la solución de Índigo carmín (IC). Cuando las fibras modificadas con nanopartículas de MnO<sub>2</sub> entran en contacto con el colorante por primera vez, es decir en el primer ciclo, se obtiene una reducción de DQO superior al 20%, los ciclos posteriores no reportaron cambios significativos en la concentración de DQO hasta el quinto ciclo y después del sexto un ligero descenso. Este efecto podría responder a un desprendimiento de fibrillas en la solución que se quedan en suspensión y afectan la medición; por otra parte, el carácter ácido de la solución también aumenta los registros de la carga química. El estudio de DQO en efluentes textiles se ha reportado previamente con nanofiltración para reducir el color, obteniendo una reducción de DQO de aproximadamente 85% después de 40 h (Zheng et al., 2013), similarmente, luz solar y nanopartículas de TiO<sub>2</sub> se usaron para degradar varios colorantes, donde se reportó una reducción del 70% de DQO después de 3 horas (Selvaraj et al., 2013). Los biocompuestos basados en fibras vegetales con nanopartículas de MnO<sub>2</sub> permitieron una mejor reducción de la DQO (alrededor del 20%) después de 5 minutos.

La medición del Cambio de color total ( $\Delta E$ ) de la Figura 1-5, se realizó con el fin de conocer el verdadero color de la solución indiferente al visualizado. La referencia es el color inicial del Índigo carmín (40 ppm), los resultados demostraron que existe una diferencia de al menos el 50% en los 10 ciclos frente al IC, sin embargo, este resultado incluye particularmente, desde el ciclo 1 hasta el 5 una diferencia superior al 70% debido a que las fibras aun soportan las nanopartículas sobre la superficie que cumplen la función de eliminar el color de manera eficiente reportando el 89% de remoción de coloración en la solución.

**Figura 1-5:** Demanda química de oxígeno (DQO) y Cambio de color total ( $\Delta E$ )

La Figura 1-6 muestra los resultados de las pruebas de DSC realizadas para las fibras con  $\text{MnO}_2$  y fibras después de cinco ciclos de degradación. La principal diferencia está relacionada con un pico encontrado alrededor de  $353\text{ }^\circ\text{C}$  que podría estar asociado con el tinte o los productos de degradación de este, adsorbidos en la fibra; FMN perdió gradualmente su capacidad de degradación de CI y la capacidad de resistir el estrés mecánico cuando estaban en constante agitación durante el ciclo de extracción.

**Figura 1-6:** Curva DSC de fibras con  $\text{MnO}_2$  (FMN) y Fibras después de 5 ciclos

---

## Conclusiones

El tratamiento enzimático sobre las fibras naturales derivadas del pseudotallo de plátano, demostró efectividad frente a los otros tratamientos que se postulan para la degradación de los compuestos lignocelulósicos de la pared celular. Esto se vio reflejado en la síntesis de nanopartículas de MnO<sub>2</sub> sobre la superficie fibrilar con una distribución homogénea mostrando una concentración de Mn asociado al ácido de 11036 ppm.

La optimización a través de la superficie de respuesta demostró una predicción eficiente de la remoción de color; de esta forma se logró identificar los valores mínimos de los factores con los que se logra una remoción de color exitosa, esto es muy importante ya que es coherente con la tarea de minimizar la cantidad de reactivos que se desechan propagando el cuidado ambiental.

El desempeño de FMN en contacto con el colorante índigo carmín demostró una remoción del 99%, estos valiosos resultados permitieron evaluar el reuso del material, con lo cual se concluyó que existen porcentajes significativos de degradación del IC por encima del 50% luego de 10 ciclos de degradación.

La evaluación del reuso del material en general fue positiva, ya que le otorgó un valor adicional a la fibra, y ya que esta no existe un deterioro durante los ciclos, la fibra puede ser candidata para repetir la síntesis de nanopartículas, sin embargo, este puede ser el alcance de otra investigación.

## Bibliografía

- Agronet - Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2018). *Producción nacional por producto*. <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>
- Bhushan, S., Rana, M. S., Mamta, Nandan, N., & Prajapati, S. K. (2019). Energy harnessing from banana plant wastes: A review. *Bioresource Technology Reports*, 7(April), 100212. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100212>
- Blanco, T., Ávila, C. A., & Ramírez, H. R. (2016). Nanostructured MnO<sub>2</sub> catalyst in *E. crassipes* (water hyacinth) for indigo carmine degradation. *Revista Colombiana de Química*, 45(2), 30. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v45n2.60395>
- Cadavid, Y., Cadena, E. M., Velez, J. M., & Santa, J. F. (2016). Degradation of Dyes Using Plantain Fibers Modified with Nanoparticles. In *Natural Fibres: Advances in Science and Technology Towards Industrial Applications* (pp. 99–110). <https://doi.org/10.1007/7854>
- Chacon, M., Blanco, C., Hinestroza, J., & Combariza, M. (2013). Biocomposite of nanostructured MnO<sub>2</sub> and Fique fibers for efficient dye degradation. *Green Chemistry*, 129(9), 1463–9262. <https://doi.org/10.1039/C3GC40911B>
- Cordeiro, N., Gouveia, C., Moraes, A. G. O., & Amico, S. C. (2011). Natural fibers characterization by inverse gas chromatography. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.008>
- Djuris, A. B. (2013). *UV-VIS and Photoluminescence Spectroscopy for Nanomaterials Characterization* (C. S. S. . Kumar (ed.)). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-27594-4>
- FAOSTAT – Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2018). *Plantain production 2018*. <http://faostat.fao.org/>
- Ferreira, D. P., Cruz, J., & Fangueiro, R. (2018). Surface modification of natural fibers in polymer composites. In *Green Composites for Automotive Applications*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102177-4.00001-X>

- 
- Gañán, P., Zuluaga, R., Restrepo, A., Labidi, J., & Mondragon, I. (2008). Plantain fibre bundles isolated from Colombian agro-industrial residues. *Bioresource Technology*, 99(3), 486–491. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.012>
- Gangwar, A. K., Prakash, N. T., & Prakash, R. (2014). Applicability of Microbial Xylanases in Paper Pulp Bleaching: A Review. *BioResources*, 9(2), 3733–3754. <https://doi.org/10.15376/biores.9.2.3733-3754>
- George, M., Mussone, P. G., & Bressler, D. C. (2014). Surface and thermal characterization of natural fibres treated with enzymes. *Industrial Crops and Products*, 53, 365–373. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.037>
- González, J. T. C., Dillon, A. J. P., Pérez-Pérez, A. R., Fontana, R., & Bergmann, C. P. (2015). Enzymatic surface modification of sisal fibers (Agave Sisalana) by *Penicillium echinulatum* cellulases. *Fibers and Polymers*, 16(10), 2112–2120. <https://doi.org/10.1007/s12221-015-4705-3>
- Hwang, N., & Barron R, A. (2011). BET surface Area Analisis of nanoparticles. In *OpenStax-CNX* (Issue 3, pp. 445–446). <https://doi.org/10.1353/hph.2003.0120>
- Izquierdo, H. (2009). Empleo del follaje de plantas de Musa spp como alternativa para la alimentación animal. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 49–60. <https://doi.org/https://doi.org/10.24188/recia.v6.n1.2014.260>
- Jiao, C., Tao, J., Xu, S., Zhang, D., Chen, Y., & Lin, H. (2017). In situ synthesis of hierarchical structured cotton fibers/MnO<sub>2</sub> composites: a versatile and recyclable device for wastewater treatment. *RSC Advances*, 7, 31475–31484. <https://doi.org/10.1039/C7RA04287F>
- Jörg, M. (2010). *Industrial Applications of Natural Fibres* (M. Jörg (ed.)). WILEY.
- Kalia, S., Thakur, K., Celli, A., Kiechel, M. A., & Schauer, C. L. (2013). Surface modification of plant fibers using environment friendly methods for their application in polymer composites, textile industry and antimicrobial activities: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 1(3), 97–112. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.04.009>

- Kim, R. H., Lee, S., Jeong, J., Lee, J. H., & Kim, Y. K. (2007). Reuse of greywater and rainwater using fiber filter media and metal membrane. *Desalination*, 202(1–3), 326–332. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2005.12.071>
- Mazzeo, M., Agaton, L., Mejia, L., Guerrero, L., & Botero, J. (2010). Aprovechamiento industrial de residuos de cosecha y poscosecha de plátano en el departamento de Caldas. *Revista Educación En Ingeniería*, No. 9, 128–139.
- Panyasart, K., Chaiyut, N., Amornsakchai, T., & Santawitee, O. (2014). Effect of surface treatment on the properties of pineapple leaf fibers reinforced polyamide 6 composites. *Energy Procedia*, 56(C), 406–413. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.07.173>
- Prsiazyni, V., Kramar, A., Dojcinovic, B., Zekic, A., Obradovic, B. M., Kuraica, M. M., & Kostic, M. (2013). Silver incorporation on viscose and cotton fibers after air, nitrogen and oxygen DBD plasma pretreatment. *Cellulose*, 20(1), 315–325. <https://doi.org/10.1007/s10570-012-9817-y>
- Riahi, K., Mammou, A. Ben, & Thayer, B. Ben. (2009). Date-palm fibers media filters as a potential technology for tertiary domestic wastewater treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 161(2), 608–613. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.04.013>
- Sahu, U. K., Mahapatra, S. S., & Patel, R. K. (2017). Synthesis and characterization of an eco-friendly composite of jute fiber and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles and its application as an adsorbent for removal of As(V) from water. *Journal of Molecular Liquids*, 237, 313–321.
- Selvaraj, A., Sivakumar, S., Ramasamy, A. K., & Balasubramanian, V. (2013). Photocatalytic degradation of triazine dyes over N-doped TiO<sub>2</sub> in solar radiation. *Res. Chem Intermed*, 2287–2302. <https://doi.org/10.1007/s11164-012-0756-x>
- Sfiligoj, M., Hribernik, S., Stana, K., & Kreže, T. (2012). Plant Fibres for Textile and Technical Applications. In *Advances in Agrophysical Research* (pp. 370–398). <https://doi.org/10.5772/67458>
- Shahzad, A. (2012). Hemp fiber and its composites - A review. *Journal of Composite Materials*, 46(8), 973–986. <https://doi.org/10.1177/0021998311413623>

- 
- Sosa, A., Rivas, J., Mogollon, G., Gutierrez, I., & Aguilera, A. (2011). Evaluacion papelera del pseudotallo de platano (*Musa paradisiaca*) en formulaciones con *Hevea brasiliensis*, *Eucalyptus urophylla* y *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. *La Revista Forestal Venezolana*, 55(1), 9. <http://ezproxy.unal.edu.co/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsgao&AN=edsgcl.303895942&lang=es&site=eds-live&scope=cite>
- Subramonian, W., Wu, T. Y., & Chai, S. P. (2015). An application of response surface methodology for optimizing coagulation process of raw industrial effluent using *Cassia obtusifolia* seed gum together with alum. *Industrial Crops and Products*, 70, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.026>
- Syed M., H., Umar, A., Azra, Y., Faisal, S., & Naseem, A. (2020). Recent trends of MnO<sub>2</sub>-derived adsorbents for water treatment: a review. *New Journal of Chemistry*, 44, 6096–6120. <https://doi.org/10.1039/C9NJ06392G>. Volume
- Zafra, M., & Celemin, A. (2012). *Estudio experimental, in vitro, sobre la estabilidad cromática de los composites AMARIS (Voco)*. Universidad Computense de Madrid.
- Zhai, R., Hu, J., Chen, X., Xu, Z., Wen, Z., & Jin, M. (2020). Facile synthesis of manganese oxide modified lignin nanocomposites from lignocellulosic biorefinery wastes for dye removal. *Bioresource Technology*, 315(May), 123846. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123846>
- Zhang, Y. H. P., & Lynd, L. R. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(7), 797–824. <https://doi.org/10.1002/bit.20282>
- Zheng, Y., Yu, S., Shuai, S., Zhou, Q., & Cheng, Q. (2013). Color removal and COD reduction of biologically treated textile effluent through submerged filtration using hollow fiber nanofiltration membrane. *Desalination*, 314, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2013.01.004>

## **2. Inmovilización de lacasa sobre fibra de plátano para degradación de índigo carmín**

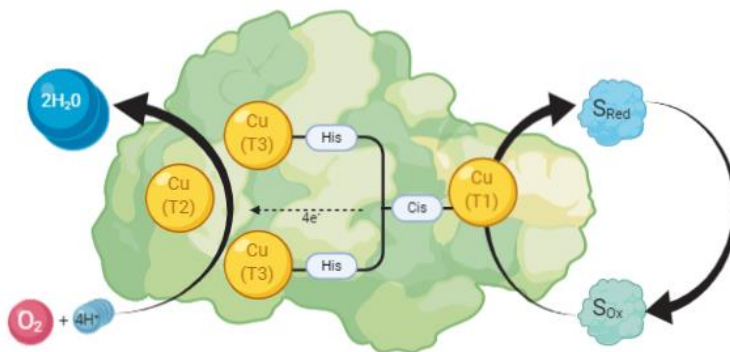
### **2.1 Introducción**

Las oxidoreductasas son enzimas que catalizan la transferencia de electrones desde una molécula donante a otra aceptora, dentro de esta clasificación se encuentran las lacasas, producidas por varias especies de hongos, plantas, bacterias e insectos que intervienen en reacciones acordes al metabolismo del organismo productor. Las fuentes más investigadas son plantas y hongos, en menor cantidad bacterias y algunos insectos. Las bacterianas se involucran en la esporulación y particularmente muchas participan en reacciones implicadas en mecanismos de defensa y resistencia (Sharma et al., 2007), en plantas el papel fundamental es la polimerización de los componentes de la pared celular y la regeneración del tejido dañado. Por su parte, las lacasas de origen fúngico, usualmente extracelulares, ayudan en la degradación eficiente de la lignina, producción de pigmentos, esporulación y formación de cuerpos frutales (Polak & Jarosz-Wilkolazka, 2012).

La acción catalítica de las lacasas, comprende sitios activos que contienen átomos de cobre encargados de catalizar la oxidación de varios sustratos aromáticos y llevar a cabo la reducción de oxígeno molecular a agua (Giardina & Faraco, 2010). La reacción empieza en el sitio T1, el sustrato reducido dona un electrón y este se transfiere a un clúster (T2) y (T3) incoloro, donde se enlaza un oxígeno molecular y se reduce a agua Figura 2-1. El resultado de este mecanismo es consecuente con un proceso limpio, y con un amplio rango de sustratos afines a la enzima, por lo tanto, la versatilidad de la lacasa se transforma en una oportunidad para su integración en procesos industriales como alternativa biotecnológica.



**Figura 2-1:** Mecanismo de reacción de lacasa



Fuente: Imagen modificada de Rodríguez-Delgado et al., (2015)

Las enzimas lacasas se han explorado en diferentes campos. En el caso de la industria de celulosa, son integradas en la obtención de la pulpa, intervienen en el proceso de blanqueo o deslignificación y tratamiento de efluentes. En industrias textiles, intervienen en la síntesis del colorante sobre las fibras (Polak & Jarosz-Wilkolazka, 2012) o para el tratamiento de aguas residuales provenientes de la manufactura textil (Legerská et al., 2016). En el campo ambiental, alimentario y clínico pueden ser usadas para el desarrollo de biosensores para el análisis de oxígeno, morfina, codeína, catecolamina o flavonoides, entre otras (Rodríguez-Delgado et al., 2015).

A nivel industrial, la pérdida del catalizador conduce a una renovación continua y por consiguiente a una alta inversión económica. No obstante, la inmovilización enzimática se postula como una alternativa eficiente que permite la recuperación del catalizador, ya que evita la desnaturalización por solventes, además de prolongar la vida útil de la enzima y su reúso; esto debido al confinamiento del biocatalizador en un soporte insoluble que provee un microambiente y prolonga la actividad (Brandi et al., 2006; Fernández-Fernández et al., 2013). El tipo de método de inmovilización aplicado y las condiciones de operación como: pH, temperatura, tiempo de proceso, entre otros parámetros se convierten en piezas fundamentales para una inmovilización exitosa.

El objetivo de la inmovilización es llevar a cabo la unión del catalizador con un soporte insoluble; las estrategias para inmovilizar pueden clasificarse en métodos físicos y químicos, donde existen interacciones reversibles o irreversibles entre el soporte y la

---

enzima. Dentro de los métodos físicos, se encuentran: inmovilización por adsorción y por atrapamiento, la primera y más sencilla es reversible, por eso, una vez la enzima se deteriora y pierde su actividad catalítica se puede reutilizar el soporte, las interacciones que se presentan son de tipo Van der Waals y fuerzas electrostáticas, principalmente uniones débiles entre la enzima y el soporte, este método no deforma la estructura nativa de la enzima además de ser económico (Jesionowski et al., 2014). Por su parte, la inmovilización por atrapamiento se define como la retención física de una enzima en una red polimérica que permite el tránsito del sustrato y los productos, pero retiene la enzima, en este caso la enzima se encuentra confinada en una matriz o membrana, generalmente poliacrilamida, alginato, colágeno o gelatina. La desventaja radica en las limitaciones que existen en la transferencia de masa (Fernández-Fernández et al., 2013).

Por otra parte, se clasifican en el método químico: la inmovilización por entrecruzamiento y por formación de enlaces covalentes. Para que este último se constituya, pueden modificarse los grupos funcionales en la superficie del soporte, o bien, modificar la cadena principal del polímero para producir un grupo activo que reaccione con grupos nucleofílicos en la proteína (López-Gallego et al., 2013). Con el fin de conservar la actividad enzimática, los grupos funcionales de los aminoácidos del sitio activo de la enzima no deben estar implicados en la unión con el soporte, por lo tanto, la dirección de la enzima al momento de enlazar con el soporte será fundamental; en contraste, la forma, composición y funcionalización del soporte son características determinantes que optimizan el proceso (Mohamad et al., 2015).

