

SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR

DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR
TECNOLÓGICA



SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

SEP

**TRABAJO PROFESIONAL
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO BIOQUÍMICO**

PRESENTA:

Yessica Jazmín Vila Malvaéz

CON EL TEMA:

**“EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN Y/O REMOCIÓN
DE BIFENILOS POLICLORADOS EN SUSTRATO
SÓLIDO”**

MEDIANTE:

**OPCIÓN 1
(TESIS PROFESIONAL)**

**DIRECTORA DE TESIS
DRA. ROCÍO MEZA GORDILLO**

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS.AGOSTO2013

Resumen

Los bifenilospoliclorados (BPC's) son una mezcla de hasta 209 compuestos clorados individuales, estos compuestos fueron usados como transmisores de calor, fluidos eléctricos, fluidos en bombas de vacío y compresoras. Se consideran tóxicos, ya que provocan efectos como irritación en la piel, daños al hígado, efectos sobre la reproducción y el desarrollo. Son persistentes, bioacumulables y se transportan en el aire, agua y suelo. Por ello, la importancia de desarrollar un método para su eliminación: el vermicompostaje puede ser una opción viable para la biorremediación, usando la lombriz *Eisenia foetida*, la cual ha demostrado que puede llevar a cabo la biotransformación de los bifenilospoliclorados (BPC) en lodos y sedimentos.

En este trabajo se evaluó, el uso del proceso de vermicompostaje empleando *peatmoss* y excreta de conejoa diferentes proporciones como sustrato, 85/15, 90/10 y 95/5 respectivamente, lombrices (*Eisenia foetida*) en diferentes cantidades (3, 5 y 7), y diferentes concentraciones de BPC's (decaclorobifenilo) 100, 150 y 200 ppm. Con el objetivo de determinar el mecanismo de interacción entre los bifenilospoliclorados y el sistema de vermicomposteo; esto se logró usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, midiéndose parámetros como porcentaje de degradación de contaminante, comparando y analizando los productos obtenidos durante el desarrollo de la fase experimental, observándose estructuras de ácidos carboxílicos (ácido ascórbico-2,6-dihexadenoato), ésteres (4,2-ácido cresótico-6-metoxi-bimol, metil-4,6- dimetoxi-o- toluato de metilo) como producto de degradación de decaclorobifenilo.

Abstract

Polychlorinated biphenyls (PCB's) are a mixture of up to 209 individual chlorinated compounds; these compounds were used as heat transfer, electrical fluids, fluids in vacuum pumps and compressors. Are considered toxic, since they cause effects such as skin irritation, liver damage, effects on reproduction and development. They are persistent, bioaccumulative and transported in the air, water and soil. Therefore, the importance of developing a method for disposal: vermicomposting can be a viable option for Bioremediation, using the earthworm *Eiseniafoetida*, which has shown that it can carry out the biotransformation of polychlorinated biphenyls (PCBs) in sludge and sediments.

In this study we evaluated the use of vermicomposting process using *peat moss* and *peat moss* and rabbit excreted at different proportion, 85/15, 90/10 and 95/5 respectively, earthworms (*Eiseniafoetida*) in different amounts (3, 5 and 7), and different concentrations of PCB's (decachlorobiphenyl) 100, 150 and 200 ppm. With the aim to determine the mechanism of interaction between the PCBs and vermicomposting system, this is achieved using gas chromatography coupled with mass spectrometry, measuring parameters such as percent degradation of pollutant, comparing and analyzing the products obtained during development experimental phase, showing structures of carboxylic acids (ascorbic acid-2,6-dihexadecanoate), esters (4,2-cresotic acid acid-6-methoxy-Bimol, ester methyl ester-4, 6 - dimethoxy-o-toluate) as a degradation product of decachlorobiphenyl.

