



Potencial Biorremediación del Colorante Negro Azoico por Levadura Inmovilizada en Gelatina y Estudio Teórico de la Interacción Levadura-Colorante

Potential Bioremediation of azo Black dyes by immobilized yeast in gelatin gel and Theoretical Study of Yeast-Dye Interaction

María Consuelo Jaramillo Flórez
Universidad de San Buenaventura
mariac.jaramillo@usbmed.edu.co

Margarita Jaramillo Ciro
Universidad de San Buenaventura
ambiental@usbmed.edu.co

Manuela Quiroz Betancur
Universidad de San Buenaventura
aprendiz.laboratorio@usbmed.edu.co

Stefanía Medina Herrera
Universidad de San Buenaventura
stefania09_95@hotmail.com

(Tipo de Artículo: Investigación científica y tecnológica. Recibido: 16/08/2017. Aprobado: 11/12/2017)

Resumen. La presencia de aguas residuales coloreadas evita la penetración de la luz a las aguas, disminuye la fotosíntesis de plantas, la supervivencia de organismos acuáticos, y afecta significativamente el paisaje. Se optimizó la geometría del colorante Negro P-SG y del complejo cromado, con el fin de proponer los enlaces susceptibles de rompimiento por las enzimas que contiene la levadura *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada en gelatina. El enlace azoico es la zona más susceptible de rompimiento por las enzimas, lo que produciría la disminución del color. El análisis cinético mostró que la K_M es menor en la levadura inmovilizada, y la cinética de biorremediación del colorante es dependiente de su concentración. Las ecuaciones cinéticas de biorremediación son exponenciales de decrecimiento, y el tiempo de vida media de biorremediación del colorante es 0.67 hr a concentraciones máximas de levadura inmovilizada en relación al control. La ósmosis del colorante a través de la gelatina es dependiente de la concentración del colorante, por lo tanto, la biorremediación del colorante es dependiente de la concentración de colorante y de la concentración de levadura inmovilizada. En este trabajo se mostró la levadura inmovilizada en gelatina como una potencial herramienta para remediar colorantes azoicos.

Abstract. The presence of colored wastewater prevents the penetration of light into the waters, decreases the photosynthesis of plants, the survival of aquatic organisms, and significantly affects the landscape. The geometry of the Black P-SG dye and the chromed complex was optimized, in order to propose the susceptible bonds of breakaging by the enzymes of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast immobilized in gelatin. The azo bond is the area most susceptible to breakdown by enzymes, which would produce decreasing in dye. The kinetic analysis showed that the K_M is lower in the immobilized yeast, and the bioremediation kinetics of the dye is dependent on its concentration. The kinetic equations of bioremediation are exponential of decrease, and the mean life time of bioremediation of the dye is 0.67 hr at maximum concentrations of immobilized yeast in relation to the control. The osmosis of the dye through the gelatin is dependent on the concentration of the dye, therefore, the bioremediation of the dye is dependent on the concentration of dye and the concentration of immobilized yeast. In this work the yeast immobilized in gelatin was shown as a potential tool to remedy azo dyes.

Palabras clave. Aguas residuales; biorremediación; estudio cinético; colorantes azoicos; inmovilización; *Saccharomyces cerevisiae*; estudio teórico.

Keywords. Wastewater; bioremediation; kinetic study; azo dyes; immobilisation; *Saccharomyces cerevisiae*; theoretical study.

DOI: 10.21500/20275846.3199

1. Introducción

Uno de los mayores problemas a nivel ambiental es la contaminación de las aguas por vertimiento de contaminantes de diferente índole [1]. Las empresas textiles y de teñido utilizan grandes cantidades de colorantes. El proceso de tinturado no es completamente eficiente, porque un porcentaje de los colorantes es vertido en las aguas residuales de estas

empresas [2], [3]. Bajas concentraciones de colorantes alteran notablemente la estética de los cuerpos de agua [3], [4]. Desde hace varios años se han presentado vertimientos de aguas residuales coloreadas en los cuerpos acuosos en diferentes ciudades de Colombia [5], [6], [7], [8]. Debido a esta problemática, en Antioquia se han endurecido las normas de control. Por disposición del gobierno a través del artículo 63 de la Ley

99 de 1993 [9], el Acuerdo Metropolitano No. 21 de 2012 [10], y la Resolución 631 de 2015 [11], se han establecido los límites permisibles de color en las aguas residuales vertidas por las empresas involucradas, estas normas obligan a estas empresas a tratar sus aguas de tal forma que cumplan con los requisitos.

Los colorantes azoicos son de tradicional uso alrededor del mundo y se caracterizan por ser recalcitrantes, estables ante la luz, y tóxicos. Los métodos de tratamiento de las aguas residuales que contienen estos colorantes originan aminas tóxicas [12], por lo que la alternativa de degradación biológica emerge ante estas problemáticas.

En anteriores estudios sobre la decoloración de las tinturas azoicas, se reporta la decoloración biológica debido a las enzimas azoreductasas en microorganismos, las cuales catalizan la lisis reductiva del grupo azo (-N=N-), esta reacción es el primer paso de biodegradación. El decrecimiento en la absorción del colorante, después de ser sometido a la actividad enzimática del microorganismo, indica que la decoloración del colorante fue debido a la degradación del colorante [13], [14]. Pero, debido a las aminas generadas por el rompimiento del enlace azo, el pH de las aguas residuales aumenta [15], lo que limita la supervivencia de microorganismos en estos cuerpos acuosos.

La Figura 1 muestra la estructura del colorante azoico Negro P-SG. El colorante contiene en su estructura un cromo que se conjuga con dos unidades del colorante azo. Este cromo le da la tonalidad al colorante.