La inmovilización por entrecruzamiento, conocido en inglés como (cross-linking), se basa en la formación de enlaces covalentes como redes intermoleculares entre las enzimas, los cuales se constituyen con agentes entrecruzantes (glutaraldehído, como reactivo más común). Los beneficios de este método convergen en una alta actividad enzimática concentrada en el catalizador, estabilidad y economía debido a que se puede prescindir de un soporte adicional que suele ser costoso (Sheldon, 2007). Actualmente, existe un creciente interés en este método, con una variación que consiste en la cristalización de enzimas y su posterior reticulación con glutaraldehído (*Cross-Linked Enzyme Crystals o CLECs*) (Ren et al., 2019). En este método, se aumenta la estabilidad en el cristal y la reticulación impide el desprendimiento de la enzima, de forma que la propia enzima actúa como soporte y su estructura terciaria está estabilizada por las uniones covalentes

intermoleculares, la desventaja del método es que debido al alto nivel de pureza que deben tener las enzimas que participan en la inmovilización, los costos del proceso son elevados (Arroyo, 1998; López-Gallego et al., 2013). La esquematización de los métodos descritos anteriormente se presenta a continuación (Figura 2-2).

**Figura 2-2:** Métodos de inmovilización. a). inmovilización por adsorción. a). Inmovilización por atrapamiento. c). Inmovilización por enlace covalente. d). Inmovilización por entrecruzamiento

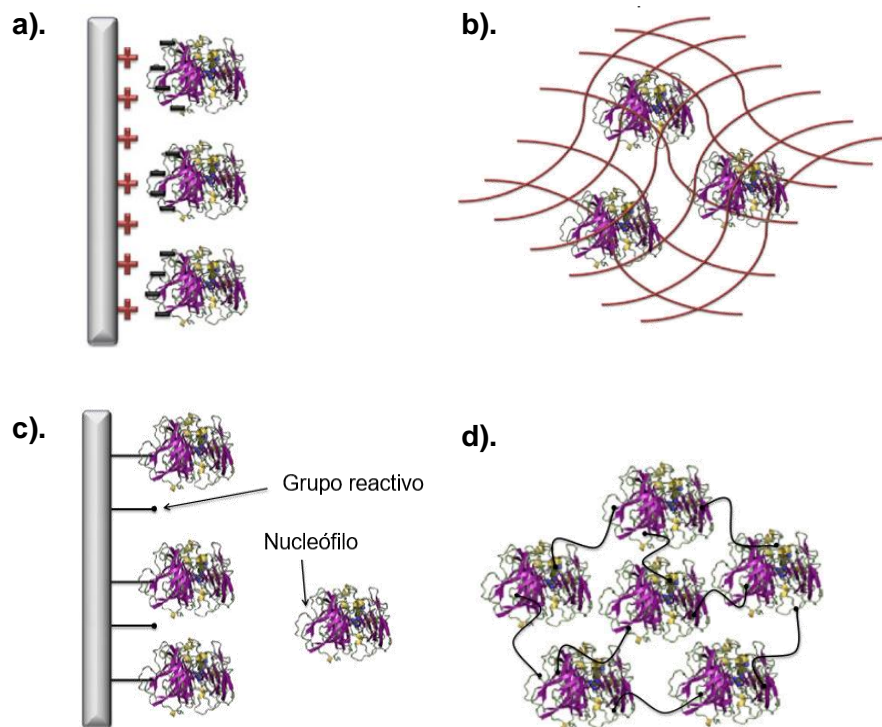


Imagen modificada de Fernández-Fernández, (2013)

La selección de un soporte adecuado es uno de los factores fundamentales para conseguir una inmovilización exitosa, fundamentalmente debe proteger la estructura enzimática contra las condiciones adversas y ayudar a la enzima inmovilizada a retener la actividad catalítica, por eso, propiedades como la resistencia al ataque microbiano, resistencia a la compresión, bajo costo y biocompatibilidad se prefieren a la hora de su elección, además de la disponibilidad de los grupos activos en la superficie del soporte para mejorar las interacciones enzima-soporte (Mohamad et al., 2015). Existe un amplio estudio enfocado en diversos materiales para este tipo de uso, donde se exploran

materiales de origen natural y sintético, orgánicos e inorgánicos, y resulta interesante la investigación de materiales lignocelulósicos como: mosto cervecero, residuos de madera, fibras de *Luffa cylíndrica*, cascarilla de maní, fibra de coco, entre otros (A. M. Da Silva et al., 2012; El-Roz et al., 2013; Gomes et al., 2005; K.B & S.G, 2010). El interés por estos materiales radica en su disponibilidad y bajo costo dado que son subproductos de cadenas productivas.

Consecuentemente, en el tratamiento de efluentes de la industria textil también se ha estudiado el uso de soportes de carácter natural en la inmovilización de enzimas para la biorremediación. Cristóvão et al., (2011), estudiaron la decoloración de tintes textiles reactivos mediante un reactor por lotes, donde usaron fibra de coco como soporte para la inmovilización de una lacasa comercial, los resultados demostraron alto porcentaje de decoloración, entre 80 y 90% en el primer ciclo, y en un tercer ciclo reportan una reducción del 30%.

El interés por el uso de fibras naturales derivadas de subproductos agrícolas integra alternativas sustentables a los problemas medioambientales que deterioran los ecosistemas y avanzan con agilidad. En este sentido, este capítulo presenta una metodología para modificar de forma física y enzimática fibras de plátano extraídas de pseudotallo, con el fin de inmovilizar la enzima lacasa vía adsorción y estudiar la eficiencia de la inmovilización para la remoción de color del índigo carmín.

## 2.2 Materiales y métodos

### 2.2.1 Remoción de color usando lacasa

Con el fin de determinar la efectividad de la lacasa en la degradación del colorante carmín de índigo se usó ECOFADE LT100; sistema enzimático compuesto principalmente por lacasa (EC 1.10.3.2) producida por una cepa modificada de *Cerratia unicolor*, un mediador (3,5-dimethoxi-4-hidroxibenzonitrilo), ácido adípico, sacarosa, almidón e isotridecanol etoxilado (Çifçi et al., 2019). Se evaluó una dosis de 120 U de lacasa por mL de sustrato correspondiente a soluciones de colorante índigo carmín (C.I. 73015) a diferentes concentraciones (20 a 200 ppm) en buffer de acetato (pH 5 - 0.2 M) a temperatura ambiente.

La degradación del colorante se determinó a 610 nm usando un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Fisher, GENESYS 10S USA), cuando la enzima entra en contacto con el colorante se monitorea la absorbancia en función del tiempo de reacción (5 y 30 min). El porcentaje de remoción se calculó con la ecuación (2-1).

Con el fin de establecer el cambio en la remoción respecto al tiempo y concentración de colorante o sustrato idónea para la dosis de enzima utilizada, se calculó el delta ( $\Delta_{deg}$ ) con la ecuación (2-2).

$$\%D = \left( \frac{(Abs_{t0} - Abs_{tf})}{Abs_{t0}} \right) \times 100 \quad (2-1)$$

$$\Delta_{deg} = (\%)Deg_{30min} - (\%)Deg_{5min} \quad (2-2)$$

$\%D$ : Porcentaje de degradación (5 min o 30 min)

$Abs_{t0}$ : Absorbancia inicial (tiempo 0)

$Abs_{tf}$ : Absorbancia al tiempo final (5 o 30 min)

$\Delta_{deg}$ : Cambio de la degradación respecto al tiempo

### **2.2.2 Modificación de fibras de plátano por vía enzimática y mecánica por molinillo**

La fibra inicial (FI), se obtuvo según procedimiento reportado en la sección 1.2.1 (Capítulo 1). Para obtener las fibras modificadas enzimáticamente (FV) se siguió la metodología de la sección 1.2.1 variando la longitud de la fibra a 1 cm.

Las fibras modificadas mecánicamente por molinillo se denominaron FM. Para la obtención de estas, se empleó un molino de cuchillas (KRUPS GX 4100. 200 W, 60 Hz), donde 0.5 g de FI de 1 cm de longitud fueron sometidos a esfuerzos cortantes durante 30 segundos. Posteriormente las fibras se clasificaron en un tamiz No.20 con el fin de retirar las partículas finas y disponer del retenido acumulado en la criba como fibras tratadas por vía física con molinillo (FM).

El análisis morfológico de las fibras (FI, FV, FM) se realizó con microscopía electrónica de barrido (FE-SEM), usando un microscopio electrónico JEOL JSM-7100 F, y previo al análisis se realizó un recubrimiento de oro por pulverización al vacío las fibras con el fin de mejorar la transferencia electrónica.

### 2.2.3 Medición de la actividad enzimática de la lacasa

La actividad enzimática (U/L), es definida como la cantidad de lacasa que cataliza la conversión de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto a temperatura ambiente. El sustrato empleado, ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS, 500  $\mu\text{L}$ , 0.01 mM), reaccionó con 30  $\mu\text{L}$  de lacasa y 470  $\mu\text{L}$  buffer acetato (0.2 M – pH 5); seguidamente, consecuente con la oxidación del ABTS, se registró el cambio en la absorbancia usando un espectrofotómetro UV-vis (Thermo Fisher, GENESYS 10S, USA) con longitud de onda de 420 nm a 25 °C. Las mediciones de la actividad enzimática, se calcularon con la ecuación (2-3) (Baltierra-Trejo et al., 2015).

$$U * L^{-1} = \frac{(\Delta Abs)(V_t)(Df)(10^6)}{(t)(E)(d)(V_s)} \quad (2-3)$$

$U$ : Unidad de actividad enzimática ( $\mu\text{mol} * \text{min}^{-1}$ )

$\Delta Abs$ : Absorbancia min 1 – Absorbancia min 0

$V_t$ : Volumen total en la celda ( $\mu\text{L}$ )

$Df$ : Factor de dilución

$10^6$ : Factor de corrección ( $\text{L} * \text{mol}^{-1} * \text{min}^{-1}$ )

$t$ : Tiempo (min)

$E$ : Coeficiente de extinción molar 36000 ( $\text{L} * \text{M}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ )

$d$ : Distancia (cm)

$V_s$ : Alícuota o volumen de muestra ( $\mu\text{L}$ )

$U * L^{-1}$ : Actividad enzimática

## 2.2.4 Inmovilización de lacasa sobre fibras de plátano

En el proceso de inmovilización por adsorción, 0.5 g de cada tipo de fibra (FI, FV y FM) se sumergen en 25 mL de buffer con dosis de 2, 4 y 6 U/mL de lacasa, luego se lavaron con dos volúmenes de buffer de 10 mL, se midió la actividad residual de la lacasa según ítem 2.2.3; se midió la actividad en estos lavados y luego se secó el soporte por 12h a 38°C. Las fibras de plátano con lacasa inmovilizada se denominaron FI<sub>LAC</sub> (Fibra Inicial sin ningún pretratamiento, con Lacasa inmovilizada), FV<sub>LAC</sub> (Fibra pretratada enzimáticamente con Viscozyme, con lacasa inmovilizada) y FM<sub>LAC</sub> (Fibra pasada por molinillo, con lacasa inmovilizada).

El desempeño de la inmovilización equivalente al rendimiento de la inmovilización (%IY) se expresa en función del porcentaje de actividad enzimática retenido en la fibra después de los lavados a partir de la ecuación (2-4) (D. F. Silva et al., 2017).

Por otra parte, el análisis de estabilidad de la lacasa permitió determinar los parámetros de inmovilización como pH, temperatura y tiempo. Se usaron 120 U/mL de lacasa libre en 25 mL de buffer acetato o fosfato 0.2 M en un rango de 5 a 8 unidades de pH; la temperatura y el tiempo de inmovilización se evaluaron simultáneamente, con 5 °C y 25 °C en periodos de 8 y 24 horas. El cálculo de actividad relativa (%AR) (ecuación (2-5) corresponde a la relación de la actividad inicial ( $AE_0$ ) y final ( $AE_F$ ) medida en el sobrenadante.

Se determinó el parámetro de Actividad Residual, como aquel que permite identificar la cantidad de lacasa que luego de realizar la inmovilización, queda remanente en la solución, es decir no queda unida a las fibras. El porcentaje de actividad residual se determinó por la ecuación (2-6).

$$\%IY = \frac{AE_0 - (AE_F + AE_{LAV})}{AE_0} * 100 \quad (2-4)$$

$$\%AR = \frac{AE_F}{AE_0} * 100 \quad (2-5)$$

$$\%Actividad Residual = 100 - \%IY \quad (2-6)$$

Donde:

$AE_0$ : Actividad enzimática inicial

$AE_{LAV}$ : Actividad enzimática de los lavados

$AE_F$ : Actividad enzimática final.

Para la medición de propiedades cinéticas de la fibra inmovilizada, se utilizó un Zetasizer nano de Malvern con una celda tipo DTS1060, se redujo el tamaño de partícula hasta 180  $\mu\text{m}$  usando un molino de cuchillas y un tamiz convencional N° 80, 60 y 40 para clasificación del tamizado. Se definió la concentración de la muestra considerando como variables, la estabilidad de la muestra a lo largo de la medición y cuanto apantallamiento podría tener la medida. Se manejaron tamaños de 180, 250 y 400 micrones. Se realizaron ensayos para diluciones peso/volumen 1:10, 1:100, 1:1000, 0.5:1000, 1:10000.

Posterior a la determinación de la concentración, se prepararon tres muestras con 3 repeticiones cada una, para un total de 9 muestras por ensayo, de las cuales se descartaron los resultados que no indicaban satisfacción de medida a juicio del equipo. Se realizaron ensayos con pH 4, 5, 6, 7 y 8.

### **2.2.5 Degradación de colorante con lacasa inmovilizada**

La fibra de plátano con lacasa inmovilizada ( $FI_{LAC}$ ,  $FV_{LAC}$  y  $FM_{LAC}$ ), se utilizó para la degradación del colorante índigo carmín (IC). 0.5 g de IC se usaron en 25 mL totales de solución buffer de acetato (0.2 M - pH 5) bajo agitación constante a 25 °C. Cada 2 horas se midió la absorbancia a 610 nm usando un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Fisher, GENESYS 10S, USA). El porcentaje de degradación del colorante fue calculado con la ecuación (2-1).

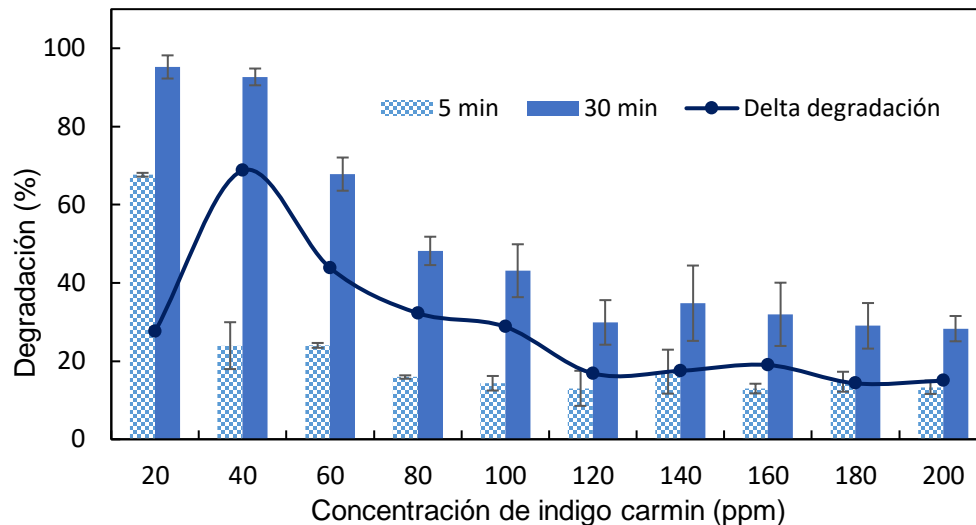


## 2.3 Resultados y discusión

### 2.3.1 Degradación del colorante índigo carmín con la aplicación de lacasa libre

En la Figura 2-3, se observa la efectividad de una dosis específica de lacasa (120 U/mL<sub>colorante</sub>) sobre la degradación de carmín de índigo a diferentes concentraciones del sustrato, en un rango de 20 a 200 ppm. La lacasa aplicada, demostró un efecto positivo en cuanto a la degradación del colorante. La máxima degradación correspondiente a 95.22 y 92.67% en 30 min con las menores concentraciones de sustrato 20 y 40 ppm, respectivamente; no obstante, a 5 min solamente se identifica un valor máximo en la degradación de 67.66%, únicamente cuando la concentración del sustrato es de 20 ppm. A medida que aumenta la concentración del colorante, el porcentaje de degradación evaluado a 30 minutos disminuye notoriamente hasta alcanzar una estabilización a partir de 120 ppm, este efecto se puede atribuir a la inhibición enzimática por saturación de sustrato, ya que la acción eficiente de la lacasa en la transformación del sustrato está ligada a las interacciones que presenta la enzima con las moléculas e iones presentes en el medio. La saturación de los sitios activos de la enzima por las moléculas del colorante, reduce la interacción entre las moléculas IC y la enzima, mientras que en bajas concentraciones hay más sitios activos libres para la interacción con las moléculas IC (Cano et al., 2011).

La reducción en la degradación a medida que se aumenta la concentración del colorante puede relacionarse al sodio (Na<sup>+</sup>) presente en la estructura molecular del IC que actúa como agente inhibitorio. Wang et al., (2016) evaluaron el efecto del Na<sup>+</sup> y otros metales sobre la actividad enzimática de lacasa producida por *Cerratia unicolor*, encontrándose un porcentaje significativo de inhibición ocasionada por la acción Na<sup>+</sup> esto debido a que el ión interfiere con el aminoácido L-cisteína involucrado en el sitio activo de la enzima.