ÍNDICE

Temas	Páginas
CAPÍTULO I	
Introducción	8
CAPÍTULO II	
Antecedentes	9
II.1.- Bifenilospoliclorados	9
II.2.- Legislación ambiental, nacional e internacional	14
II.3.- Eliminación de BPC's	15
II.3.1.- Incineración	15
II.3.2.- Métodos químicos	16
II.3.3.- Métodos físicos y químicos	16
II.3.4.- Métodos con energía radiante	17
II.4.- Métodos biológicos	17
II.5.- Métodos de detección de BPC's	22
II.5.1.- Espectrometría de masas	22
II.5.1.1.- Principios	23
II.5.1.2.- Fuentes de ionización	24
II.5.2.- Acoplamiento cromatografía- espectrometría de masas	24
CAPÍTULO III	
III.1.- Justificación	26
III.2.- Objetivos	27
III.2.1.- Objetivo general	27
III.2.2.- Objetivos específicos	27
CAPÍTULO IV	
Materiales y métodos	28
IV.1.- Preparación de soportes	28
IV.1.1.- Excreta de conejo	28
IV.1.2.- <i>Peatmoss</i>	28
IV.2.- Selección de lombrices	28
IV.3.- Preparación de la solución de BPC's	29
IV.4.- Diseño experimental utilizado	29
IV.4.1.- Montaje del experimento	30
IV.4.2.- Extracción de PBC's	30
IV.4.3.- Tratamiento a la lombriz	31
IV.5.- Cuantificación de PBC's	32
CAPÍTULO V	
Resultados y discusión	33
V.1.- Degradación de decaclorobifenilo	33
V.2.- Identificación de compuestos orgánicos presentes en los componentes de la vermicomposta	35
V.2.1.- Ácido ascorbico-2,6- dihexadecanoato	36
V.2.2.- 2-bromometil-4.4'- dimetil-3-(3-oxobut-1- enil) ciclohexano-2- enilato de formilo	38
V.2.3.- 1,4-epoxy-1-(2H)-metanol-4,5,7-tris (1,1- dimetil)-3,4,-dihidro naftaleno	39

V.2.4.- 1,5. bis (4- metoxifenil) biciclo (3,2,0) heptano	40
V.2.5.-3,5- dicitclohexil-4- hidroxil benzoato de metilo	41
V.2.6.- 9H-flouren-9- dichloromethyl-3,6- difluoro	43
V.2.7.-1-ciclohexil-2-metil prop -2-en-1-ona	44
V.2.8.- Miristato de (1,3-diacetil)-2-propilo	45
V.2.9.- 4,2-ácido cresotico, -6-methoxi-bimol, estermetil ester-4,6- dimetoxi-o- toluato	47
V.2.10.- 2-(7-hidroximetil-3,11-dimetil dodeca-2,6,10- trienil)-1,4- benzoquinona	49
CAPÍTULO VI	
Conclusiones	53
CAPÍTULO VII	
Recomendaciones	54
CAPÍTULO VII	
Referencias bibliográficas	55
CAPÍTULO VIII	
Anexos	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras	Temas	Páginas
2.1.-	Estructura química de BPC's	9
2.2.-	Ciclo reproductivo de la lombriz <i>Eiseniafoetida</i>	20
2.3.-	Esquema de funcionamiento de un espectro de masas	24
2.4.-	Diagrama de funcionamiento de un sistema cromatográfico-espectrometría de masas	25
5.1.-	Curva de degradación de decaclorobifenilo a 100 ppm	33
5.2.-	Curva de degradación de decaclorobifenilo a 150 ppm	34
5.3.-	Cromatograma de sustrato	36
5.4.-	Patrón de fragmentación del ácido ascórbico-2,6-dihexadecanoato	36
5.5.-	Principal vía catabólica para degradación bacteriana de bifenilos y bifenilos sustituidos, R= H, Cl, OH	37
5.6.-	Patrón de fragmentación del 2-bromometil-4.4'- dimetil-3-(3-oxobut-1-enil) ciclohexano-2- enilato de metilo	38
5.7.-	Patrón de fragmentación del 1,4-epoxi-1-(2H)-metanol-4,5,7-tris (1,1- dimetil)-3,4,-dihidro naftaleno	39
5.8.-	Patrón de fragmentación del 1,5 bis (4- metoxifenil) biciclo (3,2,0) heptano	40
5.9.-	Patrón de fragmentación del -3,5- dicitclohexil-4- hidroxi benzoato de metilo	41
5.10.-	Modelo propuesto para la degradación de BPC's	42
5.11.-	Patrón de fragmentación del 9H-flouren-9- dichlorometil-3,6- difluoro	43
5.12.-	Patrón de fragmentación de 1-ciclohexil-2-metil prop -2-en-1-ona	44
5.13.-	Patrón de fragmentación de miristato de (1,3-diacetil)-2-propilo	45
5.14.-	Patrón de fragmentación de 4,2- ácido cresótico -6-methoxy-bimol, estermetil ester-4,6- dimetoxi-o- toluato	47
5.15.-	Ruta propuesta para el catabolismo de 4-clorobifenilo	48
5.16.-	Patrón de fragmentación de -2-(7-hidroximetil-3,11-dimetil dodeca-2,6,10- trienil)-1,4- benzoquinona	49
5.17.-	Rutas de reacción de BPC's hidroquinonas, semiquinonas y quinonas	50
5.18.-	Mecanismo de autooxidación de BPC hidroquinona y quinona	51
9.1.-	Compuestos comunes hallados en materias primas	59
9.2.-	Compuestos identificados en <i>peatmoss</i>	60
9.3.-	Compuestos identificados en excreta de conejo	60
9.4.-	Compuestos identificados en lombriz	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tablas	Temas	Páginas
4.1.-	Diseño experimental Taguchi L9, usado en el vermicompostaje	29
5.1.-	Compuestos presentes en la excreta de conejo, peatmoss y lombriz.	35
5.2.-	Fragmentos de ácido ascórbico-2,6- dihexadecanoato	37
5.3.-	Fragmentos de 2-bromometil-4.4'- dimetil-3-(3-oxobut-1-enil) ciclohexano-2- enilato de metilo	38
5.4.-	Fragmentos de 1,4-epoxi-1-(2H)-metanol-4,5,7-tris (1,1-dimetil)-3,4,-dihidro naftaleno	39
5.5.-	Fragmentos de 1,5 bis (4- Metoxifenil) biciclo (3,2,0) heptano	40
5.6.-	Fragmentos de 3,5- dicitclohexil-4- hidroxí benzoato de metilo.	41
5.7.-	Fragmentos de 9H-flouren-9- dichlorometil-3,6- difluoro	43
5.8.-	Fragmentos de 1-ciclohexil-2-metil prop -2-en-1-ona	44
5.9.-	Frgamentos de miristato de (1,3-diacetil)-2-propilo	45
5.10.-	Fragmentos de 4,2- ácido cresótico -6-methoxy-bimol, estermetil ester-4,6- dimetoxi-o- toluato	47