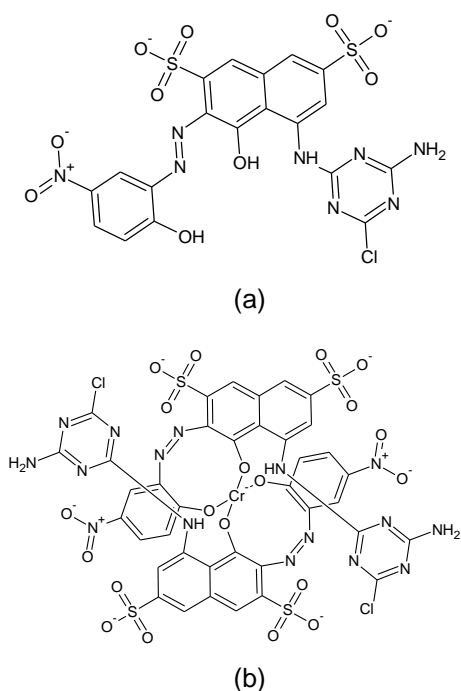


Figura 1. Estructura del colorante azoico Negro P-SG: (a) monómero de la estructura del colorante, (b) estructura del complejo cromado

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha reportado como capaz de biorremediar colorantes [3], [16], [17], [18]. La levadura *S. cerevisiae* tiene enzimas azoreductasas que catalizan compuestos en presencia de varias coenzimas reductoras como FADH₂, NADH y NADPH, mostrando su versatilidad y su potencial uso como agente degradador de colorantes [13], y gracias a su complejo enzimático se utiliza en otros procesos [19]. Este complejo enzimático podría ser responsable de la biorremediación o biodegradación de compuestos como los colorantes azoicos.

Uno de los métodos que permite la utilización de microorganismos para el tratamiento de aguas residuales es la inmovilización, ya sea en un soporte, o encapsulado dentro de una matriz. Este método incrementa la resistencia de la levadura al cambio en las condiciones en las que se encuentra el colorante, tales como pH, condiciones tóxicas y temperatura. A su vez permite que la levadura sea contenida en un soporte durante la reacción, luego de la cual son fácilmente separadas de los productos y pueden ser reutilizadas, además, no afecta la actividad catalítica del complejo enzimático de la levadura. Una de las matrices utilizadas para inmovilizar microorganismos es la gelatina, esta matriz es compatible con el microorganismo por ser una proteína, permeable a algunos solutos, biodegradable y es una alternativa de bajo costo [4], [20], [21], [22].

Este trabajo presenta una alternativa de tratamiento de colorantes azoicos usando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada en gelatina, también su estudio cinético, el porcentaje de biorremediación del colorante azoico negro, y el estudio teórico computacional del colorante.

2. Materiales y métodos

La gelatina grado comercial y el Glutaraldehído al 50%v/v fueron adquiridos en Químicos J. M., y la levadura, Baker's yeast, fue adquirida en un almacén comercial. El colorante azoico Negro P-SG fue adquirido por una industria textil de la ciudad de Medellín. Los demás reactivos para la preparación de los medios fueron grado analítico, y fueron usados sin purificar.

2.1 Inmovilización de la levadura

Esta metodología fue seguida de acuerdo a [20], [21], [23], [22] con modificaciones, para ser aplicada a condiciones de laboratorio, un resumen es el siguiente: Se preparó un medio adicionando en agua destilada 10 g/L de sacarosa, 10 g/L de NH₄Cl, 0.5 g/L de NaH₂PO₄, 0.4 g/L de NaCl, 0.35 g/L de MgCl₂, 0.05 g/L de CaCl₂, y se ajustó a pH entre 5.0 y 6.0 [3]. Se preparó 10 mL de gelatina al 20%p/v calentando a 60°C y luego se disminuyó a 35°C. Diferentes cantidades de levadura fueron adicionadas a 10 mL de medio: 0.5 g, 1.5 g, 2.5 g, 3.5 g, y 5.0 g. Los anteriores 10 mL fueron adicionados a los 10 mL de gelatina, se agitaron suavemente para homogenizar, y se dejó solidificar a 4°C. El gel fue cortado en trozos muy pequeños, lavados con solución buffer fosfato pH 6.0, se lavó con solución

de Glutaraldehído 0.25%v/v, se filtró y se conservó a 4°C en solución buffer hasta su utilización.

2.2 Cinética de biorremediación del colorante Negro azoico por levadura inmovilizada y libre

La cinética de biorremediación del colorante Negro P-SG fue determinada por espectrofotometría (Genesys, UV-Visible, Thermo, Scientific) a 597 nm. A partir de una solución stock de colorante de 0.2%p/v se prepararon las siguientes soluciones: 0.1%p/v, 0.01%p/v, 0.001%p/v, y 0.0001%p/v. A cada concentración se le adicionó 3 g de levadura inmovilizada, de las diferentes concentraciones. Se prepararon dos controles, donde uno contenía la concentración evaluada de colorante sin levadura inmovilizada y el otro contenía levadura inmovilizada sin colorante. Los volúmenes se ajustaron con medio. La absorbancia fue leída en periodos de tiempo iguales hasta completar 90 minutos.

La cinética de disminución del colorante por la levadura libre se efectuó con concentraciones de colorantes 0.005 g/mL, 0.010 g/mL, 0.050 g/mL y 0.1 g/mL. A cada solución se le adicionó la solución de levadura cuya concentración final fue 1%p/v. La absorbancia fue leída en periodos de tiempo iguales hasta completar 90 minutos.