**Figura 2-3:** Efectividad de la lacasa en la degradación de carmín de índigo.

La efectividad enzimática en la degradación dependerá también de la estructura del colorante y la actividad enzimática. Michniewicz et al., (2008) encontraron que la lacasa producida por *Cerratia unicolor* es capaz de actuar en colorantes tipo azo y antraquinona instantáneamente cuando se agrega una dosis de 1 U/mL de la enzima purificada con concentraciones entre 60 y 100 ppm del colorante, sin embargo, la decolorización total de Acid Red 27 tomó un periodo de 24 h usando 50 veces la enzima purificada. En el presente estudio, los resultados demostraron degradación del carmín de índigo, con el uso de la enzima comercial ECOFADE LT100 derivada de la cepa fúngica *Cerratia unicolor*, con una dosis de 120 U/mL, las concentraciones evaluadas del colorante incluyen hasta a 200 ppm; particularmente a 40 ppm (85.77  $\mu$ M) la remoción es superior al 90% en 30 minutos; sin embargo se debe tener en cuenta al tratarse de un compuesto enzimático comercial se encuentran otros componentes que pueden interferir en la degradación.

El delta de degradación ( $\Delta_{deg}$ ) es un parámetro que brinda información importante sobre la concentración de índigo carmín. En la Figura 2-3 se observa que el delta es mayor cuando la concentración del colorante es de 40ppm, esto significa que en este punto hay mayor cambio en la degradación en el tiempo (30 – 5 min), con el propósito de obtener la mayor degradación de colorante usando la enzima y basados en investigaciones anteriores en las que usan cantidades similares, 30ppm (Li et al., 2015), 44.6 mg/L (Cho et al., 2011), los siguientes experimentos se desarrollaron con 40 ppm. Además, esta concentración

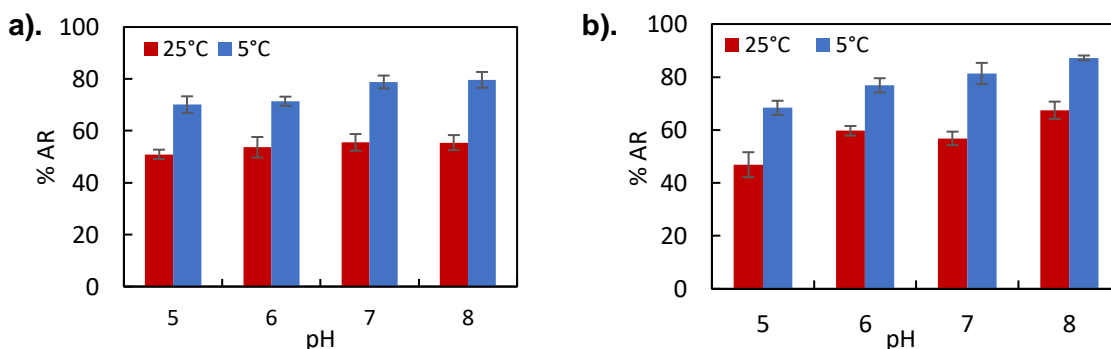
coincide con la que se usó en el capítulo 1, y es un punto clave para la comparación de la efectividad de la enzima partiendo de la concentración del colorante.

### 2.3.2 Estabilidad de lacasa libre

Mediciones de estabilidad de lacasa son fundamentales para la inmovilización, ya que aportan información sobre la actividad catalítica de la enzima a través del tiempo. En la Figura 2-4 se muestra el porcentaje de actividad relativa (%AR) cuando la lacasa fue sometida a diversas condiciones de pH, temperatura y tiempo. La actividad relativa corresponde a la relación de la actividad final respecto a la actividad inicial de referencia para evaluar la estabilidad de la enzima en el tiempo. Se evidencia que transcurridas 8 horas (Figura 2-4 a) los perfiles de la enzima incubada a 5°C son superiores a 70% de actividad relativa; en el mismo gráfico, el progreso de la lacasa al transcurrir las 8 horas a 25°C reportó un porcentaje de AR inferior al 55%.

Transcurridas 24 horas (Figura 2-4 b), el mayor valor (87.21%) se obtuvo a 5°C y pH 8, a bajas temperaturas se observó una tendencia de crecimiento del %AR a medida que se aumentó el pH, ya que los porcentajes están por encima de los obtenidos a 25 °C; y en contraste, a esta temperatura el mayor porcentaje de AR fue de 67.45% a pH 8.

**Figura 2-4:** Efecto del tiempo, temperatura y pH en la actividad relativa (%AR) de lacasa libre a). 8 horas. b). 24 horas.



La temperatura baja se asocia al efecto hidrofóbico, el cual provoca que los aminoácidos se agrupen para evitar el contacto con el agua y la enzima pueda conservar una estructura rígida en el tiempo, no obstante, con temperaturas superiores a 25°C el efecto hidrofóbico permanece aparentemente constante, sin embargo, pueden ocurrir interacciones de otro

---

tipo como rupturas o fluctuaciones conformacionales en la proteína que generalmente no son reparables (Pucci & Rومان, 2017), esta puede ser una razón por la cual se observa un predominio permanente del %AR a 5 °C, ya que a esta temperatura la enzima puede conservar su estructura inflexible, con menos interacciones con los residuos de los aminoácidos. En otras investigaciones, se demostraron resultados similares con lacasa asilada de *Cerreña unicolor*, almacenada en buffer de fosfato; se reportó que luego de 24 horas no hubo pérdida significativa de actividad enzimática (Michniewicz et al., 2006), en concordancia con lo anterior, Castaño Urueña, (2014), aisló y purificó una lacasa de origen fúngico y en el análisis de estabilidad consignó que en un periodo de 120 a 180 minutos dicha enzima fue estable a 4 °C.

Un aspecto favorable de las condiciones térmicas de baja temperatura, es que restringen reacciones químicas no deseadas en el proceso, por ejemplo, la reacción de la lacasa en la conversión del complejo lignocelulósico que es catalizada a altas temperaturas y podría generarse durante el proceso de inmovilización sobre los componentes de la fibra (Kim et al., 2002).

En otro sentido, el pH, es crucial en la estabilidad ya que mantiene el potencial de la enzima y está íntimamente relacionado con el punto isoeléctrico; se ha registrado que las lacasas fúngicas tienen un punto isoeléctrico (pI) entre 3 y 7 mientras que las lacasas vegetales, están en un rango de 9, en los hongos las enzimas generalmente se producen extracelularmente y deben adaptarse a crecer en condiciones ambientales, por eso el pH debe ser cercano al neutro; acorde con lo anterior, se han estudiado lacasas producidas por *Cerreña sp*, donde el rango de estabilidad del pH fue entre 6 y 8, sin embargo, sólo se obtuvo un 90% de actividad relativa con pH 8 (Yang et al., 2015); por su parte, (Cristóvão et al., (2011), estudiaron la estabilidad de una lacasa por un tiempo de 2 horas y durante este tiempo la actividad enzimática se mantuvo estable con pH entre 7 y 8. Acorde a los resultados obtenidos de %AR y dado el origen fúngico de la enzima, los valores de pH concuerdan en 7 y 8.

Las condiciones que mantienen la enzima estable serían las apropiadas para conservar la actividad enzimática en el proceso de inmovilización, dado que son vía de la conservación de la estabilidad enzimática en el transcurso del tiempo, en este sentido los parámetros

seleccionados fueron pH 8, 5°C por 24 h, y es preciso aclarar que no se usó agitación en el procedimiento.

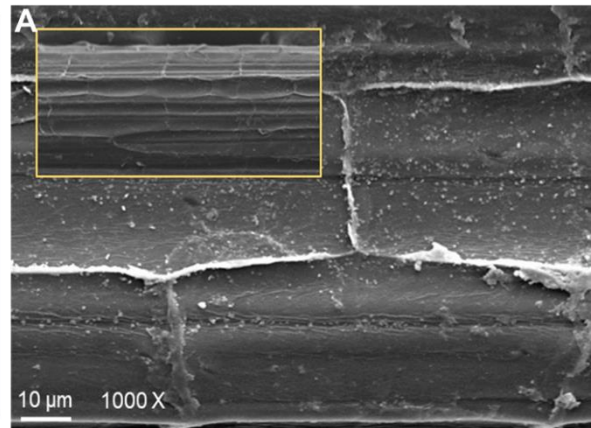
### **2.3.3 Efecto del pretratamiento enzimático y mecánico sobre la fibra de plátano**

En la Figura 2-5 se presentan las imágenes SEM y ópticas de las fibras tratadas enzimáticamente, modificadas vía física y la fibra inicial. Una vista longitudinal de la fibra inicial (FI) a través de microscopía SEM (Figura 2-5 a), proporciona información de sobre la disposición celular, se aprecia una superficie uniforme con aspecto de bloques apilados correspondientes a células alargadas que componen la fibra individual; no obstante, cuando se realiza el proceso de molienda el conjunto de fibras adquiere mayor volumen debido a la acción de esfuerzos mecánicos que modifican la morfología de las fibras e incrementan el área superficial. Por su parte, la Figura 2-5 b) detalla la rasgadura de la pared celular, concretamente en la pared primaria por ser la más expuesta y como consecuencia se observan canales o nervaduras verticales ocasionadas por la cizalla que podrían aumentar el área superficial de la FM. Los tratamientos físicos pueden afectar las características estructurales desencadenando modificaciones poco profundas que no alteran la estructura química de la fibra (Varghese & Mittal, 2017).

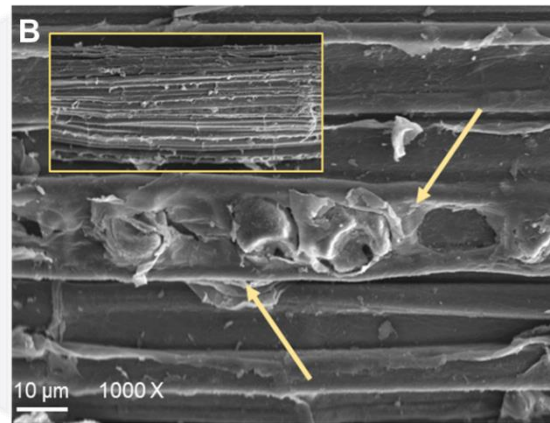
En la Figura 2-5c), la fibra tratada enzimáticamente (FV) comprende una especie de laminillas dobladas y desorganizadas que hacen parte de la pared celular, se originaron gracias a la sinergia entre xilanasas, hemicelulasas y celulasas presentes en Vizcosyme L; las cuales reaccionan con los componentes poliméricos de la pared celular principalmente con la fracción de celulosa amorfa (Kalia et al., 2013), donde existe baja densidad de componentes elásticos y como resultado se genera una especie de descortezado donde se desprenden finas fibrillas como se explicó en la sección 1.3.1 del capítulo 1.

**Figura 2-5:** Imágenes de microscopía SEM. A). Fibra inicial (FI). B). Fibra pasada por molino (FM) C) Fibra tratada enzimáticamente con Viscozyme L (FV)

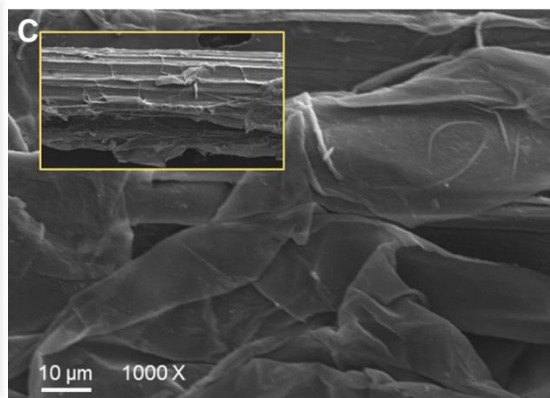
a). **Fibra inicial**



b). **Fibra tratada mecánicamente**

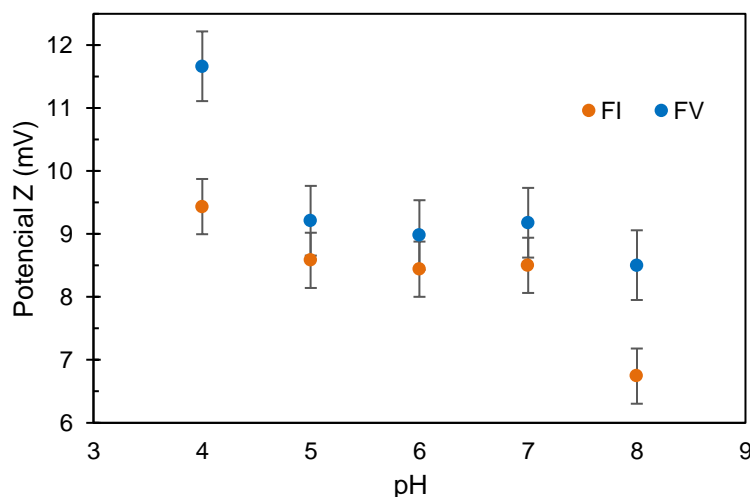


c). **Fibra tratada enzimáticamente**



La Figura 2-6 presenta el comportamiento electrocinético de las fibras, a juzgar por el comportamiento de la curva descrita por la transformación superficial de FV, se puede notar que en todo punto de evaluación de los valores de pH, las mediciones superan a las obtenidas por la fibra inicial (FI), por lo tanto el desplazamiento de partículas hacia las partículas de fibra tratadas enzimáticamente FV, es mayor, lo cual permite inferir que existen cargas superficiales provocadas por el tratamiento, y que estas son de carácter negativo.

**Figura 2-6:** Comportamiento electrocinético de Fibra inicial (FI) y Fibra tratada enzimáticamente (FV)



La fuerza iónica y la conductividad presente en las soluciones es suficiente para la aceptación de un valor verdadero del potencial Z (Luxbacher, 2020). Las pequeñas diferencias de los valores de tensión eléctrica entre los valores de pH 5, 6 y 7 pueden ser explicados por efectos de las incertidumbres altas en los ensayos de la fibra con tratamiento enzimático que podrían llevar estas diferencias desde un valor promedio de 6% hasta un 18%.

Debido a la presencia de redes poliméricas de celulosa en la fibra y al trabajo de molienda, es apreciable la presencia de cargas parciales negativas en la superficie de la fibra. Es posible discriminar la acción de la hidrólisis sobre la superficie de la fibra (FV), de la acción por tratamiento mecánico de cizalladura por molienda (FM), pues aun cuando al pretratamiento con Viscozyme L se le aplicó molienda, mejoró frente a la aplicación de este último sobre la fibra cruda o inicial (FI).

Altas conductividades de las soluciones, garantizan la representatividad de las partículas disueltas, así la medición de la tensión medio-superficie se mantiene a lo largo de la celda, esto se controla con la fuerza iónica del medio líquido y a su vez con la concentración de las soluciones Buffer. Se puede afirmar que dado el arreglo de cargas superficiales que realiza Viscozyme, este pretratamiento atiende a la mejora de degradación ante los controles. Esta transformación superficial aumenta el fenómeno de afinidad por cargas demostrando una posibilidad de mayor interacción con la enzima lacasa.

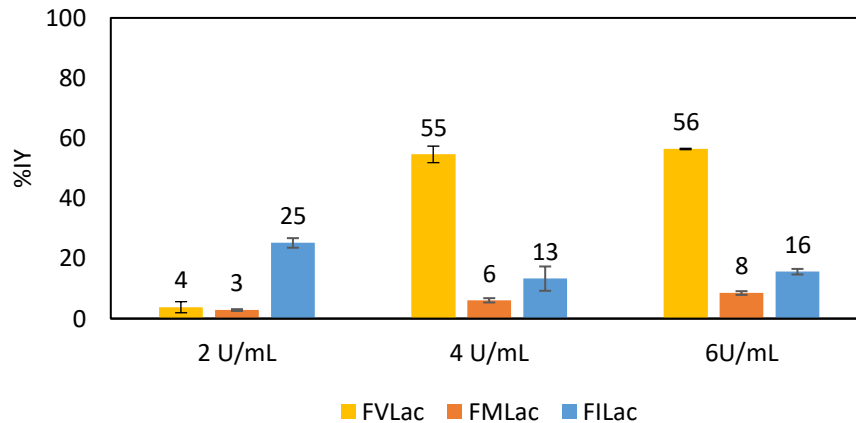
### **2.3.4 Rendimiento de la inmovilización**

La inmovilización de la enzimalacasa se realizó usando como soporte fibras pretratadas (FV, FM) y sin pretratamiento denominada fibra inicial (FI). Las condiciones de pH y temperatura empleadas fueron seleccionadas a partir del ensayo de estabilidad con lacasa libre a pH 8 y 5 por 24 horas; investigaciones previas proporcionaron información para establecer 3 dosis de lacasa, los valores corresponden a un punto por encima y por debajo del punto medio (120 U/g) establecido gracias a los autores Cristóvão et al., (2011). En la Figura 2-7, se observa el rendimiento de la inmovilización respecto a la dosificación y al tipo de modificación en el soporte una vez inmovilizada la enzima ( $FI_{LAC}$ ,  $FV_{LAC}$ ,  $FM_{LAC}$ ), los resultados revelaron porcentajes significativamente altos sobre fibra tratada enzimáticamente con Viscozyme (54.61%) y dosis de lacasa superiores de 6 U/L (56.41%) en comparación con la fibra inicial (FI) donde el mayor rendimiento se obtuvo con la menor dosis de Lacasa y por su parte la fibra tratada mecánicamente (FM) demostró rendimientos mínimos en todos los casos.

En el ensayo también se comprobó la eficiencia de la inmovilización cuando se combina el pretratamiento enzimático y mecánico, sin embargo, los resultados arrojaron valores de rendimiento de inmovilización inferiores, por eso no se muestran en el gráfico.