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los bifenilospoliclorados (BPC's) son compuestos aromáticos clorados, los cuales han sido usados extensivamente en diversas aplicaciones industriales, como ingredientes en adhesivos, transformadores dieléctricos, aceites, entre otras aplicaciones. Los BPC's fueron manufacturados como Aroclors (USA), Kanechlors (Japón), y Sovols (Unión Soviética Rusa). Su producción fue prohibida en 1976 por el Congreso de Estados Unidos de Control de Sustancias Tóxicas AC, (TSCA) debido a sus efectos adversos en la salud y en el medio ambiente. Aunque su distribución es limitada y su uso se ha prohibido, la distribución mundial de los BPC's es muy grande, ya que se encuentran niveles residuales en peces y muchas especies marinas y mamíferos terrestres, incluyendo los seres humanos.

Las prácticas de eliminación de BPC's han contribuido a que casi en todo el medioambiente se hallen distribuidos los BPC's resultando un problema ambiental.

Una práctica para la degradación de BPC's es la remediación biológica, usando lombrices de tierra, bacterias y hongos, los cuales son organismos claves de descomposición de materia orgánica. Debido a su amplia distribución e importancia en el suelo, varios investigadores han demostrado que estos organismos pueden remover, degradar y/o bioacumular BPC's.

Los métodos analíticos para BPC's se basan en su separación por medio de cromatografía de gases, usando columnas capilares con diferentes polaridades y detectores específicos, tales como el detector de ionización de llama (FID), el detector de captura de electrones (ECD) y la espectrometría de masas (MS) (Tharakan, 2004).

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

II.1.-BIFENILOS POLICLORADOS

Los bifenilopoliclorados (BPC's) son una mezcla de hidrocarburos aromáticos clorados con fórmula general condensada $C_{12}H_{(10-n)}Cl_n$, en la que n puede ser de 1 hasta 10. Sintetizados por primera vez en laboratorio en 1881.

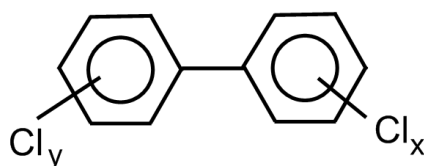


Figura 2.1 Estructura química de los BPC's, donde $x=1-5$ $y=1-5$.