2.3 Biorremediación de colorante por levadura inmovilizada y libre.

Se evaluaron varias concentraciones de colorante y varias concentraciones de levadura inmovilizada. Se prepararon 2 concentraciones de colorante: 1.0 mg/mL y 0.1 mg/mL. Las concentraciones de levadura inmovilizadas fueron: 250 mg/mL, 175 mg/mL, 125 mg/mL, y 75 mg/mL. Cada concentración de colorante fue evaluada por las 4 concentraciones de levadura inmovilizada. Las lecturas de absorbancia fueron leídas a las 0 hr, 1.5 hr, 24 hr y 72 hr. El blanco estaba formado por levadura inmovilizada en medio y no contenía colorante, y el control era el colorante a las concentraciones evaluadas, y no contenía levadura inmovilizada. Los ensayos se realizaron por triplicado.

2.4 Estudio teórico

La estructura molecular del colorante azoico Negro P-SG fue optimizada usando HF y el método STO-3G. Se calcularon las propiedades de HOMO y LUMO, el mapa de potencial electrostático para visualizar la densidad electrónica del colorante, y la geometría del complejo cromado y su potencial LUMO se optimizaron usando el método PM3, con el programa PC Spartan Pro 1.0.5. (16-08-2000)

2.5 Análisis estadístico

Los resultados son presentados como la media \pm SEM del triplicado, los datos fueron analizados usando el programa Graph-Pad 5.0 software 2007, San Diego, CA, USA. Un valor de p menor de 0,05 fue considerado significativo.

3. Resultados y Discusión

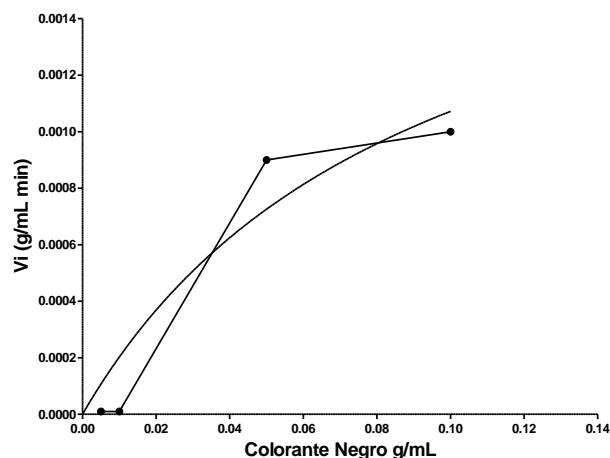
3.1 Parámetros Cinéticos de biorremediación del colorante

La determinación de los parámetros de Velocidad máxima, $V_{m\acute{a}x}$, y constante de Michaelis y Menten, K_M , de la levadura inmovilizada y libre, se realizaron usando la ecuación de Michaelis y Menten.

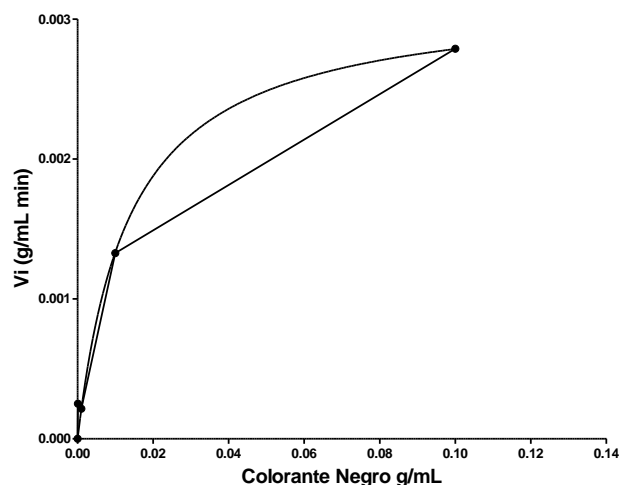
La ecuación (1) rige la cinética de la cual se obtienen las gráficas.

$$V_i = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$

La Figura 2 muestra las gráficas de las cinéticas de la levadura inmovilizada y libre.



(a)



(b)

Tabla 1. Parámetros cinéticos de biorremediación del colorante Negro P-SG, con levadura libre e inmovilizada.

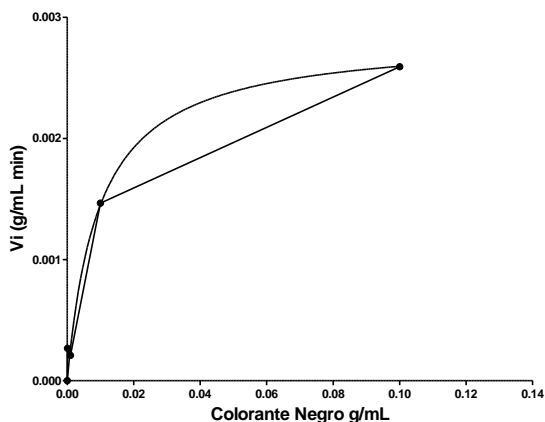
Parámetros cinéticos	Levadura libre		Levadura inmovilizada		
	75 mg/mL	125 mg/mL	175 mg/mL	250 mg/mL	
V_{max} (g/mL min)	$2.051 \cdot 10^{-3}$	$3.17 \cdot 10^{-3}$	$2.84 \cdot 10^{-3}$	$2.34 \cdot 10^{-3}$	$3.44 \cdot 10^{-3}$
K_M (g/mL)	$9.13 \cdot 10^{-2}$	$1.38 \cdot 10^{-2}$	$1.0 \cdot 10^{-2}$	$1.21 \cdot 10^{-2}$	$2.0 \cdot 10^{-2}$

La Tabla 1 muestra que la K_M de la levadura inmovilizada es menor que la K_M de la levadura libre, indicando que aumenta la afinidad de la levadura al colorante cuando se encuentra inmovilizada. Es probable que este resultado sea debido a la toxicidad del colorante, ya que, al estar inmovilizada, la levadura se encuentra protegida, por lo tanto, hay menos impedimentos externos para la interacción levadura-colorante, y hay menos inhibición de la levadura por los metabolitos que se podrían formar.