**Figura 2-7:** Influencia del tratamiento de la fibra y la dosis de lacasa en el rendimiento de inmovilización (%IY)



Existe un incremento en el rendimiento de inmovilización (%IY) cuando se usa enzimas hidrolíticas para el pretratamiento de la fibra, es decir que el proceso de inmovilización se puede lograr a través de una ruta verde utilizando un biocatalizador para la modificación de la fibra de pseudotallo, no obstante, la ruta deja de ser eficiente cuando el pretratamiento es por vía física usando molienda, ya que los rendimientos de inmovilización no superaron el 9% con las dosis evaluadas y en contraste con la fibra inicial, el rendimiento de inmovilización más alto se reportó con 2 U/L y fue de 25.16%. También se observa una particularidad y es que la fibra inicial (FI) que no pasa por ningún tratamiento, tiene un rendimiento superior que la fibra molida en todos los casos, y según la literatura, esto puede acunarse a la limpieza de la fibra, resulta que cuando se realiza la molienda, se desprenden microfibrillas que pueden quedar adheridas a la fibra y pueden obstruir las uniones o puntos de contacto de la fibra-enzima.

Aunque el tratamiento físico por molienda (FM) es limpio, rápido y respetuoso con el medio ambiente, no altera la composición química de las fibras (Syazwani et al., 2018), esto afecta el rendimiento de inmovilización. El objetivo del tratamiento físico es proporcionar un mejor contacto; en teoría, la superficie de la fibra se vuelve rugosa luego de la molienda (Figura 2-5B), lo cual permitiría mejorar el área de contacto y proporcionar un entrelazado mecánico con la enzima, sin embargo, este no es el caso para la fibra de plátano y la enzima Lacasa.

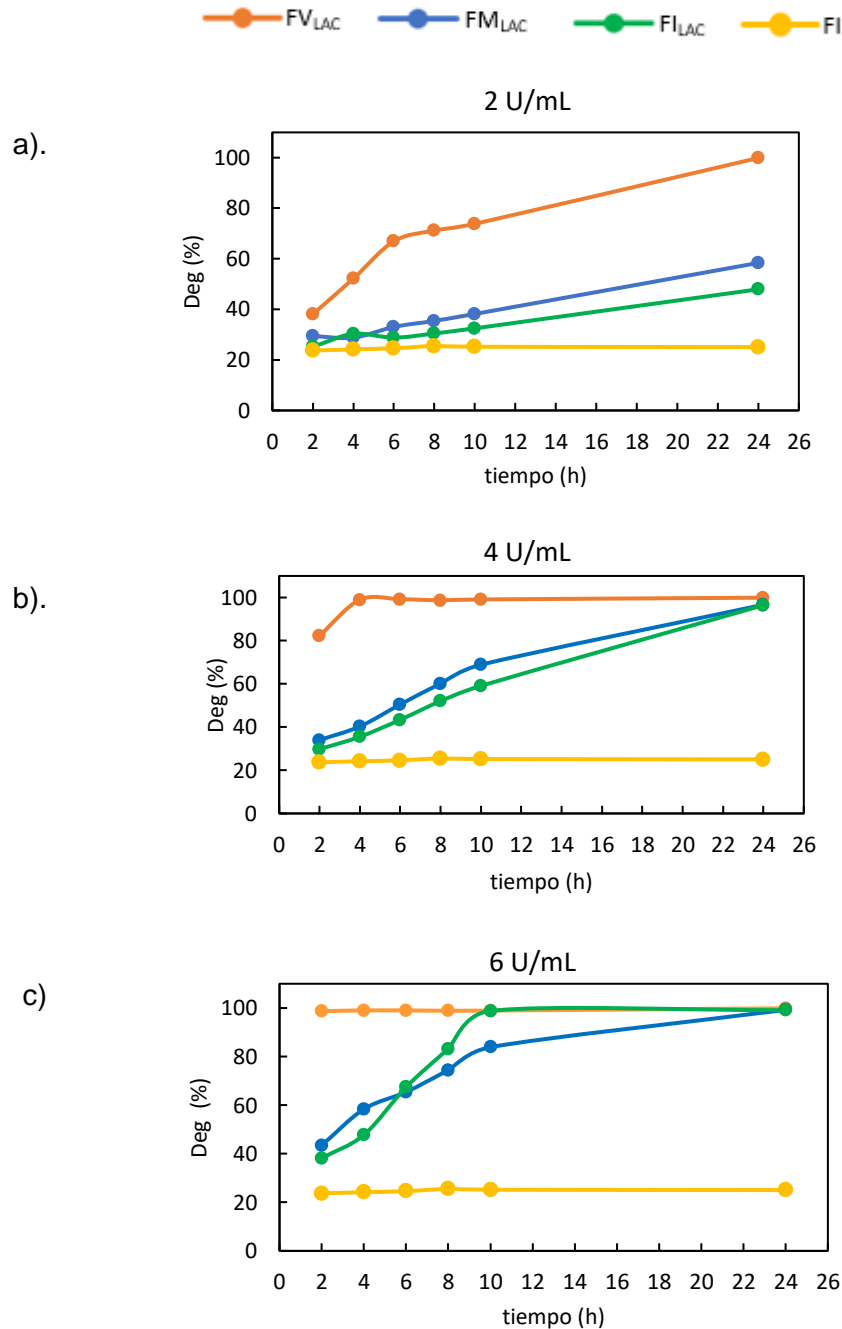
---

Los resultados del tratamiento enzimático, posiblemente se deben al aumento de los lugares intramicelares primarios en el polímero de celulosa que generados por la reacción catalítica de Viscozyme, y esto significa mayor accesibilidad de los grupos activos en la superficie del polímero de celulosa, por lo tanto mayor influencia en la capacidad de adsorción (Ribitsch et al., 1996). Consecuente con lo anterior, como se observó en los resultados de la Figura 2-6, las cargas superficiales de la fibra FV otorgan una carga general negativa, la lacasa lleva cargas netas positivas y tiende a adsorberse en la fibra, ya que la superficie cargada negativamente puede promover la estabilidad y la conductividad de la lacasa inmovilizada. Basados en simulaciones sobre el comportamiento de adsorción de la lacasa, existe una sinergia de las interacciones electrostáticas y enlaces Van der Waals para que se genere la unión fibra-enzima, pero las interacciones electrostáticas juegan un papel dominante en el proceso de adsorción (Liu et al., 2017). En este caso, existe una inmovilización por adsorción de carácter no específico, ya que no existe evidencia de exista una orientación de la enzima hacia algún ligando sobre el soporte, es decir que la unión soporte-proteína se hace al azar.

### **2.3.5 Degradación de colorante a partir de lacasa inmovilizada en fibra de plátano**

En esta etapa se evaluó la eficiencia de la lacasa inmovilizada a partir de la degradación del colorante índigo carmín (IC). La Figura 2-8 muestra el avance de la degradación en el tiempo respecto al tipo de tratamiento en la fibra ( $FI_{LAC}$ ,  $FV_{LAC}$  y  $FM_{LAC}$ , FI), cada gráfica corresponde a una dosis de enzima (2, 4 o 6 U/mL de lacasa).

**Figura 2-8:** Degradación de colorante índigo carmín con lacasa inmovilizada sobre  $FI_{LAC}$   $FV_{LAC}$  y  $FM_{LAC}$ , FI. a) 2U/mL b) 4U/mL c). 6U/mL



En la Figura 2-8a) se usó la mínima dosis de lacasa inmovilizada, que corresponde a 2U/mL, luego de un lapso de 24h, la fibra tratada con Viscozyme removió el 100% del

colorante; esto demostró la efectividad del tratamiento hidrolítico. Además, las gráficas b) y c) confirman un porcentaje de degradación superior con el uso de  $FV_{LAC}$  comparado con la fibra sometida al tratamiento mecánico ( $FM_{LAC}$ ). Adicional a esto, a medida que se aumenta la dosis de lacasa, la efectividad en la degradación incrementa, la Figura 2-8c) confirma que luego de dos horas de  $FV_{LAC}$  en contacto con el índigo carmín, la degradación fue del 98.69% y en la Figura 2-8b) el 98.96% sucede en 4 horas. Esto demuestra una relación entre la dosis de lacasa y el porcentaje de degradación del IC.

En la Figura 2-8c) se observa que  $FI_{LAC}$  tiene un porcentaje de degradación de 98.81% luego de 10 horas en contacto con el colorante, y por su parte la  $FM_{LAC}$  después de 24 horas tuvo el 99.81%, esto es consecuente con los resultados obtenidos en el rendimiento de la inmovilización (sección 2.2.4), ya que el los porcentajes para FI y FM son de IY son 16.59% y 8.50%, respectivamente con una dosis de lacasa de 6U/mL.

Por otra parte, las fibras sin la inmovilización también actúan para la remoción del índigo carmín (Syazwani et al., 2018). La línea amarilla corresponde al comportamiento de la fibra inicial sin inmovilización (FI), esto con el fin de identificar el porcentaje de colorante que es adsorbido físicamente por la fibra, que corresponde al 24.25%, valor que se mantuvo constante durante las 24h que duró el ensayo.

La degradación de color realizada por la lacasa ocurre por un proceso de oxido reducción que es la vía catalítica de este tipo de enzimas, a través del cual ocurre la degradación de la molécula y por lo tanto la eliminación o remoción del color, en el capítulo 3 se explicará detalladamente el mecanismo teórico.

La remoción y degradación de colorante ocurre por varios fenómenos: la adsorción física fibra-colorante, la catálisis de la molécula de IC por la lacasa, y la sinergia de estos dos (Zhou et al., 2021). Respecto al primer fenómeno, una de las características del IC es que tiene alta solubilidad en agua lo cual permite una concentración homogénea por toda la solución (40 ppm) y por lo tanto acceso a todas las regiones de la fibra, sin embargo, la estructura química del colorante le otorga una carga neta negativa y debido a que la fibra acumula una carga igual en la superficie, se repelen (Abdelileh et al., 2019), por esta razón el porcentaje de adsorción del colorante puede ser bajo.

Acorde a lo anterior, el resultado de la degradación se alude en su mayoría a las lacasas inmovilizadas. La interacción multipunto entre las lacasas y el soporte, reduce la flexibilidad conformacional de la lacasa inmovilizada y limita el cambio conformacional, esta es una ventaja de la inmovilización. Respecto a la dosis, la eficiencia de eliminación de colorante aumentó con la cantidad de dosis de enzima, sin embargo, la una cantidad excesiva de la lacasa en el soporte puede causar la formación de ácido estérico intermolecular que conduce al hacinamiento de lacasas y la pérdida de actividad, inhibir la interacción de sustratos y productos, e incluso reducir el área de contacto, por lo tanto, la eficiencia de remoción de IC puede disminuir (Goud et al., 2020).

Se puede agregar un tercer fenómeno que estimula la degradación, relacionado con el desprendimiento de las enzimas a causa de la agitación constante y las débiles uniones que existen entre la fibra y el soporte, es decir la enzima libre en contacto con el colorante, esto no fue determinado, sin embargo, para evaluar la eficiencia de las lacasas, se realizó un segundo ciclo de degradación con  $\text{FV}_{\text{LAC}}$ , con 4 U/mL, el resultado fue de  $25.26\% \pm 1.64$  a 24 h, que a pesar de ser bajo, es evidencia de la presencia de lacasas sobre la fibra.

Finalmente, se midió el porcentaje de actividad residual que reúne la cantidad de enzima que queda en el sobrenadante de la inmovilización y de los lavados. Para usar la enzima remanente en otro proceso de inmovilización, sería fundamental comprobar que la enzima es activa y estable en las condiciones de inmovilización.

---

## 2.4 Conclusiones

Los pretratamientos sobre la fibra se realizan con el fin de modificar la superficie para obtener mayor densidad de puntos de contacto con la lacasa y disponer de ellos en la inmovilización. La modificación de polímeros de origen lignocelulósico vía enzimática es más seguro y beneficioso que los métodos químicos, debido a la alta especificidad de reacción de las enzimas hidrolíticas.

Las condiciones de operación menos nocivas con el ambiente y las transformaciones no destructivas que se generan en la superficie del polímero permiten aumentar la afinidad de la fibra tratada enzimáticamente con la enzima lacasa y esto se refleja en un rendimiento de inmovilización del 56.4% con una dosis de 4U/L de lacasa.

Mediante el porcentaje de actividad relativa, se lograron determinar los parámetros de inmovilización, esto respecto a la temperatura, pH y tiempo, los cuales garanticen la estabilidad de la enzima durante el periodo en contacto con la fibra. A 5 °C la enzima puede conservar su estructura inflexible, con menos interacciones con los residuos de los aminoácidos, dado el rigén fúngico de la enzima el pH de 8 garantiza la estabilidad y 24 horas de tiempo de contacto son suficientes para la inmovilización.

Respecto a la degradación, el mejor porcentaje de degradación se obtuvo con 6 U/mL de lacasa inmovilizada en fibra tratada por Viscozyme, ya que en 2 horas se obtuvo el 98.96%, sin embargo, se eligió como la dosis óptima 4U/mL, ya que se reduce la inversión de la enzima y se alcanza un porcentaje del 98.97% en 4 horas.

## Bibliografía

Abdelileh, M., Ticha, M. Ben, Moussa, I., & Meksi, N. (2019). Pretreatment optimization process of cotton to overcome the limits of its dyeability with indigo carmine. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 25(3), 277–288. <https://doi.org/10.2298/CICEQ181115006A>

Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39, 23–39.

Baltierra-Trejo, E., Márquez-Benavides, L., & Sánchez-Yáñez, J. M. (2015). Inconsistencies and ambiguities in calculating enzyme activity: The case of laccase. *Journal of Microbiological Methods*, 119, 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.10.007>

Brandi, P., D'Annibale, A., Galli, C., Gentili, P., & Pontes, A. S. N. (2006). In search for practical advantages from the immobilisation of an enzyme: the case of laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 41(1–2), 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.04.012>

Cano, M., Solis, M., Diaz, J., Solis, A., Loera, O., & Teutli, M. M. (2011). Biotransformation of indigo carmine to isatin sulfonic acid by lyophilized mycelia from *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology*, 10(57), 12224–12231. <https://doi.org/10.5897/AJB11.944>

Castaño Urueña, J. D. (2014). *Optimización del proceso de producción, purificación y caracterización de una lacasa a partir de un hongo nativo con potencial aplicación en procesos biotecnológicos* [Universidad Nacional de Colombia]. <http://www.bdigital.unal.edu.co/45348/>

Cho, E. A., Seo, J., Lee, D. W., & Pan, J. G. (2011). Decolorization of indigo carmine by laccase displayed on *Bacillus subtilis* spores. *Enzyme and Microbial Technology*, 49(1), 100–104. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.03.005>

Çifçi, D. I., Atav, R., Güneş, Y., & Güneş, E. (2019). Determination of the color removal efficiency of laccase enzyme depending on dye class and chromophore. *Water Science and Technology*, 80(1), 134–143. <https://doi.org/10.2166/wst.2019.255>

Cristóvão, R. O., Tavares, A. P. M., Brígida, A. I., Loureiro, J. M., Boaventura, R. A. R., Macedo, E. A., & Coelho, M. A. Z. (2011). Immobilization of commercial laccase onto green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72(1–2), 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.04.014>

Da Silva, A. M., Tavares, A. P. M., Rocha, C. M. R., Cristóvão, R. O., Teixeira, J. A., & MacEdo, E. A. (2012). Immobilization of commercial laccase on spent grain. *Process Biochemistry*, 47(7), 1095–1101. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.03.021>

El-Roz, M., Haidar, Z., Lakiss, L., Toufaily, J., & Thibault-Starzyk, F. (2013). Immobilization of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on natural *Luffa cylindrica* fibers for photocatalytic applications. *RSC Advances*, 3(10), 3438–3445. <https://doi.org/10.1039/c2ra22438k>

Fernández-Fernández, M. (2013). *Inmovilización de Lacasa: Métodos y Potenciales Aplicaciones Industriales* [Universidad de Vigo]. Tesis de doctorado

Fernández-Fernández, M., Sanromán, M. Á., & Moldes, D. (2013). Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1808–1825. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.02.013>

Giardina, P., & Faraco, V. (2010). Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 369–385. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0169-1>

Gomes, F. A., Silva, G. S., Pinatti, D. G., Conte, R. A., & De Castro, H. F. (2005). Wood cellulignin as an alternative matrix for enzyme immobilization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121, 255–268.

Goud, B. S., Cha, Lim, H., Koyyada, G., & Kim, H. (2020). Augmented Biodegradation of Textile Azo Dye Effluents by Plant Endophytes : A Sustainable , Eco - Friendly Alternative. *Current Microbiology*, 20, 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02202-0>

Jesionowski, T., Zdarta, J., & Krajewska, B. (2014). Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption*, 20, 801–821. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10450-014-9623-y](https://doi.org/10.1007/s10450-014-9623-y)



K.B, E., & S.G, G. (2010). Decolorization of Textile Effluent by Immobilized *Aspergillus terreus*. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 1(101), 101–103.

Kalia, S., Thakur, K., Celli, A., Kiechel, M. A., & Schauer, C. L. (2013). Surface modification of plant fibers using environment friendly methods for their application in polymer composites, textile industry and antimicrobial activities: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 1(3), 97–112. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.04.009>

Kim, Y., Cho, N. S., Eom, T. J., & Shin, W. (2002). Purification and characterization of a laccase from *Cerrena unicolor* and its reactivity in lignin degradation. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 23(7), 985–989. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2002.23.7.985>

Legerská, B., Chmelová, D., & Ondrejovič, M. (2016). Degradation of synthetic dyes by laccases - A mini-review. *Nova Biotechnologica et Chimica*, 15(1), 90–106. <https://doi.org/10.1515/nbec-2016-0010>

Li, H., Zhang, R., Tang, L., Zhang, J., & Mao, Z. (2015). Manganese peroxidase production from cassava residue by *Phanerochaete chrysosporium* in solid state fermentation and its decolorization of indigo carmine. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 23(1), 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2014.11.001>

Liu, J., Xie, Y., Peng, C., Yu, G., & Zhou, J. (2017). Molecular Understanding of Laccase Adsorption on Charged Self- Assembled Monolayers. *The Journal of Physical Chemistry*, 121, 10610–10617.