Se conocen 209 diferentes moléculas de BPC, denominadas “congéneres” y 130 mezclas comerciales distintas. En el proceso de fabricación de bifenilopoliclorados no se obtienen estos compuestos puros o casi puros, sino que se producen mezclas de BPC con diversos grados de cloración, a las que se conocen genéricamente como Aroclor, Askareles, Clophen, Clorextol, Fenclor, Ineteen, Kaneclor, Montar, Noflamol, Phenoclor, Pyralene, Santotherm, Sovol, Therminol FR-1, entre otros .

Las características de los BPC's son; peso molecular desde 188.7 g/mol hasta 498.7 g/mol., su densidad varía de 1.1821 a 1.566 g/mL, teniendo una presión de vapor de 0.00006 mmHg, a 20 °C; muchos no son biodegradables, dependiendo de la posición de los cloros en la molécula, son bioacumulables, líquidos viscosos, amarillentos, con fuerte olor a hidrocarburo, hidrofóbicos, con solubilidad en agua entre 0.0027 y 0.42 ng/L, alta capacidad calorífica, inertes a la acción de todos los ácidos y las bases conocidas, punto de Inflamación >300°C, naturaleza no polar: alta constante dieléctrica, altamente solubles en lípidos y recalcitrantes. La alta electronegatividad del cloro neutraliza la alta reactividad del carbono lo que los hace de muy difícil degradación física, química y biológica (Lopera, 2006).

Estas propiedades de los BPC los hicieron ideales para la elaboración de una gama muy amplia de productos industriales y de consumo, habiendo encontrado en la industria eléctrica su principal aplicación, por su elevada permitividad, estabilidad química y resistencia intrínseca al fuego, fueron utilizados mayormente en transformadores y en capacitores, incluyendo balastos para lámparas fluorescentes. Al uso de BPC en este tipo de equipos se le conoce como uso o aplicación en sistemas *cerrados o no dispersivo* (Ruíz, 2003).

Por sus propiedades físicas, con los años se incrementó el número de usos de los bifenilopoliclorados en los que se denominan sistemas *abiertos o dispersivos*, incluyendo el uso como fluidos de transferencia de calor e hidráulicos; aceites lubricantes y de corte; hule, asfalto, plastificantes en la formulación de productos poliméricos, pinturas, adhesivos, papel copia sin carbón, aceite de inmersión para microscopio y selladores en la industria de la construcción, entre otras aplicaciones. Por sus características no inflamables, la mayoría de los aceites dieléctricos con BPC se usaron fundamentalmente en lugares con riesgo alto de incendio, tales como en plantas industriales, industria petroquímica y en los sistemas de transporte colectivo de tracción eléctrica, como el metro y los tranvías. Por lo general, debido a su alta viscosidad, para utilizarlos en transformadores y otros equipos eléctricos, se mezclaban los BPC con triclorobenceno (Ruíz, 2003).

Casi inmediatamente después del inicio de la síntesis de los bifenilopoliclorados en el laboratorio, se tuvieron evidencias de la peligrosidad de este tipo de compuestos para la salud humana. En 1899, se identificó una condición patológica de la piel denominada cloracné, una desfiguración dolorosa de la piel que afectaba al personal ocupacionalmente expuesto a compuestos orgánicos clorados. El mismo tipo de efecto adverso a la salud se detectó en 1936 en obreros de la empresa Halowax de Nueva York, expuestos a BPC, tres de los cuales fallecieron por daños severos en el hígado. Diversos accidentes alrededor del mundo, como los de Yusho en Japón en 1968 y el de Yucheng en Taiwán en 1979, hicieron posible identificar otros efectos nocivos a la salud por la exposición aguda a bifenilopoliclorados y a los subproductos de su descomposición térmica a temperaturas elevadas: las

dibenzodioxinas policloradas y los dibenzofuranos policlorados, comúnmente denominados dioxinas y furanos, respectivamente. Estos contaminantes, producto de la combustión incompleta de los BPC son también sustancias altamente tóxicas (Ruíz, 2003).