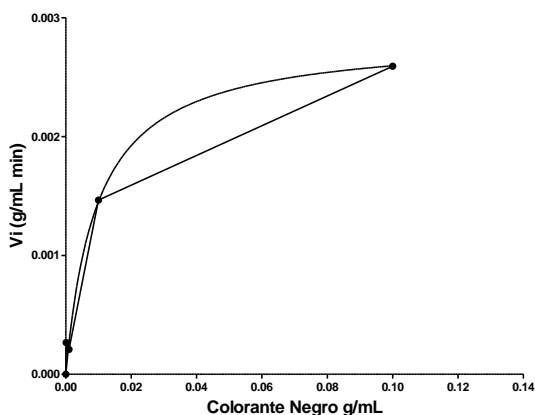
La velocidad máxima de biorremediación de colorante es mayor a mayor concentración de levadura en el colorante, indicando que la biorremediación del colorante es dependiente de la concentración de levadura. A concentración más alta de colorante, hay mayor concentración del complejo Colorante-Levadura, pero la cinética de biorremediación llega a un estado estacionario, independiente de la concentración de levadura inmovilizada o libre. También es probable que la gelatina facilite o active las enzimas responsables de la remediación del colorante.

3.2 Cinética de biorremediación del colorante

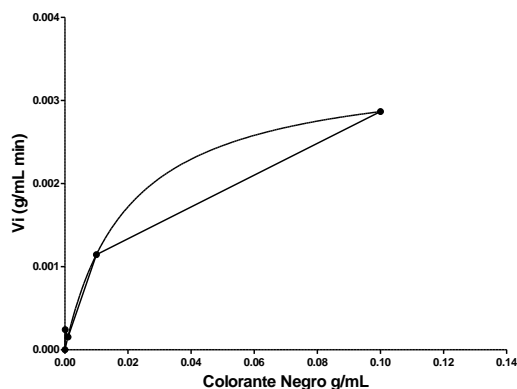
La cinética de biorremediación del colorante se realizó calculando la absorbancia corregida vs. el tiempo. La absorbancia corregida se halló restando la absorbancia de la celda menos la absorbancia del blanco. Las gráficas resultantes muestran la absorbancia del complejo Levadura-Colorante en medio acuoso, que aún no ha sido degradado o absorbido por la levadura. Los comportamientos de decaimiento exponencial de la absorbancia del colorante en el medio, en función del transcurso del tiempo, se muestran en la Figura 3.



(c)



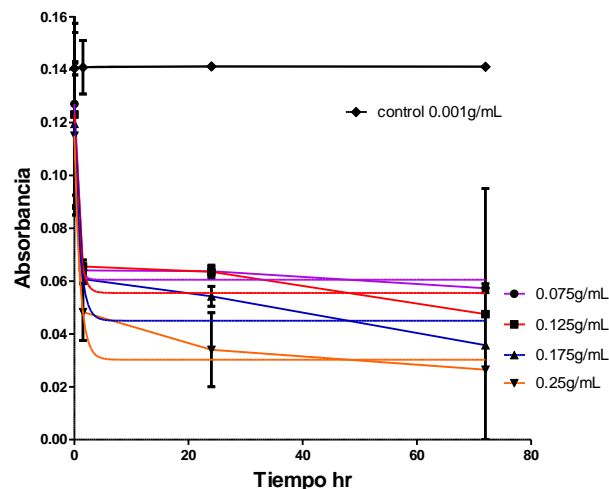
(d)



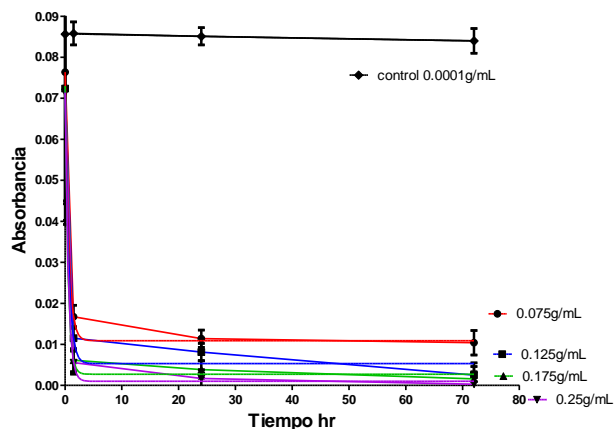
(e)

Figura 2. Gráficas de cinética de biorremediación del colorante, calculadas a varias concentraciones de levadura inmovilizada y libre: (a) levadura libre, (b) levadura inmovilizada a 75 mg/mL, (c) 125 mg/mL, (d) 175 mg/mL, (e) 250 mg/mL, respectivamente.

La Figura 2 muestra las gráficas a diferentes concentraciones de levadura inmovilizada en gelatina, donde estas gráficas se rigen por la ecuación de Michaelis y Menten, de donde se derivan los parámetros cinéticos $V_{máx.}$ y K_M , estos parámetros se muestran en la Tabla 1.



(a)



(b)

Figura 3. Cinética de biorremediación a diferente concentración de colorante expuesto a 4 concentraciones de levadura inmovilizada en gelatina, 75 mg/mL, 125 mg/mL, 175 mg/mL, 25 mg/mL: (a) concentración de colorante 1 mg/mL, (b) concentración de colorante 0.1 mg/mL.