López-Gallego, F., Guisán, J. M., & Betancor, L. (2013). Glutaraldehyde-mediated protein immobilization. *Methods in Molecular Biology*, 1051, 33–41.

Luxbacher, T. (2020). Electrokinetic properties of natural fibres. In W. Publishing (Ed.), *Handbook of Natural Fibres* (pp. 323–353). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818782-1.00009-2>

Michniewicz, A., Ledakowicz, S., Ullrich, R., & Hofrichter, M. (2008). Kinetics of the enzymatic decolorization of textile dyes by laccase from *Cerrena unicolor*. *Dyes and Pigments*, 77, 295–302. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2007.05.015>

---

Michniewicz, A., Ullrich, R., Ledakowicz, S., & Hofrichter, M. (2006). The white-rot fungus *Cerrena unicolor* strain 137 produces two laccase isoforms with different physico-chemical and catalytic properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(6), 682–688. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0015-9>

Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., & Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 29(2), 205–220. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>

Polak, J., & Jarosz-Wilkolazka, A. (2012). Fungal laccases as green catalysts for dye synthesis. *Process Biochemistry*, 47(9), 1295–1307. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.05.006>

Pucci, F., & Rooman, M. (2017). Physical and molecular bases of protein thermal stability and cold adaptation. *Current Opinion in Structural Biology*, 42, 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.12.007>

Ren, S., Li, C., Jiao, X., Jia, S., Jiang, Y., Bilal, M., & Cui, J. (2019). Recent progress in multienzymes co-immobilization and multienzyme system applications. *Chemical Engineering Journal*, 373(February), 1254–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.05.141>

Ribitsch, V., K, S.-K., & Jeler, S. (1996). The influence of classical and enzymatic treatment on the surface charge of cellulose fibres. *Colloid and Polymer Science*, 394, 388–394.

Rodríguez-Delgado, M. M., Alemán-Nava, G. S., Rodríguez-Delgado, J. M., Dieck-Assad, G., Martínez-Chapa, S. O., Barceló, D., & Parra, R. (2015). Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 74, 21–45. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.008>

Sharma, P., Goel, R., & Capalash, N. (2007). Bacterial laccases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(6), 823–832. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9305-3>

Sheldon, R. A. (2007). Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 349(8–9), 1289–1307. <https://doi.org/10.1002/adsc.200700082>

Silva, D. F., Carvalho, A. F. A., Shinya, T. Y., Mazali, G. S., & Herculano, R. D. (2017). Recycle of Immobilized Endocellulases in Different Conditions for Cellulose Hydrolysis. *Enzyme Research*, 2017, 18. <https://doi.org/10.1155/2017/4362704>

Syazwani, N., Rahman, A., Firdaus, M., & Baharin, Y. (2018). Utilisation of natural cellulose fibres in wastewater treatment. *Cellulose*, 121–131. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1935-8>

Varghese, A. M., & Mittal, V. (2017). Surface modification of natural fibers. In *Biodegradable and Biocompatible Polymer Composites: Processing, Properties and Applications*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100970-3.00005-5>

Wang, S.-S., Ning, Y.-J., Wang, S.-N., Zhang, J., Zhang, G.-Q., & Chen, Q.-J. (2016). Purification, characterization, and cloning of an extracellular laccase with potent dye decolorizing ability from white rot fungus *Cerrena unicolor* GSM-01. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 920–927. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.079>

Yang, J., Ng, T. B., Lin, J., & Ye, X. (2015). A novel laccase from basidiomycete *Cerrena* sp.: Cloning, heterologous expression, and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 77, 344–349. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.028>

Zhou, W., Zhang, W., & Cai, Y. (2021). Laccase immobilization for water purification: A comprehensive review. *Chemical Engineering Journal*, 403(July 2020), 126–272. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126272>

## **3. Mecanismo teórico de remoción del colorante Índigo Carmín**

### **3.1 Introducción**

El Índigo Carmín (en adelante IC) es un colorante sintético, ampliamente usado en el sector textil, alimentario, cosmético y de salud, que cuenta entre sus funciones el uso como indicador rédox en química analítica y como indicador de viabilidad celular en biología (Chowdhury et al., 2020); sin embargo, el uso más extendido del IC es el teñido de jeans y otros tipos de textiles.

Por otro lado, con relación a características de estructura química, el IC se clasifica como colorante tipo azo, por la presencia del doble enlace en el cromóforo denominado *indigoide*: éste incluye dos anillos aril con un sistema de electrones deslocalizados (Roshan et al., 2001), que abren una ruta hacia la eficacia en la reactividad del compuesto gracias a propiedades químicas aprovechables en tecnologías de teñido, tales como índice de color, capacidad de adherencia y producción de nuevas moléculas complejas, entre otras (Zaharia & Suteu, 2012).

Este capítulo expone una revisión bibliográfica de las propiedades y las principales reacciones que desencadenan procesos específicos de remoción del IC, además de una descripción teórica de los mecanismos de reacción que se llevan a cabo con métodos físicos, químicos, electroquímicos, para explicar el fenómeno de remoción de color ejecutado por las nanopartículas de  $MnO_2$  y por la enzima lacasa, y el análisis de los principales productos de degradación del IC.

### **3.2 Clasificación de colorantes**

Existen múltiples sistemas de clasificación de colorantes, la más general abarca dos tipos: los naturales y sintéticos; estos últimos, a nivel químico se clasifican principalmente por la

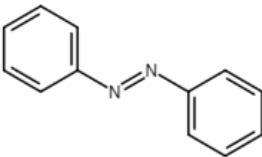
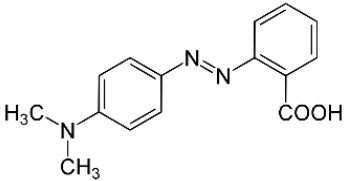
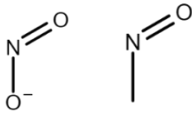
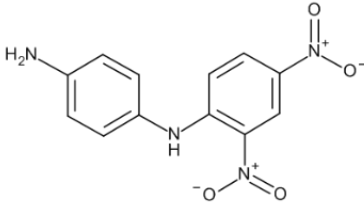
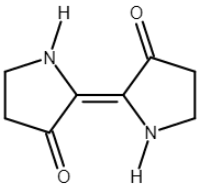
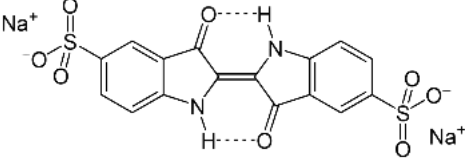
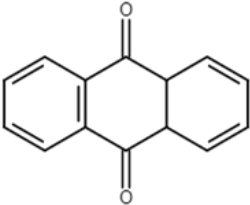
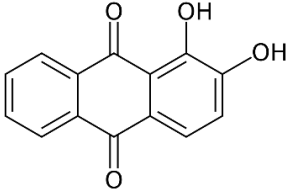
identificación del cromóforo, molécula en la estructura química del colorante con alta densidad electrónica, que absorbe luz y esta energía se expresa en longitudes de onda que caen en el espectro visible, es decir, refleja color (Marras, 2014). Los colorantes sintéticos también se han clasificado respecto a la metodología de aplicación y fijación del colorante sobre los tejidos, papeles o fibra; en este aspecto, la energía involucrada en las transiciones electrónicas en el momento de la fijación se relaciona con la estructura cromogénica del colorante que además del grupo cromóforo, comprende el auxocromo y otros grupos auxiliares, involucrados en la transferencia del color (Gregory, 1990).

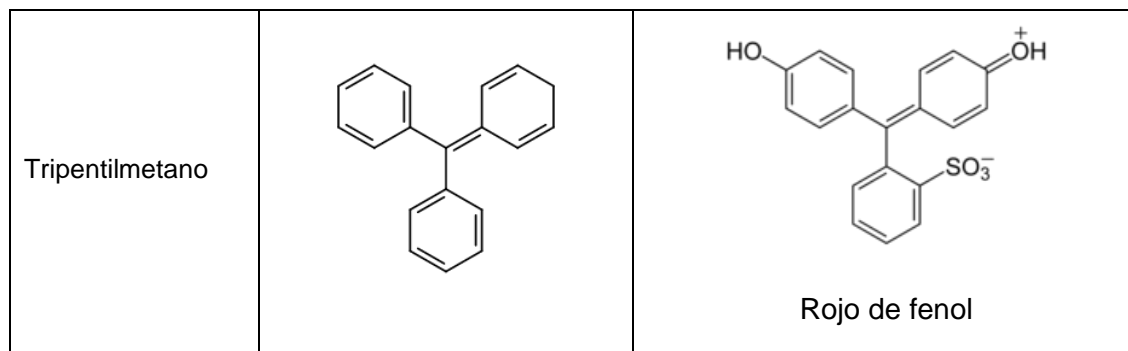
Por otro lado, con relación al tipo de aplicación y tinción del colorante se han definido categorías como la *coloración directa*, en la cual la tintura se adhiere a las fibras por interacciones electrostáticas y tiene especial afinidad por las fibras celulósicas. En esta categoría se incluyen colorantes como Rojo Congo e Índigo Carmín Teniendo en cuenta que la variedad de fibras es diversa, dentro de esta categoría se incluyen colorantes ácidos, básicos y otros que presentan estructuras con capacidad de adaptarse paralelamente incluso a fibras proteicas; sin embargo, muchos de ellos pueden tener limitada resistencia al lavado, por lo que requerirán obligatoriamente de un postratamiento para su fijación. Adicionalmente, se puede referir el caso de los colorantes mordentados, que carecen de la capacidad de transmitir color a menos que se realice un tratamiento específico de sales metálicas solubles sobre una fibra determinada (como en el caso de gran parte de extractos de plantas y flores que se utilizan para dar color) (Benkhaya et al., 2017).

Por otra parte, también se pueden reseñar los colorantes dispersos y transferidos, colorantes reactivos y tipo VAT o tina, otros clasificados respecto al tipo de reducción y la categoría de los pigmentos. Respecto a lo anterior, si se toma en cuenta el proceso de reducción, debe recordarse la existencia de colorantes naturales insolubles obtenidos desde el tratamiento de especies vegetales o animales y que, a pesar de presentarse inicialmente como soluciones incoloras asociadas con agentes reductores, ofrecen color tras su aplicación a las fibras y un proceso de oxidación (Marras, 2014). Finalmente, la categoría de pigmentos está compuesta por minerales insolubles, que en principio no ofrecen color de manera directa, pero pueden ser utilizados como tinturas tras ser mezclados con agentes adhesivos, como resinas o diversos tipos de pegamentos líquidos.

Con relación a su composición química, los colorantes se agrupan de acuerdo con la presencia de grupos funcionales específicos responsables de la absorción, denominados grupos cromóforos; en la Tabla 3-1 se presentan algunos colorantes relacionados con la estructura química del cromóforo.

Tabla 3-1. Clasificación de algunos colorantes según el cromóforo

| Cromóforo      | Estructura química  | Ejemplo colorante   |
|----------------|---|---|
| Azo            |    |  <p data-bbox="1049 877 1235 909">Rojo de metilo</p>          |
| Nitro, nitroso |  |  <p data-bbox="1008 1192 1276 1224">Amarillo disperso 14</p> |
| Indigo         |  |  <p data-bbox="1049 1461 1235 1493">Índigo Carmín</p>       |
| Antraquinonas  |  |  <p data-bbox="1084 1766 1203 1797">Alizarina</p>          |



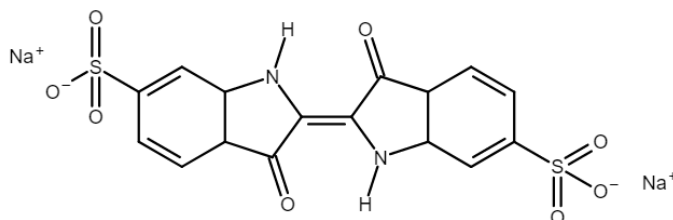
Fuente: Benkhaya et al., 2020

### 3.3 Características del Índigo Carmín

El Índigo Carmín, con nomenclatura IUPAC 3,3-dioxo-2,2-bi-indolilideno-5,5-disulfonato disódico, se presenta como un polvo oscuro producido por síntesis química (no es posible su obtención de manera natural), cuyo uso más generalizado es el teñido de materiales tejidos (Vasco, 2014). Hace parte de los colorantes *indigo*, derivados de la familia de colorantes *azóicos* o *azo* anteriormente mencionada (Tabla 3-1), por la presencia de un doble enlace en el cromóforo denominado *indigoide* con dos anillos aril y un sistema de electrones deslocalizados.

Su fórmula química es  $C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$ , y cuenta con una masa molecular de 466.301 g/mol; su estructura química se expone en la Figura 3-1. Este compuesto ha sido clasificado como una colorante tina y que se caracteriza por la insolubilidad en agua, por lo tanto su fijación se realiza por métodos rédox; y una particularidad de en el proceso de teñido con IC, es que no hay una fijación del 100% por lo tanto se estima que en los procesos de coloración de fibras aproximadamente entre el 10 y 50% de los colorantes se pierde y termina en efluentes (Chequer et al., 2013).

Entre las características técnicas del IC se pueden listar su alto punto de fusión (390-392 °C), su poderosa fuerza de cohesión intramolecular, que se indica en la Figura 3-1, conferida por la presencia de puentes de hidrógeno que otorga al compuesto resistencia a la solubilidad en agua, pero pierde resistencia ante disolventes como ácido sulfúrico concentrado, cloroformo o nitrobencono (Vidya Lekshmi et al., 2018).

**Figura 3-1:** Estructura química del Índigo Carmín

La producción de IC se deriva de una de las tinturas de uso más extendido a lo largo de la historia de la humanidad, el Índigo Azul, que en principio fue obtenido a partir de diferentes extractos de plantas (Marras, 2014), más tarde, la propuesta inicial para su síntesis fue realizada por Von Baeyer a través de la reacción que lleva su nombre (Reacción de Baeyer-Drewson), haciendo uso de o-nitrobenzaldehído, acetona y una mezcla de hidróxido de sodio, de bario y amonio incluyendo un proceso de hidrólisis, donde se generan subproductos, que en presencia de oxígeno y luego de una sulfonación producen índigo carmín o 5,5'-ácido índigo disulfónico (Fernelius & Renfrew, 1881).

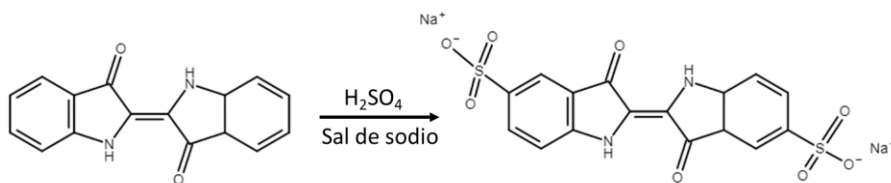
**Figura 3-2:** Síntesis de índigo Carmín

Imagen tomada de Quintero et al., (2010), Babak et al., (2016)

### 3.3.1 Usos y aplicaciones

El IC tiene diversos usos a nivel mundial, pero la mayor demanda proviene de la industria manufacturera para el teñido de jeans, principalmente por su comercialización a bajo costo, pureza y uniformidad; sin embargo, también la industria alimentaria y cosmética usan este colorante para el desarrollo de diferentes productos (García, 2016). En medicina, en las



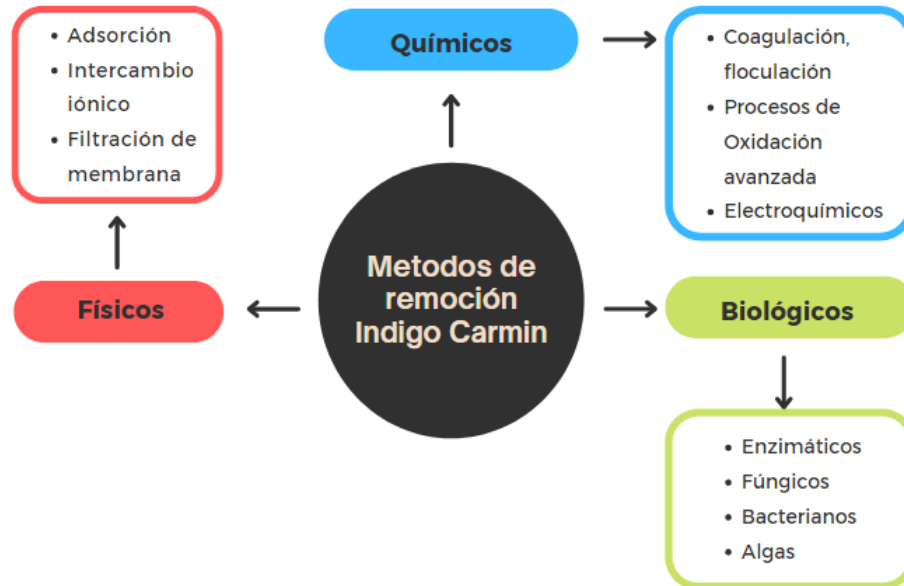
especialidades de gineco obstetricia, las soluciones de IC son generalmente usadas para detectar filtraciones de fluidos de amoniaco; en urología, la solución de IC permite resaltar algunas áreas del tracto urinario por su facilidad de filtrado en la sangre proveniente de los riñones, permitiendo establecer si hay filtraciones de orina al entrar en contacto con esta sustancia y teñirla de azul (Craick et al., 2009).