Los bifenilospoliclorados son considerados probables carcinógenos humanos por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y están incluidos en la categoría "2A"; en tanto que la Agencia para la Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés), ha demostrado que los BPC causan cáncer en animales, por ello los ubica en la categoría B2, la cual resulta equivalente a la 2A de la IARC. Se ha detectado también, que los BPC ocasionan efectos no cancerígenos tales como afectación del sistema inmunológico, del sistema reproductivo, del sistema nervioso, del sistema endócrino y otros efectos en la salud. Los diferentes efectos crónicos a la salud de los BPC pueden estar interrelacionados, puesto que las alteraciones en un sistema pueden tener implicaciones importantes en otros sistemas del organismo humano (Ruíz, 2003).

Sin embargo, tal vez las características que convierten a los bifenilospoliclorados en compuestos de gran peligrosidad, no solo para la salud humana sino también para el ambiente, son su gran resistencia a la biodegradación y su capacidad para dispersarse ampliamente en el ambiente. Se ha descubierto que además de ser persistentes, estos compuestos tienen gran movilidad en el ambiente y se acumulan en los ecosistemas, por lo que han sido catalogados como materiales tóxicos ambientales. Las pruebas de la peligrosidad ambiental de los BPC se remontan a la década de 1930; pero no es sino hasta 1969 cuando científicos suecos que estudiaban los efectos biológicos del DDT encontraron concentraciones significativas de BPC en la sangre, pelo y tejidos grasos de los animales salvajes, detectando la capacidad de los BPC de bioacumularse a través de la cadena alimenticia. Por ser de difícil biodegradación y por su gran afinidad química por las grasas, estos compuestos atraviesan fácilmente los lípidos de las membranas celulares y se absorben rápidamente en los tejidos grasos, bioacumulándose y

bioconcentrándose a través de la cadena alimenticia. De acuerdo a la publicación *TheEcologist*, el bacalao ártico, por ejemplo, presenta concentraciones de BPC 48 millones de veces más altas que las de las aguas en las que vive y los mamíferos predadores, como el oso polar, pueden albergar concentraciones que superan más de 50 veces las del bacalao que consumen (Ruíz, 2003).

Por lo anterior, son clasificados como Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP), siendo parte de la llamada “docena sucia” por el Programa de las Naciones Unidas del Medio Ambiente (PNUMA), la cual está formada además por aldrín, clordano, DDT, dieldrín, endrín, heptacloro, hexaclorobenceno, mirex, toxafeno, dioxinas y furanos (Ruíz, 2003).

La fabricación comercial de los BPC's comenzó en América del Norte en 1929 (Ambiental, 2003) se produjeron por más de 50 años y se exportaron como materias primas prácticamente en todo el mundo. Se estima que la cantidad de BPC's producida entre 1930 y 1980 fue de 1'200,000 toneladas, de las cuales 400,000 se depositaron en los océanos y 800,000 en aparatos de servicio. Los países que fabricaban BPC's incluían Austria, China, Checoslovaquia, Francia, Alemania, Italia, Japón, la Federación Rusa, España, Reino Unido y Estados Unidos. Estos compuestos fueron patentados en 1929 por la compañía SwanChemical, quien en 1931 vendió la patente a la Monsanto Chemical, desde entonces fueron producidos bajo diferentes marcas (Lopera, 2006).

En general, durante los primeros 25 años de su aplicación, los bifenilopoliclorados no generaron preocupaciones especiales. Fue a partir de 1968 que estos compuestos se colocaron en la mira de las agencias ambientales de varios países y de organismos internacionales como la OCDE, a raíz del accidente en Japón en el que más de 1800 personas se intoxicaron con aceite de arroz contaminado con Kanechlor 400, una de las marcas comerciales de BPC; y del incendio en Binhamton, EE.UU., donde se quemaron más de 180 galones de BPC y resultaron intoxicadas alrededor de 400 personas. Lo anterior aunado a la creciente evidencia de la presencia y efectos de los BPC en el ambiente motivó que en 1972 Suecia prohibiera el uso de estos compuestos en sistemas abiertos (Ruíz, 2003).

La primera acción gubernamental internacional la emprendió la OCDE en 1973 al emitir la Decisión del Consejo para la protección del ambiente, por la que se requería a sus países miembros a limitar el uso de BPC's en aplicaciones *abiertas* y a desarrollar mecanismos para su control. Por su parte, de acuerdo con la EPA, el Congreso de los Estados Unidos en respuesta a la creciente preocupación por los peligros asociados al uso de bifenilospoliclorados y de otros tóxicos, aprobó en 1976 la carta de control de sustancias tóxicas (TASCA, por sus siglas en inglés) en cuya sección 6(e) se estableció la prohibición para manufacturar, procesar y distribuir comercialmente los BPC. La producción de bifenilospoliclorados cesó totalmente en el Reino Unido en 1978 y en los EE.UU. en 1979. Sin embargo, la producción de BPC a gran escala continuó en otras partes del mundo hasta mediados de la década de 1980 (Ruíz, 2003).