Las Figuras 3(a) y 3(b) muestran la concentración del colorante control como referencia de la tendencia que sigue la biorremediación del colorante Negro, en estas se muestran una mayor biorremediación de colorante a mayor concentración de levadura inmovilizada, y menor biorremediación de colorante a menor concentración de levadura inmovilizada. Las gráficas representan una disminución de la concentración del colorante en el tiempo, mostrando que la velocidad de biorremediación del colorante es proporcional a la concentración de colorante residual. Esto podría suponer que la velocidad de biorremediación por absorción o adsorción podría ser proporcional a la concentración del colorante en el medio; donde el colorante, desde esta mirada, puede ser biodegradado o biorremediado en un período de tiempo corto. Como la concentración del colorante disminuye, la velocidad de biorremediación o biodegradación también disminuye. Este comportamiento se representa con una ecuación de la forma (2):

$$Y = ye^{-KX} + b \quad (2)$$

De la gráfica Figura 3(a) se obtiene las siguientes ecuaciones de decaimiento exponencial de la concentración de colorante con el tiempo.

$$Y = 0.066e^{-0.196X} + 0.06 \quad (3)$$

$$Y = 0.068e^{-1.27X} + 0.06 \quad (4)$$

$$Y = 0.074e^{-1.04X} + 0.04 \quad (5)$$

$$Y = 0.085e^{-1.03X} + 0.03 \quad (6)$$

$$Y = 10^{-4} e^{-0.60X} + 0.14 \quad (7)$$

Las ecuaciones (3), (4), (5), (6) y (7) representan la disminución de la concentración de colorante en presencia de concentraciones de levadura inmovilizada a 75 mg/mL, 125 mg/mL, 175 mg/mL, 250 mg/mL y el control, a concentración de colorante 1 mg/mL, que no contiene levadura inmovilizada, respectivamente. A mayor concentración de levadura mayor es la concentración de colorante que la levadura biorremedia, esto se observa en el valor de y de las anteriores ecuaciones. Este valor representa el rango de absorbancia que la levadura inmovilizada pudo biorremediar y se calculó tomando la diferencia entre la absorbancia inicial a las 0 hr y la absorbancia final a las 72 hr.

El tiempo de vida media, $T_{1/2}$, se obtiene de las ecuaciones anteriores, reemplazando en la siguiente ecuación:

$$T_{1/2} = \frac{0.693}{K} \quad (8)$$

La Tabla 2 muestra el tiempo de vida media, calculado de (8), que requiere la levadura para biorremediar el 50% del colorante a concentración inicial de 1 mg/mL.

Tabla 2. Tiempo de vida media de biorremediación del colorante Negro a 1 mg/mL con levadura inmovilizada a diferentes concentraciones.

Levadura inmovilizada (mg/mL)	75	125	175	250	control
$T_{1/2}$ (hr)	0.35	0.54	0.67	0.67	1.15

La Tabla 2 muestra como el control también se degrada a temperatura ambiente, solo que es más lenta su degradación, requiere casi el doble del tiempo que el ensayo con mayor concentración de levadura inmovilizada, para degradarse el 50% de la concentración inicial. De la Tabla 2, también se observa que ha concentraciones altas de levadura inmovilizada, como 175 mg/mL y 250 mg/mL, el tiempo medio es el mismo, significando que la concentración de levadura es mayor que la concentración de colorante, es decir, hay un exceso de levadura en el medio, todas las moléculas de colorante interaccionan con la levadura, y a pesar de la alta concentración de levadura disponible, el tiempo de degradación o de remediación no variará.

Las ecuaciones que representan la gráfica Figura 3(b) y que siguen la ecuación (2) se muestran a continuación:

$$Y = 0.066e^{-0.161X} + 0.01 \quad (9)$$

$$Y = 0.067e^{-1.59X} \quad (10)$$

$$Y = 0.070e^{-2.02X} \quad (11)$$

$$Y = 0.070e^{-1.83X} \quad (12)$$

$$Y = 0.009e^{-0.003X} + 0.08 \quad (13)$$

Las ecuaciones (9), (10), (11), (12) y (13), representan la disminución de la absorbancia del colorante en el tiempo de las concentraciones 75 mg/mL, 125 mg/mL, 175 mg/mL, 250 mg/mL y el control de concentración de colorante 0.1 mg/mL, respectivamente. De acuerdo a los resultados mostrados en las ecuaciones anteriores, el rango de absorbancia reducida, que corresponde al valor de y en la (2), es aproximadamente igual, independiente de la concentración de levadura inmovilizada, es decir, independiente de la concentración de levadura, la biorremediación del colorante a concentración de 0.1 mg/mL será la misma, indicando que la concentración de colorante es baja comparada con la concentración de levadura.

La ecuación (13), el control en el ensayo, muestra un valor de rango de disminución de la absorbancia del colorante de 0.009, indicando que la degradación del colorante a condiciones ambientales es mínima, y el valor de b de la (2) es aproximadamente igual a la absorbancia inicial del colorante a 0.1 mg/mL. Para el caso de las concentraciones de levadura inmovilizada de 125 mg/mL, 175 mg/mL y 250 mg/mL, (10), (11) y (12), respectivamente, la biorremediación fue muy alta del colorante, ya que, para estos casos, el valor de b es igual a cero. En la concentración de levadura de 75 mg/mL, debido a que la concentración de levadura era relativamente baja, la biorremediación disminuyó.

La Tabla 3 muestra el tiempo de vida media que se tarda cada concentración de levadura inmovilizada en biorremediar el colorante a 0.1 mg/mL.

Tabla 3. Tiempo de vida media de biorremediación del colorante Negro a 0.1 mg/mL con levadura inmovilizada a diferentes concentraciones.

Levadura inmovilizada (mg/mL)	75	125	175	250	Control
$T_{1/2}$ (hr)	0.43	0.44	0.34	0.38	239

El tiempo de vida media, mostrado en la Tabla 3, para la biorremediación del colorante a 0.1 mg/mL, es menor que los resultados para la biorremediación del colorante a 1 mg/mL, esto podría ser porque la concentración de colorante es menor, por lo tanto, la formación del complejo Colorante-Levadura es mayor. A concentraciones bajas de levadura, el tiempo de vida media aumenta, es probable que a concentraciones bajas de colorante la ósmosis a través de la gelatina se vea afectada, y por lo tanto se requiera una mayor concentración de levadura inmovilizada para entrar en contacto con el colorante y se forme el complejo Levadura-Colorante.