En general, el uso de los colorantes indigoides ha crecido sustancialmente en los últimos años, solamente en la industria alimenticia se consumen entre 40.000 y 50.000 toneladas, de las cuales el IC representa cerca del 3.7% de la producción total anual de colorantes alimenticios (Bernal, 2013). De acuerdo con las cifras de la revista especializada MarketWatch (2020), la producción mundial del IC es de 65.000 toneladas por año aproximadamente, siendo la industria de la moda el sector con mayor demanda. Los datos exhiben proyecciones del mercado de IC con tendencia a disminuir en los próximos años, debido a la creación de nuevos colorantes de origen natural con posibilidad de ofrecer menores efectos nocivos para el medio ambiente frente a las mismas ventajas de coloración.

### **3.4 Mecanismos de remoción del Índigo Carmín**

Cuando se habla de la reactividad de una molécula, se trata de su capacidad para reaccionar químicamente por sí sola o en compañía de más reactivos, liberando energía y generando uno o más productos, la reacción ocurre generalmente en la dirección hacia la producción de moléculas más estables, con un nivel de energía menor. Acorde a esto se desarrollan las rutas para la remoción o degradación del Índigo carmín, que dependen de diversos factores ambientales, pero principalmente de los sustratos y técnicas que se empleen en el proceso.

Los métodos de remoción de índigo carmín son diversos y fundamentalmente se clasifican en: químicos, físicos y biológicos como lo presenta la Figura 3-3. En los primeros, se han encontrado investigaciones de procesos de oxidación avanzada y electroquímicos, los métodos físicos abarcan filtración de membrana, el uso de adsorbentes y el intercambio iónico; y por su parte algunas enzimas, hongos, algas y bacterias también se han encargado de la remoción de este colorante por rutas más verdes.

**Figura 3-3:** Clasificación de métodos de remoción de índigo carmín

El método que más encuentra en la literatura es el proceso de oxidación de IC, donde se produce *isatina* y *ácido sulfónico isatina* como metabolitos tras la escisión del doble enlace C=C y la formación de un grupo carbonilo C=O. En la última década, los Procesos Avanzados de Oxidación (en adelante PAO) se han posicionado como una opción eficaz para degradar compuestos orgánicos tales como pesticidas, medicamentos y colorantes sintéticos. La ejecución de los PAO implica la aplicación de diversos métodos de producción de radicales OH en una solución acuosa, de manera que esta pueda resultar altamente efectiva para oxidar materia orgánica (Ruiz, 2011). Se ha demostrado que los PAO son eficaces para la destrucción de residuos tóxicos y de origen orgánico, incluyendo los colorantes, con ventajas de bajos costos, accesibilidad y facilidad para el desarrollo del proceso (Sayili et al., 2015). En los procesos de oxidación el mecanismo que opera es la división de los anillos aromáticos de las moléculas que componen los colorantes (Solís et al., 2016). Se debe tener en cuenta que los PAO tienen efectos positivos en la remoción de los tintes, pero pueden conllevar igualmente efectos nocivos como la generación de grandes cantidades de lodo, formación de productos tóxicos y altos costos de energía y químicos (Vikrant et al., 2018).

Para las reacciones electroquímicas, los electrones son reactivos principales, son quienes median la degradación de las sustancias orgánicas sin que se presenten residuos contaminantes; los procesos por los cuales estas reacciones tienen efecto se producen en dos vías: electrólisis directa y electrólisis indirecta. En el caso de la electrólisis directa, la oxidación tiene lugar en la superficie del electrodo, la reacción química se da por determinadas especies oxidantes generadas por el ánodo con fuerte actividad catalítica; en este caso los factores que influyen en la velocidad de oxidación son la actividad del electrodo, la velocidad de difusión de los contaminantes y la densidad de la corriente. Por el contrario, en la electrólisis indirecta la oxidación se presenta de manera continua en la solución, a través del mediador en la superficie anódica; aquí los factores a tener en cuenta para la velocidad de la oxidación serán la temperatura, el pH y la velocidad de difusión de los oxidantes generados (Gogate & Pandit, 2004).

Por otro lado, las investigaciones con métodos físicos de degradación han experimentado con materiales adsorbentes provenientes de residuos, destacados por su facilidad de operación, versatilidad, economía y diseño sencillo, considerados como los posibles sustitutos del carbón activado, generalmente utilizado para el tratamiento de aguas contaminadas con colorantes (Torres 2015). Las cáscaras de nuez de Brasil se estudiaron como un bioadsorbente de bajo costo usado para eliminar IC presente en aguas residuales, el resultado fue que un arreglo estructural poroso lignocelulósico que permite interrelacionarse con los grupos funcionales del colorante con una adsorción de 1.09 mg/g de IC a temperatura ambiente (De Oliveira et al., 2010).

Existen también algunos microorganismos, como bacterias, algunas algas, pero principalmente hongos filamentosos que degradan los tintes más eficazmente que otros microorganismos debido a la presencia de enzimas lignolíticas, como lacasa y peroxidasa, implicadas en la degradación del colorante (Choi, 2021). Los sistemas fúngicos son uno de los tratamientos biológicos más eficientes de los efluentes que contienen colorantes.

A continuación, en la Tabla 3-2 se reúnen algunos métodos hallados en la literatura, que con éxito llevaron a cabo el proceso de remoción de índigo carmín. En la tabla se hace una síntesis de los productos y la efectividad de la degradación según el tiempo y el porcentaje de remoción del colorante.

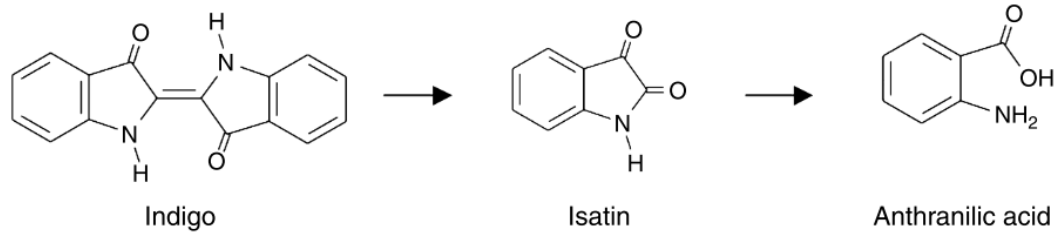
**Tabla 3-2:** Métodos realizados para remoción de Índigo Carmín

| Método   | Observaciones   | Remoción/tiempo | Metabolitos   | Referencia              |
|--|---|-----------------|---|-------------------------|
| Tratamiento biológico, <i>Bacillus sp.</i> MZS10   | Degradación ejecutada por enzima quinona deshidrogenasa dependiente de NADPH                                | 87.31% / 15h    | ácido indolinsulfónico  | (H. X. Li et al., 2015) |
| Enzimas de <i>Trametes versicolor</i> liofilizafas | Se usa micelio liofilizado en un reactor  | 100% / 120h     | ácido isatina 5-sulfónico   | (Cano et al., 2011)     |
| Degradación electroquímica                         | Se usa un ánodo de diamante dopado de boro a pH 10 o pH 3   | 100% / 120 min  | indigo, ácido isatina 5-sulfónico, ácido oxálico y oxámico  | (Ammar et al., 2006)    |
| Manganeso peroxidasa                               | Fermentación en estado sólido   | 90.18% / 6h     | isatina, compuestos aromáticos  | (H. Li et al., 2015)    |
| Proceso avanzado de Oxidacion                      | Solución de índigo carmín tratada con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /yoduro | 100% / 60min    | Ácido 2,3-dioxo-1H-indol-5-sulfónico, ácido 2-amino-a-oxo-5-sulfo-bencenoacético y ácido 2-amino-5-sulfo-benzoico | (Dalmázio et al., 2007) |
| Sonolisis + ozonización                            | Se usan varios métodos de remoción como fotocatalisis, sonolisis, ozonización y sistemas combinados.        | 100% / 6 min    | Isatina   | (Solís et al., 2016)    |
| Bacteria <i>Paenibacillus larvae</i>               | Condiciones de temperatura y ph óptimos de la bacteria  | 100% / 8h       | Isatina, ácido sulfónico, ácido antranílico.  | (Ramya et al., 2008)    |
| Lacasa extraída de hongo de podredumbre blanca     | Fermentación a pH5, por 12 días agitación constante   | 100% / 12 días  | Ácido isatin sulfónico, descompuesto a ácido antranílico  | (Mishra et al., 2011)   |

**Tabla 3-2:** (Continuación)

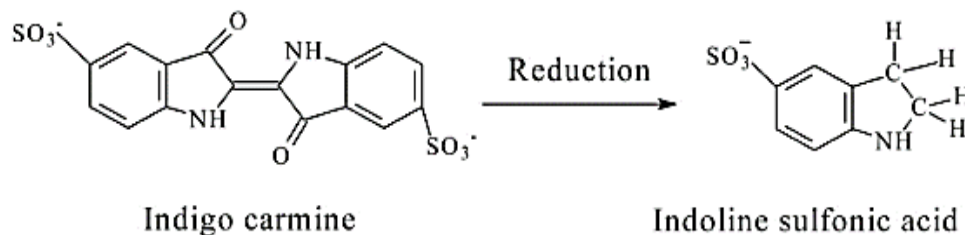
|  |  |               |  |                                |
|--|--|---------------|--|--------------------------------|
| Phormidium<br>autumnale<br>UTEX1580            | Cianobacterias en<br>fermentación en estado<br>sólido          | 91% / 17 días | Acido antranílico,<br>isatina  | (Dellamatrice et<br>al., 2016) |
| Lacasa de<br><i>Trametes</i><br><i>hirsuta</i> | Uso de mediadores  | 31% / 24h     | isatina (indol-2,3-<br>diona), ácido<br>antranílico (ácido<br>2-<br>aminobenzoico) | (Campos et al.,<br>2001)       |
| <i>Phanerochaete</i><br><i>Chrysosporium</i>   | Producción de<br>Manganeso<br>peroxidasas en estado<br>sólido. | 98.18% / 6h   | Isatina  | (H. Li et al.,<br>2015)        |

En la tabla anterior se incluyeron algunos métodos biológicos que, por su parte, han estimulado la conciencia ambiental y por lo tanto las investigaciones sobre el teñido y los tratamientos biológicos de efluentes contaminados. En los estudios realizados por Dellamatrice et al., (2016), el crecimiento del lodo de cianobacterias fue lento, los resultados demostraron que la degradación del IC solamente es detectable hasta el día 18, con posibilidad de observar la presencia de dos metabolitos identificados como *ácido antranílico* e *isatina*. Cabe resaltar que en el proceso de degradación del IC el primer paso es la oxidación de los enlaces centrales del índigo produciendo como residuo *isatina*; posteriormente, el proceso de degradación puede continuar mediante una hidrólisis y pérdida de grupos carbonilo para producir *ácido antranílico* (como se observa en la Figura 3-4). Las cianobacterias *Phormidium*, mostraron la capacidad de degradar los colorantes presentes en un efluente textil, por lo que pueden ser utilizadas en un tratamiento terciario de efluentes con compuestos recalcitrantes, esta es una manera de integrar los tratamientos biológicos a los procesos que se desarrollan con los métodos tradicionales.

**Figura 3-4:** Degradación del Índigo Carmín a través de *phormidium*

Fuente: (Dellamatrice et al., 2016)

Mishra et al., (2011) demostraron la eficiencia de un proceso de remoción de color después de 12 días de fermentación con una lacasa, el tiempo prolongado se relaciona con la purificación de la enzima y el aumento de biomasa en el fermentador, la metodología no se utiliza ningún tipo de mediador que pueda optimizar el proceso que puede derivar en una alta inversión. Con respecto a otros mecanismos de acción sobre el colorante índigo carmin, (H. X. Li et al., 2015) sostienen que existen algunos métodos de reducción a través de algunas bacterias *Bacillus spp*, que tienen la capacidad de reducir el IC como se observa en la Figura 3-5. Los resultados demostraron que la capacidad de decoloración del tinte de *Bacillus sp.* MZS10 depende de la actividad de la enzima quinona deshidrogenasa dependiente de NADPH que puede reducir el doble enlace C=C a el doble enlace C=N. Por lo tanto, se especula que el mecanismo de decoloración del índigo carmín con *Bacillus sp.* MZS10 es un proceso que involucra la reducción de los dobles enlaces C=O y C=C del índigo carmín y la generación del enlace -CH condujo a la formación de ácido indolinsulfónico.

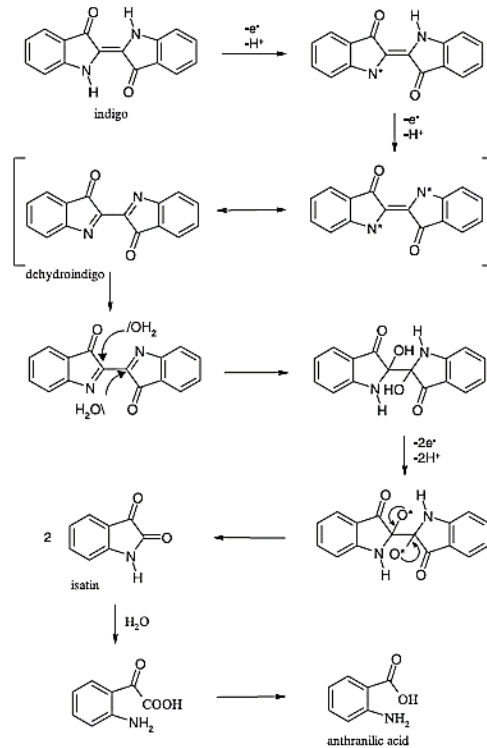
**Figura 3-5:** Mecanismo de degradación de índigo carmín por reducción por *Bacillus sp.* MZS10

Fuente: (H. X. Li et al., 2015)

Los métodos de degradación de IC con hongos de podredumbre blanca han inspirado el uso de residuos como sustratos para la producción de enzimas. Li et al., (2015 a) evaluaron la decoloración de colorantes poliméricos sulfonados utilizando *Phanerochaete Chrysosporium* para la producción de la enzima Manganese peroxidasa capaz de catalizar la oxidación de colorantes, con el fin de minimizar los costos de producción, usaron como sustrato residuos de yuca y comprobaron que la fermentación en estado sólido incrementa la producción enzimática, ya que, al estar sumergida, asemeja el hábitat natural de los hongos. Estas modificaciones en el proceso, brindaron resultados prometedores a la hora de la degradación, donde alcanzaron una tasa de decoloración del 90.18% después de 6 h de incubación del colorante índigo carmín con la enzima Manganese peroxidasa. El mecanismo descrito por los autores inicia cuando los grupos de ácido sulfónico y los grupos amino-aromáticos del IC se oxidan por catálisis de la enzima Manganese peroxidasa, luego, el compuesto oxidativo es fácilmente atacado por nucleófilos como las moléculas de agua. Finalmente, otro paso de oxidación degrada los productos para formar isatina ya que los compuestos fenólicos son oxidados por la extracción de hidrógeno y finalmente La isatina se mineraliza.

Otro tipo de biocatalizador frecuentemente utilizado para la decoloración es la lacasa, que tiene la capacidad de reaccionar con la molécula de IC. Campos et al., (2001), estudiaron la producción de esta enzima a partir de dos hongos de podredumbre blanca, después de la purificación, la particularidad de esta investigación fue que para la degradación usaron mediadores redox los cuales se unen a la enzima y optimizaron el tiempo de degradación hasta un 30%. Los autores demostraron que el mecanismo de degradación inicia cuando la enzima degrada el índigo y produce *isatina (indol-2,3-diona)* como intermedio, luego este se descompone en ácido antranílico (ácido 2-aminobenzoico) como producto de la oxidación final del índigo, este mecanismo se muestra en la Figura 3-6. La gran ventaja de estas enzimas es que pueden ser aplicables a nivel industrial debido a su alta actividad y estabilidad, sin embargo, la limitación crítica a gran escala de las lacasas es la necesidad de producción y separación de enzimas de alto rendimiento mientras se mantiene estable la actividad enzimática.