Al contarse con más evidencias de los peligros de los bifenilospoliclorados, los nueve Estados del Mar del Norte acordaron durante su primera conferencia en 1984, intensificar el desfasamiento del uso y transferencia de BPC. En la segunda conferencia de estos Estados en 1987, se acordó reducir en 50% las descargas de estos y otros tipos de contaminantes tóxicos, persistentes y bioacumulables, para el año de 1995. En 1987 y por considerar que los controles de los bifenilospoliclorados no habían conducido a una tendencia consistente y clara de la disminución de su presencia en el ambiente, la OCDE tomó la decisión de recomendar a sus países miembros, cesar la manufactura, importación, exportación y venta de BPC para el 1 de enero de 1989. La decisión también hacía un llamado a acelerar el retiro de los BPC en uso. Al año siguiente, en la tercera conferencia de los Estados del Mar del Norte, se acordó un plan específico para eliminar el uso de BPC y disponerlos de modo seguro para el año 1999. En respuesta a los problemas planteados por el tráfico internacional de residuos peligrosos, en 1989 se firmó la Convención de Basilea por la que los gobiernos buscaron reducir el movimiento transfronterizo de los residuos peligrosos, incluyendo los bifenilospoliclorados (Ruíz, 2003).

En 1995, la Convención de Barcelona sobre Protección del Mar Mediterráneo contra la Contaminación, determinó reducir para el año 2005 las descargas marinas de COP a niveles inofensivos a la salud y a la naturaleza. En ese

mismo año, Suecia prohibió el uso de equipo que contuviera BPC. En Noviembre de 1995, como resultado de la Decisión del Consejo 18/32 del PNUMA, se emitió la Declaración de Washington, firmada por 100 países, acordando un programa mundial de acción para eliminar los COP incluyendo los BPC. Al año siguiente, la Unión Europea adoptó la Directiva EC96/59, llamando a la eliminación de BPC y a su desfasamiento total para el 2010 (Ruíz, 2003).

Finalmente, con el consenso de 122 países, en mayo del 2001 se adoptó el Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes con el objeto de lograr su eliminación y la minimización de su producción y uso (Ruíz, 2003).

México no está exento de la problemática ambiental y de salud que representan los bifenilospoliclorados que aún están presentes en el país, ni de los riesgos que representa el transporte intercontinental de BPC liberados en otras partes del mundo. Consecuentemente, su control debe ser una prioridad de política ambiental.

II.2.-LEGISLACIÓN AMBIENTAL, NACIONAL E INTERNACIONAL

La legislación nacional en materia ambiental está establecida a través del reglamento de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente en Materia de Residuos Peligrosos, la norma Oficial Mexicana NOM-133-ECOL-2000, Protección ambiental-Bifenilospoliclorados (BPC's)-Especificaciones de manejo, y la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos.

Algunos acuerdos internacionales son el Convenio de Basilea, dedicado al control de los movimientos transfronterizos de los desechos peligrosos y su eliminación, el cual entró en vigor en 1992. Su objetivo es establecer un control estricto de los movimientos transfronterizos de los residuos peligrosos y de otros residuos, incluidos los BPC. En diciembre de 1999 durante la Quinta Reunión de la Conferencia de las Partes, se adoptó la Decisión V/33 en la que se identifican como actividades prioritarias aquellas tendientes a fortalecer las capacidades institucionales y tecnológicas de las Partes, entre las que se

considera realizar capacitaciones para el manejo y control de equipo que contenga BPC.

El Acuerdo de Cooperación Ambiental de América del Norte, apoya su implementación y del cual se creó la Comisión para la Cooperación Ambiental (CCA) y el Grupo de Manejo Adecuado de Sustancias Químicas.

El Convenio de Róterdam sobre el Procedimiento de Consentimiento Previo Fundamentado, se aplica a ciertos plaguicidas y a ciertos productos químicos peligrosos que son objeto de comercio internacional.

El Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs), firmado el 22 de mayo de 2001 y cuya ratificación fue aprobada por el Senado el 17 de octubre de 2002. Este Convenio incluye una serie de medidas para reducir las liberaciones al ambiente de COPs, que pueden ir desde la elaboración de planes de acción, hasta la prohibición total y absoluta de tales contaminantes.

II.3.-ELIMINACIÓN DE BPC'S

Desde la determinación de la toxicidad y de los efectos nocivos de los BPC's sobre el ambiente, han surgido numerosas investigaciones que llevan a la destrucción de estos compuestos.

II.3.1.-Incineración

La incineración convencional implica la oxidación a altas temperaturas de los desechos para transformarlos en óxido (CO_2 , H_2O) y residuos inorgánicos que pueden ser descargados al ambiente con bajos efectos adversos. El proceso debe asegurar que los desechos estén expuestos a atmósferas oxidantes a alta temperatura, por eso una de las características más importantes de diseño es el consumo eficiente de combustible. Convencionalmente, se utiliza aire y un hidrocarburo como combustible, aunque puede usarse el poder calorífico de los desechos contaminados con PBC's, siempre que esto no degrade la condición oxidante a alta temperatura.

La incineración convencional de los BPC's produce ácido clorhídrico además de varios óxidos. La incineración como tal fue la tecnología escogida inicialmente por los poseedores de BPC's cuando los reguladores ambientales fijaron las pautas para la destrucción de estos compuestos, dado que es una tecnología establecida y que se utiliza una gran variedad de aplicaciones en el manejo de desechos.

II.3.2.-Métodos químicos

Los métodos químicos de tratamiento de compuestos orgánicos halogenados, presentan un gran problema de disposición debido a la naturaleza altamente estable de los enlaces carbono-halógeno presentes en estos. En muchos casos, los métodos conocidos como clorólisis, dehidrohalogenación catalítica, reacciones con sales fundidas, reacciones con ozono y reducciones con metales alcalinos alcanzan solo una deshalogenación parcial. Los procesos de descloración usan reactivos químicos para romper los enlaces en la molécula de BPC, que es extremadamente estable, formando otros compuestos químicos considerados inofensivos y ambientalmente seguros. Este proceso no rompen la estructura del bifenilo de la molécula, sólo son removidos los átomos de cloro que son los que dan a la molécula de BPC su estabilidad química y biológica.

Muchos procesos de descloración usan un reactivo de sodio para separar los átomos de cloro de la molécula de BPC. Los residuos generados de este proceso son cloruro de sodio y polifenilos no halogenados. Los constituyentes exactos de los polifenilos frecuentemente se desconocen pero pueden disponerse de forma segura.

II.3.3.-Métodos Físicos y Físicoquímicos

A diferencia de los considerados anteriormente, los métodos físico químicos para el manejo de BPC's no son tratamientos que impliquen su destrucción. En todos estos procesos, los BPC's son vaciados de los transformadores y reemplazados con otro fluidos, esto no ayuda a liberarse del problema de los BPC's, sino que sólo cambia su ubicación. Los BPC's todavía deben tratarse o disponerse por algún otro medio apropiado.

Estos métodos usan procesos ampliamente conocidos y probados para la extracción de compuestos orgánicos. Éstos varían desde el simple drenado del transformador lleno con aceite contaminado con BPC's y reemplazarlo por un fluido dieléctrico libre de BPC's, hasta operaciones más complejas como la destilación de los BPC's del fluido de transformador o de capacitor.

II.3.4.-Métodos con energía radiante

La aplicación de energía radiante puede promover la reacción química, y por tanto, la destrucción de los BPC's. Se han evaluado numerosos procesos basados fundamentalmente en algunos procesos radiactivos que inician la reacción química; en estos procesos la energía interactúa directamente con la molécula de BPCo con una especie intermedia que subsecuentemente la ataca. En ambos casos, la cuestión de la temperatura no es importante, estos procesos operan desde temperaturas cercanas a la del ambiente hasta aquellas que reducen los desechos a fracciones moleculares básicas.

II.4.-MÉTODOS BIOLÓGICOS

Los análisis de intentos de degradación de BPC's con bacterias han mostrado que este método está potencialmente limitado debido a sus largos tiempos de retención, y a que estos compuestos son extremadamente resistentes a la hidrólisis ácida o básica y a la oxidación. Su estabilidad varía con la posición de las sustituciones *orto* y *metade* sus cloros, ya que estos isómeros son biodegradables. Los bifenilos mono y diclorados pueden ser biodegradados por bacterias en cuestión de días si se trabaja en concentraciones bajas.