Estos resultados muestran que la degradación o biorremediación del colorante depende de la concentración del colorante y de la concentración de Levadura inmovilizada con una relación proporcional.

El porcentaje de biorremediación se calcula de acuerdo a la ecuación (14) [24]:

$$\% R = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100 \quad (14)$$

Donde A_0 y A_t son las Absorbancias iniciales y las Absorbancias al tiempo T , respectivamente.

La ecuación (14) dio como resultado la Tabla 4 donde se muestra el porcentaje de remoción del colorante en función de las concentraciones de colorante y de levadura inmovilizada.

Tabla 4. Porcentaje de Remoción del Colorante azoico Negro por la Levadura inmovilizada.

Concentración colorante (mg/mL)	Tiempo (hr)	% Remoción de colorante levadura inmovilizada (mg/mL)			
		75	125	175	250
1.0	0	0	0	0	0
	1.5	50	47	49	58
	24	50	48	55	70
	72	55	61	70	77
0.1	0	0	0	0	0
	1.5	78	84	92	92
	24	85	89	95	98
	72	86	97	98	100

Como se observa en la Tabla 4, la relación concentración de levadura inmovilizada a porcentaje de biorremediación es proporcional, y el porcentaje de biorremediación también es inversamente proporcional a la concentración de colorante, es decir, a mayor concentración de colorante, teniendo constante la concentración de levadura, disminuye la biorremediación. Eso podría ser porque la levadura se satura de colorante a concentraciones altas, el complejo Colorante-Levadura está en estado estacionario, donde habrá un exceso de colorante que no podrá ser biorremediado, además la velocidad de biorremediación o de descomposición del complejo Colorante-Levadura es muy lento. Se debe destacar que las lecturas de absorbancia del colorante se observan hasta la formación del estado estacionario, y se reduce con el rompimiento del complejo Colorante-Levadura.

3.3 Reactividad Química del Colorante azoico Negro P-SG.

El estudio computacional se realiza con el fin de detectar las zonas más susceptibles de ataque, ya sea porque es una zona cargada electrónicamente (HOMO) o por ser una zona deficiente en electrones (LUMO) [25], [26], [27]. Para determinar las zonas más reactivas del colorante azoico Negro se optimizó la geometría de la estructura del colorante y se calcularon las superficies de densidad electrónica, la Figura 4 muestra la geometría optimizada del colorante azoico.

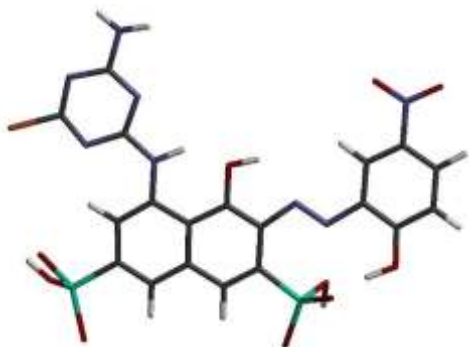
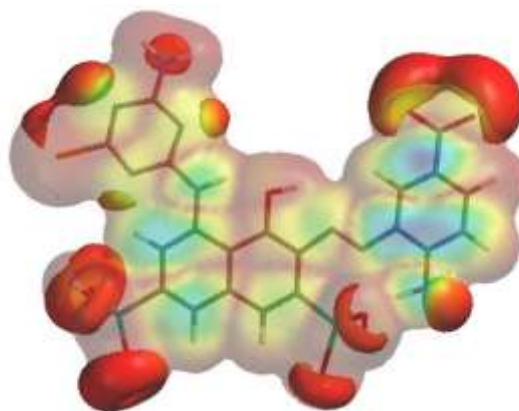


Figura 4. Geometría optimizada de la estructura monomérica del colorante azoico Negro P-SG.

La estructura del colorante es planar en la región aromática, lo que obliga a que el ataque de un nucleófilo sea o por encima o por debajo del grupo azo.

La reactividad del colorante a la actividad hidrolítica de las enzimas de la levadura, se determinó por el cálculo del potencial electrostático y los orbitales HOMO y LUMO de la molécula de colorante, los cuales se muestran en la Figura 5.



(c)

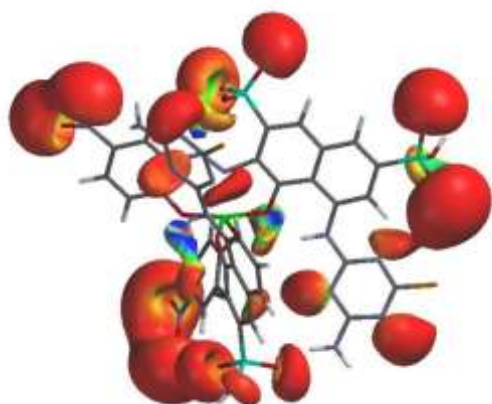
Figura 5. (a) Potencial LUMO del complejo cromado del colorante Negro azoico, (b) Mapa del potencial electrostático, y (c) orbital molecular HOMO y LUMO de la estructura monomérica del colorante azoico Negro P-SG.