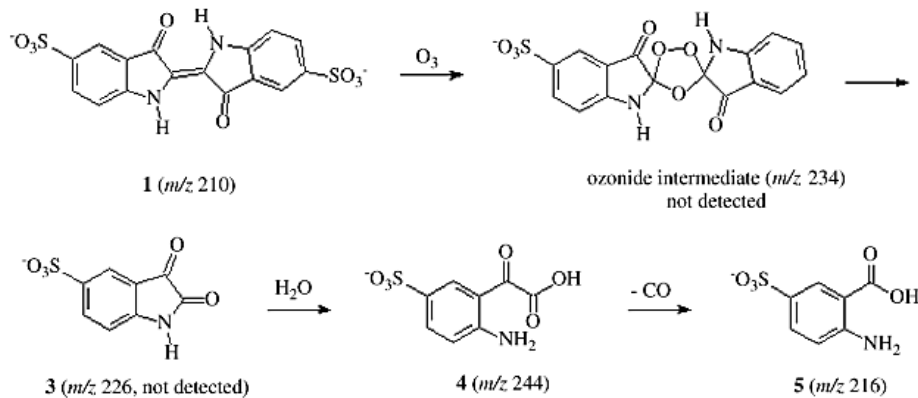
**Figura 3-6:** Mecanismo de degradación de índigo carmín catalizado por lacasa purificada del hongo *Trametes hirsuta*



Tomado de: (Campos et al., 2001)

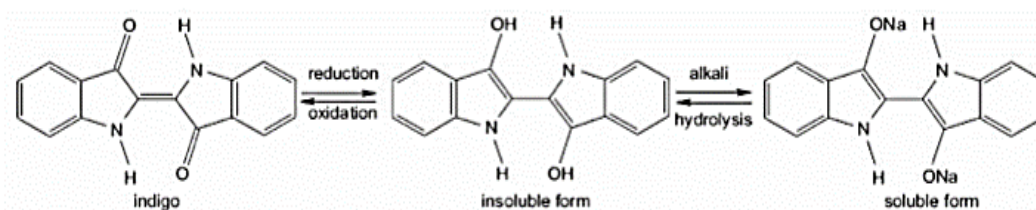
En contraste, en los Procesos de Oxidación Avanzada (POA) los agentes oxidantes actúan como catalizadores, este modo, el uso y la producción de radicales libres hidroxil ( $-OH$ ) va a aumentar la velocidad de reacción de diferentes maneras, en comparación con otros oxidantes sin presencia de catalizador (Jang & Park, 2014). De hecho, (Dalmázio et al., (2007) reportan resultados de la evaluación de un mecanismo de reacción para la catálisis heterogénea del tinte IC con  $H_2O_2$  como agente oxidante catalizada a través de diferentes complejos metálicos. De acuerdo con los resultados presentados por los autores, este proceso tuvo efectos positivos en los procesos de degradación del colorante porque permitió el rompimiento de los dobles enlaces de carbono  $C=C$ , provocando la formación de dos moléculas de *isatin ácido 5-sulfónico*. En este sentido, el tinte se mineraliza casi en su totalidad hasta  $CO_2$ , liberando además iones  $SO_4^{2-}$ ,  $NH_4^+$  y  $NO_3^-$ . Este proceso se puede apreciar en la Figura 3-7



**Figura 3-7:** Rompimiento de la molécula de Índigo Carmín tratada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/yoduro

Fuente: (Dalmázio et al., (2007))

Los procesos de oxidación avanzada tipo Fenton, han utilizado un catalizador (Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>), que tiene la capacidad de desasociar el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ Fe<sup>2+</sup>) a valores de pH ácidos (pH 2-3), promoviendo la producción de radicales hidroxilos con capacidad de digerir los compuestos orgánicos del IC. Desde el punto de vista químico, las reacciones de este tipo tienen lugar gracias a una transferencia de electrones entre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y un metal (por lo general de transición) que haría las veces de catalizador. El proceso de conversión del tinte por es una reacción heterogénea donde se realiza un proceso de difusión de las moléculas del agente reductor a la superficie de las partículas de tinte, solución del agente reductor y reacción química entre el tinte y el agente reductor en la superficie con la formación de compuestos leuco. Cabe destacar que el control del proceso de reducción se lleva a cabo por la medida del potencial rédox y que la cinética y la termodinámica de la oxidación-reducción pueden ser controladas (Duarte et al., 2018). En la Figura 3-8 se puede observar el mecanismo de reducción.

**Figura 3-8:** Mecanismo de reducción-oxidación del teñido del Índigo

Fuente: Tomado de (Khataee et al., 2009)

Otro tipo de degradación del colorante IC es a través de tratamientos físicos haciendo uso de métodos de adsorción que se basan en la afinidad de los tintes por este proceso. En este punto, es conveniente mencionar las investigaciones de Anjos et al., (2002) y Prado et al., (2004), que profundizaron en procesos de remoción de IC en biosorbentes y de procesos entrópicos y entálpicos favorables con estabilidad termodinámica; por el contrario, la *quitina* propició efectos entrópicos desfavorables, debido a que se careció de espontaneidad en los sistemas termodinámicos.

Ahora bien, para ahondar en los objetivos trazados, a continuación, se presenta una descripción teórica de las reacciones de degradación para IC que hacen uso de *enzima lacasa* y *nanopartículas de óxido de manganeso*, profundizando en los mecanismos objetivo de la presente investigación y a partir de los cuales se desarrolló la experimentación orientada a contrastar su efectividad para la desintegración de la molécula del colorante.

### 3.5 Reacción de Índigo Carmín con enzima lacasa

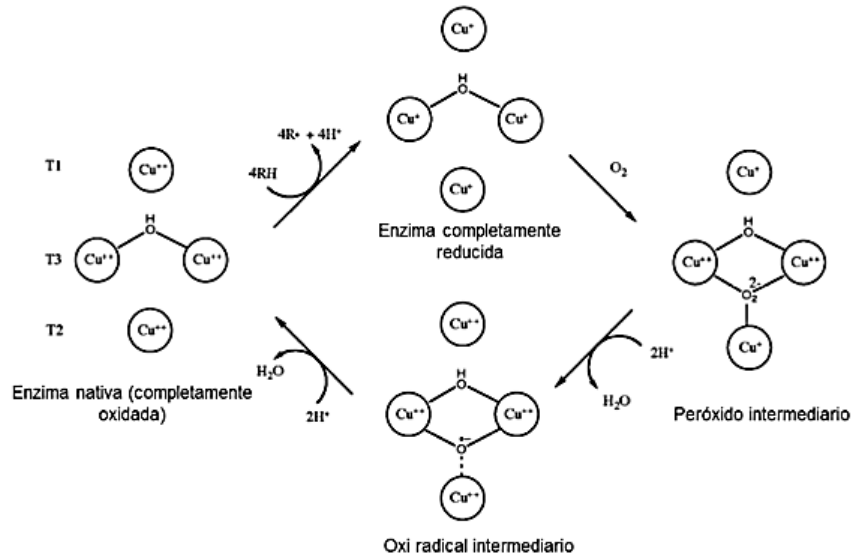
Las lacasas son enzimas del tipo fenoloxidasas producidas por casi todos los hongos de pudrición blanca. Poseen cuatro átomos de  $\text{Cu}^{2+}$  en estado de reposo, por eso se las denomina también enzimas multicobre oxidasas, una particularidad de es su baja especificidad al sustrato, lo cual permite que se involucren en la catálisis de diversas moléculas orgánicas y procesos como la degradación de colorantes.

El mecanismo de catálisis de las lacasas se observa en la Figura 3-9. La enzima debe tener un potencial de reducción ajustado que permita la reducir el  $\text{O}_2$  a agua. En el proceso

---

de oxidación catalizado por la lacasa, la enzima reacciona con cuatro moléculas de sustrato, involucrando una transferencia de 4 electrones al oxígeno molecular para reducirlo a agua.  $[4RH+O_2 \rightarrow 4R+2H_2O]$  (Castaño Urueña, 2014). Esta reacción se realiza en varios pasos, el primer paso es la reducción del sustrato reductor por el cobre ( $Cu^{2+}$  a  $Cu^+$ ) en el sitio T1, que es el principal aceptor de electrones, partiendo de la enzima oxidada. Los electrones extraídos del sustrato reductor se transfieren al sitio trinuclear T2/T3, lo que resulta en la conversión de la forma en reposo (completamente oxidada) de la enzima a un estado completamente reducido. Se requiere una oxidación  $4e^-$  sucesiva (a partir de cuatro moléculas de sustrato) para reducir completamente la enzima.

La molécula de dióxígeno se une primero al sitio T2/T3 y dos electrones se transfieren rápidamente desde los cobres T3, lo que da como resultado la formación de un peróxido intermedio y se forman puentes de peróxido entre los sitios de cobre T3 oxidado y T2 reducido, seguido de una rápida transferencia  $1e^-$  desde T1. El peróxido intermedio se descompone en un radical oxi y sufre una escisión reductora  $2e^-$  del enlace O–O con la liberación de una molécula de agua. Este intermediario se ve afectado por la transferencia final de electrones del cobre T2 y se acelera con la disminución del pH, con la protonación de un residuo de ácido carboxílico cerca del sitio activo (Wong, 2009). En el último paso, los cuatro centros de cobre se oxidan y se libera  $O^{2-}$  como una segunda molécula de agua. La reoxidación del cobre T2 se correlaciona con la descomposición del intermediario en el que se libera la primera molécula de agua y la segunda molécula de agua permanece unida e intercambiada lentamente con la solución donde se encuentra la enzima.

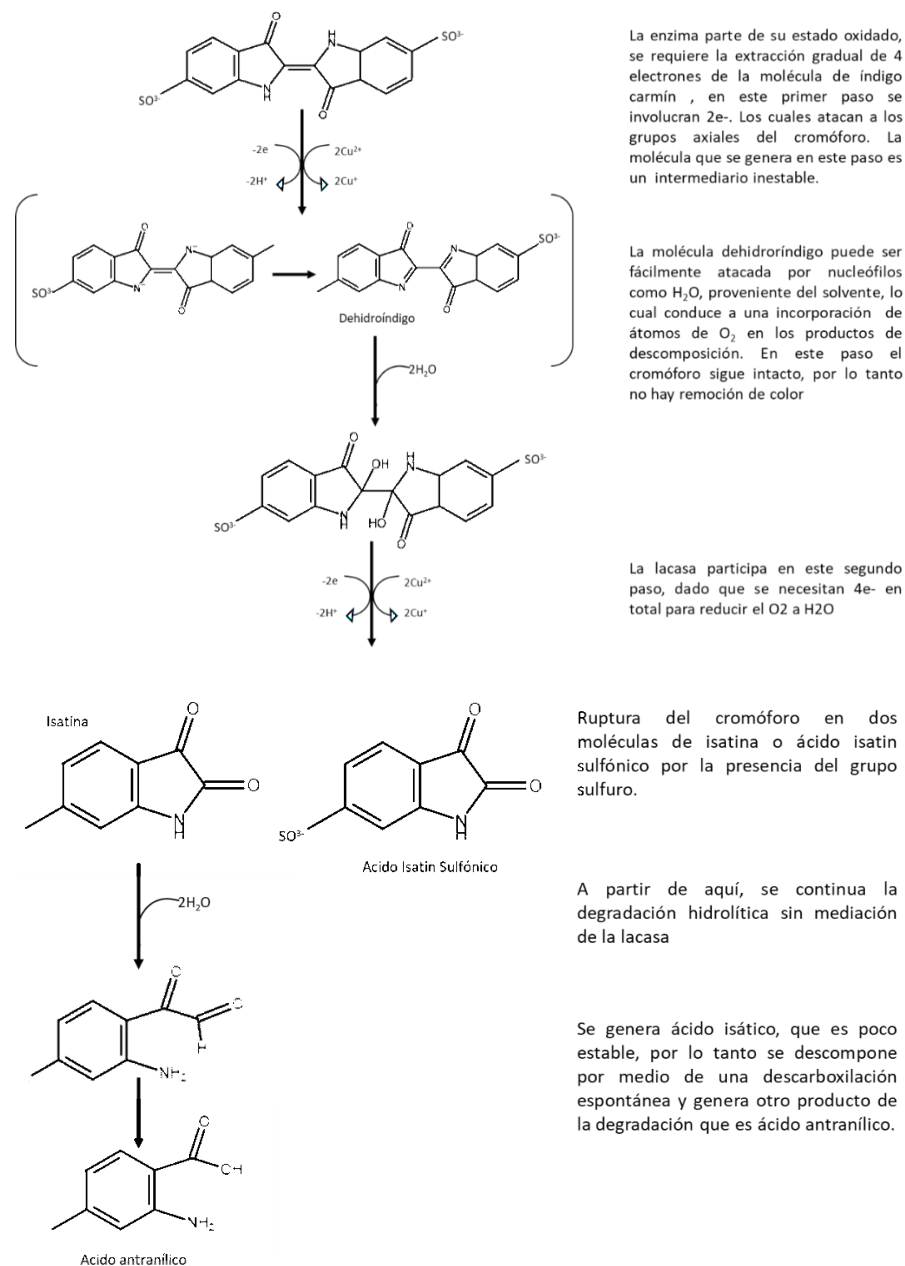
**Figura 3-9:** Ciclo catalítico de la lacasa

Fuente: Imagen modificada de (Jones & Solomon, 2015), (Wong, 2009)

Se debe tener en cuenta que algunas de estas reacciones pueden estar acompañadas de compuestos denominados mediadores, el objetivo de incluirlos en la reacción es incrementar el potencial redox, lo cual podría optimizar la reacción con el colorante. Entre ellos se destacan compuestos aromáticos como como ABTS (ácido 2,2-azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), HBT (N, N' bis-(1H-tetrazol-5-il)-hidrazina) y siringaldazina. Es relevante mencionar que el resultado del uso de mediadores, estará directamente relacionado con su concentración en la solución.

Concretamente, para el proceso de degradación del tinte IC con el uso de lacasa, como se menciona anteriormente, se requiere la extracción gradual de 4 electrones de la molécula de índigo carmín. Campos et al., (2001) sostienen que la transformación se puede llevar a cabo gracias a la transferencia de electrones de la lacasa para obtener *isatina*, para producir por descarboxilación un *ácido antranílico* como producto estable final de oxidación. En ese orden de ideas, la degradación procede vía *deshidroíndigo* como reacción intermedia, a continuación, en la Figura 3-10 se describen los pasos.

**Figura 3-10:** Posible ruta de degradación oxidativa para el tinte Índigo Carmín catalizada por la lacasa



Fuente: Imagen modificada de Choi, (2021), Campos et al., (2001)

En la Figura 3-10, es esencial mencionar que los estudios realizados por Choi, (2021), Campos et al., (2001) analizan la ruta de degradación del índigo y a pesar de la similitud con la molécula de Índigo Carmín, el compuesto sulfonado que acompaña a esta puede tener incidencia en los productos finales de degradación. Por esta razón, es que a partir de la ruptura del enlace C=C, se hace la distinción de dos productos; Isatina producto de la desulfonación de la molécula de Indigo Carmín y ácido Isatín sulfónico. Dado que el mecanismo es teórico, dicha desulfonación no se puede comprobar, sin embargo Goud et al.,(2020), demuestran mecanismos sobre colorantes azo catalizados por lacasas, donde además de la desulfonación también hay una desaminación catalizada por las lacasas. En este sentido, Acido isatin sulfónico, isatina y ácido antranílico serían los posibles productos de degradación de IC catalizada por lacasa.

La isatina y sus derivados como el ácido isatin sulfónico han sido productos de interés ya que exhiben un amplio espectro de actividades biológicas (H. Li et al., 2014). La sección 3.3.1 menciona los múltiples usos de índigo carmín, entre ellos el uso en la medicina, si bien en este estudio, el objetivo es degradar el colorante principalmente por las consecuencias medioambientales de las descargas en los cuerpos hídricos naturales, también se resalta la función del IC en la medicina, ya que permite colorear algunas áreas del cuerpo de interés clínico (Craick et al., 2009), por eso, la síntesis del colorante partiendo del ácido antranílico puede cerrar este ciclo mediante la reacción de Heumann usando el ácido antranílico como precursor (Stasiak et al., 2014).

Los resultados del presente estudio sugieren un enfoque biológico potencial para la producción de ácido isatin sulfónico y de isatina. Sin embargo, este ácido es un metabolito intermedio más que un producto final en el proceso de decoloración del índigo carmín con lacasa (H. Li et al., 2014). Por lo tanto, la biotransformación del ácido indolinsulfónico en productos finales debe investigarse más en el futuro.

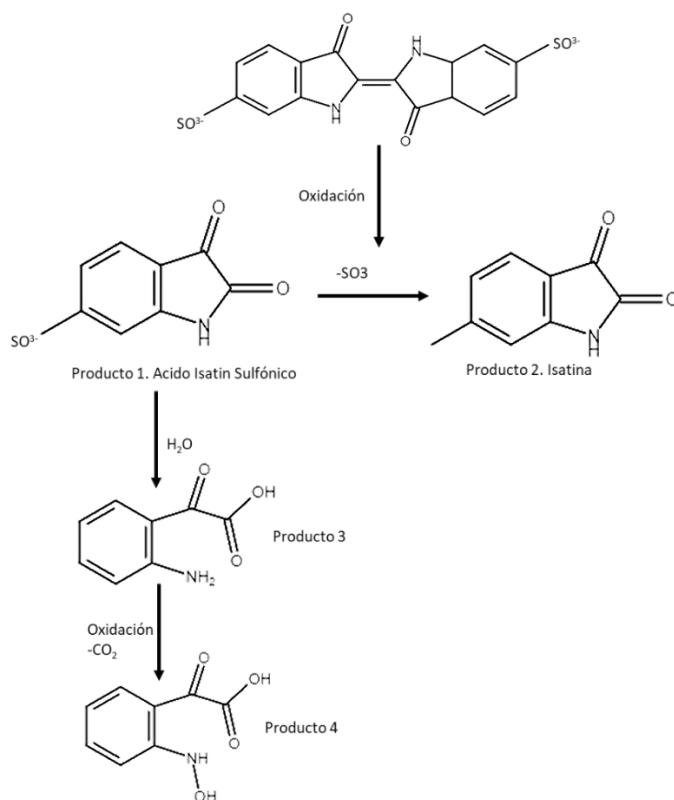
### **3.6 Reacción de Índigo Carmín con nanopartículas de óxido de manganeso**

El óxido de manganeso ( $MnO_2$ ) se ha identificado como un eficiente catalizador con facultad para degradar completamente pequeñas concentraciones de IC (Vidya Lekshmi

et al., 2018). Para los autores, los efectos del  $MnO_2$  tienen un efecto muy positivo en el IC cuando las concentraciones de este tinte están en el rango de 10-60 mg/L, lo que significaría que el efecto que tiene este componente es altamente positivo con bajas concentraciones, pero comienza a reducirse cuando la concentración aumenta.

En la Figura 3-11, se detalla la posible ruta de degradación del colorante basado en las investigaciones realizadas por Chacon et al., (2013), los autores exponen estos productos con respecto a las observaciones obtenidas en el análisis de ionización por electrospray con espectrometría de masas la cantidad de concentración de colorante es un elemento esencial para la efectividad de las nanopartículas de  $MnO_2$  en la degradación del IC. Sin embargo, en el capítulo 1 se concluye que es importante tener en cuenta otras variables, tales como el procedimiento de la catalización, el pH, la reacción de volumen, la frecuencia del ultrasonido utilizado, ya que son parámetros que igualmente podrían impactar en la efectividad del proceso y los productos (Vidya Lekshmi et al., 2018),

**Figura 3-11:** Posible ruta de degradación de Índigo Carmín usando  $MnO_2$



Se debe tener en cuenta que los efectos de los aniones en los procesos de degradación del IC varían desde la inhibición ( $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ), pasando por la no generación de efectos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ) o incluso la mejoría ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) en el proceso de degradación de acuerdo con las condiciones de la reacción y la naturaleza de la intensidad de las interacciones (Vidya Lekshmi et al., 2018).