La Figura 5(a) muestra una zona azul, zona electrofílica, ubicada en el cromo, esta zona es atacada por los pares de electrones del oxígeno del agua para romper el complejo y formar la estructura monomérica del colorante. Las regiones más reactivas, mostradas de color rojo, se encuentran en las ramificaciones de los anillos, como se muestra en el mapa del potencial electrostático de la Figura 5(b), éstas son zonas con más carga electrónica, y en la Figura 5(c) se muestran los orbitales HOMO, los grupos más cargados de electrones y por donde la molécula interaccionaría aportando sus electrones. Además, muestra las zonas, en las cadenas aromáticas más electrofílicas, de color azul, donde las enzimas entrarían a interaccionar y a ejercer su acción catalítica. Entre esas zonas está el enlace azo, $-N=N-$, donde los dos nitrógenos se marcan con zonas azules. El anillo naftaleno y los grupos fenilos presentan zonas muy electrofílicas, pero estos anillos son altamente estables y la probabilidad de rompimiento de los enlaces es menor, pero los dos nitrógenos del grupo azoico son potencialmente susceptible de ataque por enzimas hidrogenasas, que aportan H-H, para la formación de aminas $-HN-NH-$, estos resultados están de acuerdo con la referencia [28]. Los orbitales HOMO de la molécula de colorante permitirían el acercamiento o atracción hacia la membrana de la levadura, que tiene una potencial carga positiva [29], esta atracción facilitaría la formación el complejo Levadura-Colorante.

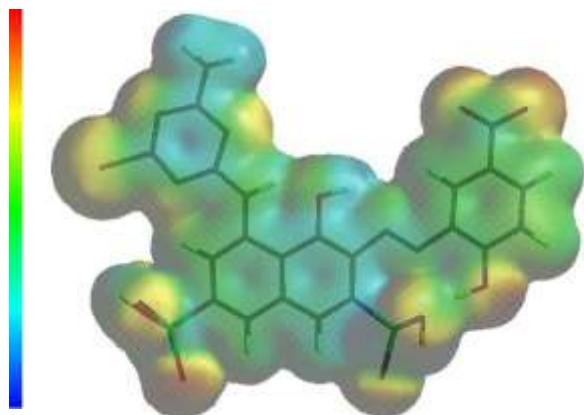
La longitud del enlace azoico en la estructura optimizada del colorante Negro es de 1.276 Å, de acuerdo a la modelación de compuestos azo, la longitud del enlace azo disminuye a medida que las ramificaciones de los nitrógenos sean pequeñas, estos datos se observan en la Tabla 5.

Tabla 5. Longitud del enlace $-N=N-$ después de optimizar la geometría al nivel HF/STO-3G.

Compuesto	HN=NH	Ph-N=NH	Colorante Negro
Longitud de enlace (Å)	1.264	1.272	1.276



(a)



(b)

Al aumentar la longitud de enlace –N=N–, como es el caso del colorante Negro, hace que este sitio sea más susceptible al rompimiento ante la acción catalítica de una enzima hidrogenasa, presente en la levadura. Esta reacción de hidrogenación disminuiría la absorbancia del colorante.

4. Conclusiones

Los colorantes azoicos son compuestos altamente utilizados a nivel industrial, y a pesar de las restricciones de las normas ambientales, aún se vierten aguas coloreadas a los cuerpos de aguas.

La inmovilización de la levadura le permite a la levadura protegerse de las condiciones tóxicas de los posibles metabolitos generados en el tratamiento.

La biorremediación del colorante depende de la concentración de este en el medio y de la concentración de la levadura. A concentraciones muy altas de colorante, la levadura se satura de las moléculas de colorante y la remediación no es completa en el período de tiempo, pero a concentraciones muy bajas, el flujo a través del gel no es lo suficientemente rápido como para lograr la remediación en el tiempo determinado, esto supone que el colorante pasa la gelatina por un proceso de ósmosis. Estos resultados concuerdan con los hallados en las referencias enunciadas.

Este trabajo muestra la posible degradación del colorante en presencia de la levadura en las condiciones experimentales, y el potencial biorremediador del colorante Negro P-SG por parte de la levadura *S. cerevisiae* inmovilizada en gelatina.

5. Trabajos futuros

Como continuación del trabajo, la línea de investigación realizará análisis espectroscópicos de HPLC, para la determinación de la degradación del colorante.

6. Agradecimientos

Los autores agradecemos a la Universidad de San Buenaventura-Medellín por el apoyo financiero a este trabajo.