### 3.7 Comparación de dos metodologías de remoción del índigo carmín

Para concluir el capítulo, en la Tabla 3-3 se realiza una comparación de las dos metodologías de remoción del colorante índigo carmín desarrolladas en esta investigación. Este compilado expone ventajas y desventajas que se recopilaron durante todo el proyecto.

**Tabla 3-3.** Características generales de la remoción de IC con nanopartículas de  $\text{MnO}_2$  sobre fibras de plátano y con lacasa inmovilizada sobre fibra de plátano.

|   | Ventajas  | Desventajas   |
|---|---|---|
| <b>Nanopartículas <math>\text{MnO}_2</math></b> | <p>La el porcentaje de remoción del colorante fue alto, 98%</p> <p>El tiempo de reacción para la ruptura del cromóforo y por lo tanto la remoción del color es rápida, se logró en 5 min.</p> <p>Es posible reutilizar la fibra con las nanopartículas para realizar hasta 10 ciclos de remoción de IC.</p> | <p>El permanganato de potasio se usa como precursor para la síntesis de las nanopartículas de <math>\text{MnO}_2</math>, aunque la concentración no es alta (50ppm), luego de la síntesis se debe descartar el reactivo químico excedente.</p> <p>La síntesis de nanopartículas se lleva a cabo por efecto de la cavitación generada en un ultrasonido, lo cual puede traducirse en un gasto energético alto.</p> |
| <b>Enzima Lacasa</b>                            | <p>El mayor porcentaje de degradación de índigo carmín fue de 98%</p> <p>La descarga química de los reactivos utilizados es y el buffer acetato se neutraliza para la descarga.</p> <p>Al ser un biocatalizador, la lacasa que no se une al soporte puede descartada</p>                                    | <p>El mayor porcentaje de degradación se logró en 2 horas.</p> <p>El proceso de inmovilización por adsorción lleva a cabo 24 horas a una temperatura de <math>5^\circ\text{C}</math>, lo cual se traduce en un gasto energético.</p> <p>Esta metodología puede incrementar los gastos, ya que</p>   |



---

|  |   |  |
|--|---|--|
|  | o reutilizada sin mayores consecuencias medioambientales. | requiere una inversión para la compra de la enzima Ecofade LT 100.<br><br>Debido a que las interacciones entre lacasa-fibra son débiles, no es viable reutilizar el sistema de inmovilización en posteriores ciclos de remoción. |
|--|---|--|

---

## Conclusiones

El colorante índigo carmín ha sido ampliamente usado por diversas industrias, principalmente el sector textil y de alimentos, también en medicina se aprovechan sus propiedades para hacer seguimiento a enfermedades. El incremento del uso a nivel mundial ha dilatado una problemática ambiental relacionada con las descargas del colorante, ya que un porcentaje del tinte no se fija y se descarta. Para contrarrestar los efectos nocivos que acarrearán las descargas en los efluentes hídricos, se han dispuesto investigaciones con métodos de remoción.

Existen métodos químicos, físicos y biológicos que se han implementado para la degradación o remoción del índigo carmín. Los procesos más conocidos son los químicos a través de la oxidación, estos representan costos elevados, ya que limitaciones como la generación de lodos, alto gasto de energía y generación de residuos tóxicos, incrementan el presupuesto para el uso a nivel industrial. Frente a los mecanismos tradicionales de degradación, se han posicionado las técnicas que hacen uso de hongos de pudrición blanca que producen enzimas extracelulares como lacasas y manganeso peroxidasas que puede degradar los compuestos de estructura polifenólica como la de los colorantes sintéticos, y puede considerarse una alternativa potencial para el tratamiento de aguas residuales contaminadas por el índigo carmín y los procesos de decoloración, evitando así el uso sistemático de algunos químicos.

Luego de identificar las posibles rutas de degradación que sigue el colorante con las nanopartículas y con las lacasas, se identificaron los productos finales del mecanismo teórico. Al ser una oxidación en ambos casos, se detectaron según la literatura productos similares, los cuales fueron ácido isatin sulfónico e isatina, estas moléculas han demostrado su uso potencial como materia prima para antibióticos como la penicilina, productos farmacéuticos, saborizantes, herbicidas, y otros compuestos químicos.

## 4. Conclusiones y recomendaciones

### 4.1 Conclusiones

El uso de fibras naturales es una alternativa factible para generar un costo agregado en los residuos poscosecha del plátano, ya que provienen del pseudotallo. Esta investigación proporcionó un tratamiento enzimático con el uso de Viscozyme L al material vegetal, que demostró una modificación en la superficie de la fibra donde se observó el desprendimiento de láminas superficiales del material vegetal, gracias efecto hidrolítico. Esto favoreció la viabilidad de la fibra para usarla esta fibra como soporte para las nanopartículas de MnO<sub>2</sub> y para la inmovilización de la lacasa.

Por su parte, el interés de esta investigación hacia el enfoque en los colorantes y principalmente en índigo carmín se basa en la conceptualización algunas particularidades de este tinte como el uso en diversas industrias, pero particularmente demandado para la manufactura textil de blue jeans y demás productos de denim azul. Así también, se logró recopilar información de los múltiples esfuerzos que se han realizado para sobrellevar la contaminación que acarrea la mala disposición de este colorante, concluyendo que los dos métodos propuestos cumplen con la meta de la degradación, sin embargo, si se habla de efectividad, las fibras tratadas enzimáticamente junto con las nanopartículas de MnO<sub>2</sub> son una gran herramienta para los proceso de remoción, ya que además de lograr una degradación total del índigo carmín en 5 minutos, también permiten la reutilización del material por varios ciclos de degradación, lo cual permite tener expectativas hacia la elaboración de filtros elaborados con este material.

Investigar sobre el mecanismo que conduce a la degradación del índigo carmín, fue fundamental, ya que el objeto de esta tesis es determinar el efecto de dos metodologías de remoción que se perciben principalmente desde el costo económico y ambiental, con esto en mente, identificar los productos de degradación brinda una noción sobre la toxicidad de las moléculas que deja la descomposición del índigo carmín, que pueden involucrarse como materia prima en otros ciclos productivos.

## 4.2 Recomendaciones

La inmovilización de la enzima lacasa por adsorción sobre fibras de plátano pretratadas, cumple el objetivo de la degradación completa de la molécula índigo carmín y luego de identificar los mejores parámetros para la estabilidad de la enzima, se podría investigar otro tipo de métodos de inmovilización con el uso por ejemplo de agentes entrecruzantes que permitan uniones más fuertes con la fibra.

Para optimizar el tiempo de degradación del colorante, que cataliza la enzima lacasa, se puede usar mediadores naturales, que sean acordes con el enfoque bio de esta investigación.

Las nanopartículas soportadas sobre la fibra de plátano ofrecen una perspectiva hacia el desarrollo de filtros para la degradación de colorantes.

---

## Bibliografía

Ammar, S., Abdelhedi, R., Flox, C., Arias, C., & Brillas, E. (2006). Electrochemical degradation of the dye indigo carmine at boron-doped diamond anode for wastewaters remediation. *Environmental Chemistry Letters*, 4(4), 229–233. <https://doi.org/10.1007/s10311-006-0053-2>

Anjos, F. S. C., Vieira, E. F. S., & Cestari, A. R. (2002). *Interaction of Indigo Carmine Dye with Chitosan Evaluated by Adsorption and Thermochemical Data*. 246, 243–246. <https://doi.org/10.1006/jcis.2002.8537>

Babak, S., Queru, S., & Feraud, M. (2016). *Procede de preparation du carmin d' indigo* (Patent No. 3059664).

Benkhaya, S., Harfi, S. El, & Harfi, A. El. (2017). Classifications, properties and applications of textile dyes : A review. *Applied Journal of Enviromental Engineering Science*, 3, 311–320.

Benkhaya, S., M' rabet, S., & El Harfi, A. (2020). A review on classifications, recent synthesis and applications of textile dyes. *Inorganic Chemistry Communications*, 115, 107–891. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2020.107891>

Bernal, A. (2013). *Evaluación de una columna de burbujeo de flujo ascendente para la ozonación catalizada con arcillas pilareadas con Fe*. Universidad Autónoma del Estado de México.

Campos, R., Kandelbauer, A., Robra, K. H., Cavaco-Paulo, A., & Gübitz, G. M. (2001). Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Biotechnology*, 89(2–3), 131–139. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00303-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00303-0)

Cano, M., Solis, M., Diaz, J., Solis, A., Loera, O., & Teutli, M. M. (2011). Biotransformation of indigo carmine to isatin sulfonic acid by lyophilized mycelia from *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology*, 10(57), 12224–12231. <https://doi.org/10.5897/AJB11.944>

Castaño Urueña, J. D. (2014). *Optimización del proceso de producción, purificación y caracterización de una lacasa a partir de un hongo nativo con potencial aplicación en*

---

*procesos biotecnológicos* [Universidad Nacional de Colombia].  
<http://www.bdigital.unal.edu.co/45348/>

Chacon, M., Blanco, C., Hinestroza, J., & Combariza, M. (2013). Biocomposite of nanostructured MnO<sub>2</sub> and Fique fibers for efficient dye degradation. *Green Chemistry*, 129(9), 1463–9262. <https://doi.org/10.1039/C3GC40911B>

Chequer, M., Rodrigues De Oliveira, G., Anastácio, E., Carvalho, J., Boldrin, M., & Palma De Oliveira, D. (2013). Textile Dyes : Dyeing Process and Environmental Impact. In *Eco-Friendly Textile Dyeing and Finishing* (pp. 152–175).

Choi, K. (2021). Dyes and Pigments Discoloration of indigo dyes by eco-friendly biocatalysts. *Dyes and Pigments*, 184(August 2020), 108749. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108749>

Chowdhury, M. F., Khandaker, S., Sarker, F., Islam, A., Rahman, M. T., & Awual, M. R. (2020). Current treatment technologies and mechanisms for removal of indigo carmine dyes from wastewater: A review. *Journal of Molecular Liquids*, 318, 114061. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114061>

Craick, J., Khan, D., & Afifi, R. (2009). The Safety of Intravenous Indigo Carmine to Assess Ureteric Patency During Transvaginal Uterosacral Suspension of the. *Journal of Pelvic Medicine and Surgery*, 15(1). <https://doi.org/10.1097/SPV.0b013e3181986ace>

Dalmázio, I., De Urzedo, A. P. F. ., Alvez, T. M. ., Cathatino, R. R., Eberlin, M. N., Nascentes, C. C., & Augusti, R. (2007). Electrospray ionization mass spectrometry monitoring of indigo carmine degradation by advanced oxidative processes. *Journal of Mass Spectrometry*, 43(7), 854–864. <https://doi.org/10.1002/jms>

De Oliveira, S., Carvalho, L., & Azevedo, R. (2010). Brazil nut shells as a new biosorbent to remove methylene blue and indigo carmine from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials Journal*, 174, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.09.020>

---

Dellamatrice, P., Silva-stenico, M. E., Beraldo De Moraes, L., Fiore, M., & Rosim, R. (2016). Degradation of textile dyes by cyanobacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.012>

Duarte, S., Jiménez, A., Pineda, J., & Mora, E. (2018). Degradación de índigo carmín por hongos de pudrición blanca Indigo carmine degradation by white rot fungi. *CEBA*, 1(June), 4–12.

Fernelius, W. C., & Renfrew, E. E. (1881). Indigo. *Nature*, 23(591), 390–391. <https://doi.org/10.1038/023390a0>

García, N. (2016). *Síntesis de hidrotalcitas con ftalocianina y aplicación en la decoloración de índigo carmín*. Universidad Autónoma de Puebla.

Gogate, P. R., & Pandit, A. B. (2004). *A review of imperative technologies for wastewater treatment II: hybrid methods*. 8(03), 553–597. [https://doi.org/10.1016/S1093-0191\(03\)00031-5](https://doi.org/10.1016/S1093-0191(03)00031-5)

Goud, B. S., Cha, Lim, H., Koyyada, G., & Kim, H. (2020). Augmented Biodegradation of Textile Azo Dye Effluents by Plant Endophytes : A Sustainable , Eco - Friendly Alternative. *Current Microbiology*, 20, 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02202-0>

Gregory, P. (1990). Classification of Dyes by Chemical Structure. *The Chemistry and Application of Dyes*, 17–47. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7715-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7715-3_2)

Jang, J. W., & Park, J. W. (2014). Iron oxide nanotube layer fabricated with electrostatic anodization for heterogeneous Fenton like reaction. *Journal of Hazardous Materials*, 273, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.03.002>

Jones, S. M., & Solomon, E. I. (2015). Electron transfer and reaction mechanism of laccases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(5), 869–883. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1826-6>

Khataee, A. R., Vatanpour, V., & Ghadim, A. R. A. (2009). *Decolorization of C . I . Acid Blue 9 solution by UV / Nano-TiO 2 , Fenton , Fenton-like , electro-Fenton and electrocoagulation*

---

*processes: A comparative study.* 161, 1225–1233.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.04.075>

Li, H. X., Xu, B., Tang, L., Zhang, J. H., & Mao, Z. G. (2015). Reductive decolorization of indigo carmine dye with *Bacillus* sp. MZS10. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 103, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.04.007>

Li, H., Zhang, R., Tang, L., Zhang, J., & Mao, Z. (2014). Evaluation of *Bacillus* sp. MZS10 for decolorizing Azure B dye and its decolorization mechanism. *Journal of Environmental Sciences*, 26(5), 1125–1134. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(13\)60540-9](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(13)60540-9)

Li, H., Zhang, R., Tang, L., Zhang, J., & Mao, Z. (2015). Manganese peroxidase production from cassava residue by *Phanerochaete chrysosporium* in solid state fermentation and its decolorization of indigo carmine. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 23(1), 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2014.11.001>

MarketWatch. (2020, November). Global Indigo Carmine Market 2020 Regional Production Volume , Business Operation Data Analysis , Revenue and Growth Rate by 2026. *MarketWatch News Department*, 4–7.

Marras, S. (2014). *Application of advanced methodologies to the identification of natural dyes and lakes in pictorial artworks*. Unniveristà Ca'Fscaru Venezia.

Mishra, A., Kumar, S., & Kumar, A. (2011). International Biodeterioration & Biodegradation Laccase production and simultaneous decolorization of synthetic dyes in unique inexpensive medium by new isolates of white rot fungus. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(3), 487–493. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.01.011>

Prado, A. G. S., Torres, J. D., Faria, E. A., & Dias, S. C. L. (2004). *Comparative adsorption studies of indigo carmine dye on chitin and chitosan.* 277, 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.04.056>

Quintero, L. U. Z., & Cardona, S. (2010). Índigo Carmín technologies for the decolorization of dyes : indigo and indigo carmine. *Dyna*, 77, 371–386.



Ramya, M., Anusha, B., & Kalavathy, S. (2008). Decolorization and biodegradation of Indigo carmine by a textile soil isolate *Paenibacillus larvae*. *Biodegradation*, 19(2), 283–291. <https://doi.org/10.1007/s10532-007-9134-6>

Roshan, P., Blackburn, R. S., & Bechtold, T. (2001). Indigo and Indigo Colorants. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 1–16. <http://repositorio.udlap.mx/xmlui/handle/123456789/8349>

Ruiz, S. (2011). *Evaluación de la remoción del colorante INDIGO utilizado en empresas dedicadas a la producción de telas tipo DENIM empleando a *Pleutoris ostreatus* como modelo biológico*. Univesrsidad de la Sabana.

Sayılı, H., Güzel, F., & Önal, Y. (2015). Conversion of grape industrial processing waste to activated carbon sorbent and its performance in cationic and anionic dyes adsorption. *Journal of Cleaner Production*, 93, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.01.009>

Solís, H., Loera-Serna, S., Gómez-Chávez, V., Ruiz-Ramos, R., Cortés-Romero, C. M., & Ortiz, E. (2016). Degradation of Indigo Carmine Using Advanced Oxidation Processes: Synergy Effects and Toxicological Study. *Journal of Environmental Protection*, 07(12), 1693–1706. <https://doi.org/10.4236/jep.2016.712137>

Stasiak, N., A-koch, W. K., & Owniak, K. G. (2014). Review Modern Industrial And Pharmacological Applications Of Indigo Dye And Its Derivatives: A Review. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 71(2), 215–221.

Torres, T. (2015). *Degradación de índigo carmín mediante procesos avanzados de oxidación empleando ozono catalizado con diferentes metales*. Universidad Autónoma del Estado de México.

Vasco, A. (2014). Evaluación de la adsorción de índigo carmin en pellets abrasivos para la industria textil. In *Universidad Pontificia Bolivariana* (Issue 1). Universidad Pontificia Bolivariana.

Vidya Lekshmi, K. P., Yesodharan, S., & Yesodharan, E. P. (2018). MnO<sub>2</sub> efficiently removes indigo carmine dyes from polluted water. *Heliyon*, 4(11). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00897>

---

Vikrant, K., Giri, B. S., Raza, N., Roy, K., Kim, K. H., Rai, B. N., & Singh, R. S. (2018). Recent advancements in bioremediation of dye: Current status and challenges. *Bioresource Technology*, 253, 355–367. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.029>

Wong, D. W. S. (2009). Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*, 174–209. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8279-z>

Zaharia, C., & Suteu, D. (2012). Textile Organic Dyes – Characteristics, Polluting Effects and Separation/Elimination Procedures from Industrial Effluents – A Critical Overview. In T. Puzyn (Ed.), *Organic Pollutants Ten Years After the Stockholm Convention - Environmental and Analytical Update* (1st ed., pp. 56–85). <https://doi.org/10.5772/32373>