Referencias

- [1] M. C. Jaramillo; Zpata, L. F.; Marulanda, T. "Fitorremediación de mercurio a partir de elodea sp.". Ing. USBMed., vol. 6, n° 2, pp. 42-45, 2015.
- [2] L. S. Silva; L. C. B. Lima; L. J. F. Ferreira; M. S. Silva; J. A. Osajima; R. D. S. Bezerra; E. C. Silva Filho. "Sorption of the anionic reactive red RB dye in cellulose: Assessment of kinetic, thermodynamic, and equilibrium data". Open Chem., vol. 13, pp. 801-812, 2015.
- [3] Z. Aksu. "Reactive dye bioaccumulation by *Saccharomyces cerevisiae*". Process Biochemistry, vol. 38, pp. 1437-1444, 2003.
- [4] W. Ping; F. Xuerong; C. Li; W. Qiang; Z. Aihui. "Decolorization of reactive dyes by laccase immobilized in alginate/gelatin blend with PEG". Journal of Environmental Sciences, vol. 20, pp. 1519-1522, 2008.
- [5] L. J. Vivas-Aguas; L. F. Espinosa and L. G. Parra Henríquez. "Identificación de fuentes terrestres de contaminación y cálculo de las cargas contaminantes en el área de influencia de La Ciénaga Grande de Santa Marta, Caribe Colombiano". Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras, vol. 42, n° 1, pp. 7-30, 2013.
- [6] El Espectador. "Otra empresa multada por verter contenidos colorantes al río Medellín". 20 01 2014. [En línea]. Available: <http://www.elespectador.com/noticias/nacional/otra-empresa-multada-verter-contenidos-colorantes-al-ri-articulo-469767>. [Último acceso: 14 06 2017].
- [7] V. Restrepo. "Alerta por dos nuevos vertimientos contaminantes en el río Medellín". 16 05 2016. [En línea]. Available: <http://www.elcolombiano.com/antioquia/en-el-rio-medellin-siguen-los-vertimientos-contaminantes-GF4153109>. [Último acceso: 14 06 2017].
- [8] A. F. Acosta. "Industria Textil". 2008. [En línea]. Available: <https://encolombia.com/economia/info-economica/algodon/industriatextil/>. [Último acceso: 17 06 2017].
- [9] C. G. Trujillo. "LEY 99 DE 1993 (diciembre 22)". 22 12 1993. [En línea]. Available: <http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Normal.jsp?i=297>. [Último acceso: 14 16 2017].
- [10] Junta Metropolitana del Valle de Aburrá. "Acuerdo Metropolitano No. 21". 02 11 2012. [En línea]. Available: <http://www.metropol.gov.co/recursohidrico/Documents/ACUERDO21antioquiicolor.pdf>. [Último acceso: 14 06 2017].
- [11] Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible. "Resolución 0631 del 17 de marzo de 2015". 17 03 2015. [En línea]. Available: http://www.minambiente.gov.co/images/normativa/app/resoluciones/d1-res_631_marz_2015.pdf. [Último acceso: 14 06 2017].
- [12] J.P. Jadhav; G. k. Parshetti; S. D. Kalme; S. P. Govindwar. "Decolorization of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463". Chemosphere, vol. 68, pp. 394-400, 2007.
- [13] T. Robinson; G. McMullan; R. Marchant and P. Nigam. "Remediation of dyes in textile e,uent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative". Bioresource Technology, vol. 77, pp. 247-255, 2001.
- [14] S. V. Mohan; K. K. Prasad; N. C. Rao and P. N. Sarma. "Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process". Chemosphere, vol. 58, pp. 1097-1105, 2005.
- [15] P.D. Kunjadia; G. V. Sanghvi; A. P. Kunjadia; P. N. Mukhopadhyay; G. S. Dave. "Role of ligninolytic enzymes of white rot fungi (*Pleurotus* spp.) grown with azo dyes". SpringerPlus, vol. 5, pp. 1-9, 2016.
- [16] M. Ghaedi; S. Hajati; B. Borazesh; F. Karimi; G. Ghezalbash. "*Saccharomyces cerevisiae* for the biosorption of basic dyes from binary component systems and the high order derivative spectrophotometric method for simultaneous analysis of Brilliant green and Methylene blue". Journal of Industrial and Engineering Chemistry, vol. 19, p. 227-233, 2013.
- [17] A. Sadeghi; M. A. K. Bazardehi; S. Raffae; B. Zarif. "Biotransformation of Carmoisine and Reactive Black 5 Dyes Using *Saccharomyces cerevisiae*". Health, vol. 6, pp. 859-864, 2014.
- [18] M. Mahmoud. "Decolorization of certain reactive dye from aqueous solution using Baker's Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strain". Housing and Building National Research Center, vol. 12, p. 88-98, 2016.
- [19] T. Marulanda; L. F. Zapata Osorno and M. C. Jaramillo. "Producción de Bioetanol a partir de Elodea sp.". Ingenierías USBMed., vol. 8, n° 1, pp. 37-42, 2017.
- [20] C. J. Wei; R. D. Tanner and G. W. Malaney. "Effect of Sodium Chloride on Bakers' Yeast Growing in Gelatin". Applied and Environmental Microbiology, vol. 43, n° 4, pp. 757-763, 1982.
- [21] Z. Vujcic; Z. Miloradovic; A. Milovanovic and N. Bozic. "Cell wall invertase immobilisation within gelatin gel". Food Chemistry, vol. 126, p. 236-240, 2011.
- [22] M. E. Mahmoud. "Water treatment of hexavalent chromium by gelatin-impregnated yeast (*GeleYst*) biosorbent". Journal of Environmental Management, vol. 147, pp. 264-270, 2015.
- [23] N. Jaiswal; O. Prakash; M. Talat; S. H. Hasan; R. K. Pandey. "a-Amylase immobilization on gelatin: Optimization of process variables". Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, vol. 10, pp. 161-167, 2012.
- [24] D. T. Sponza and M. Isik. "Decolorization and inhibition kinetic of Direct Black 38 azo dye with granulated anaerobic sludge". Enzyme and Microbial Technology, vol. 34, p. 147-158, 2004.
- [25] H. Buyukuslu; M. Akdogan; G. Yildirim and C. Parlak. "Ab initio Hartree-Fock and density functional theory study on characterization of 3-(5-methylthiazol-2-ylidiazonyl)-2-phenyl-1H-indole". Spectrochimica Acta Part A, vol. 75, p. 1362-1369, 2010.
- [26] J. M. López; A. E. Ensuncho and J. Robles. "Estudio Teórico de la Reactividad Química y Biológica de Cisplatino y algunos Derivados

- con Actividad Anticancerosa". *Información Tecnológica*, vol. 24, n° 3, pp. 3-14, 2013.
- [27] A. E. Ensuncho; J. M. López and J. Roble. "Reactividad Química de los Azo Colorantes Amarillo Anaranjado y Rojo Allura mediante Descriptores Globales y la Función de Fukui". *Información Tecnológica*, vol. 23, n° 6, pp. 3-12, 2012.
- [28] C. J. Pearce; J. R. Lloyd and J. T. Guthrie. "The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review". *Dyes and Pigments*, vol. 58, p. 179–196, 2003.
- [29] C. Saldaña and A. Peña. "Regulación de los niveles de iones en la Levadura las proteínas de la membrana plasmática involucradas". *Revista Latinoamericana de Microbiología*, vol. 41, n° 3, pp. 193-203, 1999.