La biodegradación se puede definir como la utilización de un sistema biológico para eliminar o reducir la concentración de sustancias contaminantes presentes en un sitio o en un residuo contaminante. Implica la transformación a sustancia a CO₂, agua y biomasa (Báez, 2008).

La biodegradación es la característica de algunas sustancias químicas de poder ser utilizadas como sustrato por microorganismos, que las emplean para producir energía (por respiración celular) y crear otras sustancias como aminoácidos, nuevos tejidos y nuevos organismos. Puede emplearse en la

eliminación de ciertos contaminantes como los desechos orgánicos urbanos, papel, hidrocarburos, etc.

Algunas de sus ventajas son:

- Es un proceso natural, aceptado por la opinión pública y normativas medioambientales, que no corresponde a transferencia de tóxicos de un ambiente a otro sino su degradación final.
- Los residuos del proceso son generalmente inocuos como CO₂, H₂O y biomasa.
- Puede realizarse en el mismo lugar o en las cercanías de él, ello no afecta las actividades normales, disminuye el costo y el riesgo potencial de daño a la salud humana o del ambiente debido al traslado de grandes cantidades de material contaminado.

Algunas de sus desventajas son

- Es limitado a compuestos biodegradables y algunos productos de biodegradación pueden ser más persistentes o tóxicos que sus precursores.
- Se requiere de diversos factores presentes en el sitio: presencia de microorganismos activos, condiciones de crecimiento adecuadas (niveles de nutrientes v/s contaminantes)
- Se requiere investigación multidisciplinaria para determinar y optimizar las condiciones de biorremediación, además de que es difícil de extrapolar condiciones del laboratorio o planta piloto al sitio final a remediar.
- En general toma más tiempo que otros tipos de tratamiento

La técnica usada durante el desarrollo de este proyecto fue vermicomposteo, que por definición es el producto de la descomposición de la materia orgánica realizado por lombrices, siendola más utilizada la lombriz roja de California (*Eiseniafoetida*), debido a que a través de sus tubos digestivos y con la acción

combinada de microorganismos transforman la materia orgánica en un producto llamado vermicomposta o humus de lombriz.

La presencia de este humus en los suelos garantiza la reserva de sustancias nutritivas para las plantas, favorece la absorción y retención del agua, facilita la circulación del aire, limita los cambios bruscos de temperatura y humedad.

La descomposición de la materia orgánica se lleva a cabo a través de dos vías

Directa: Las lombrices se alimentan vorazmente de restos orgánicos, y al desplazarse dan lugar a galerías que aumentan la porosidad del material a vermicompostear, aireando así de manera automática el sustrato.

Indirecta: Las lombrices excretan hasta el 60% de lo que ingieren, estimulando la microflora del suelo, ya que el material digerido es un óptimo micro hábitat para un gran número de microorganismos descomponedores del suelo (Creativa, 2008). Actualmente se conocen aproximadamente 8.000 especies de lombrices, de las cuales, únicamente una media docena son utilizadas para hacer vermicompost (Ambiente, 2006).

La *Eisenia foetida* roja californiana tiene la cola achatada, levemente amarilla, con un peso de aproximadamente 1 g y mide de 5 a 9 cm, con 3.5 mm de diámetro, es ideal para la lombricultura, ya que los individuos de esta especie son capaces de colonizar una gran cantidad de residuos orgánicos, además de que toleran amplios rangos de temperatura (18-25°C) y humedad (70- 80 %), tienen una alta tasa reproductora, con lo que manteniendo las condiciones adecuadas, en poco tiempo multiplican su número y así, la cantidad de materia orgánica que son capaces de compostar. Son muy voraces, lo que las hace comer diariamente el equivalente a su peso en materia orgánica (1 g) y devolver el 60% de éste en forma de vermicompost (Creativa, 2008).

Las lombrices son hermafroditas y es indispensable que haya dos individuos para sureproducción. Alcanza su madurez sexual a los 3 meses de edad. Una vez cumplido este periodo ya está en condiciones de aparearse. Se reproduce

en un periodo de 7 días, durante el cual pueden permanecer inmóviles hasta 10-15 minutos que dura el apareamiento (Ambiente, 2006).

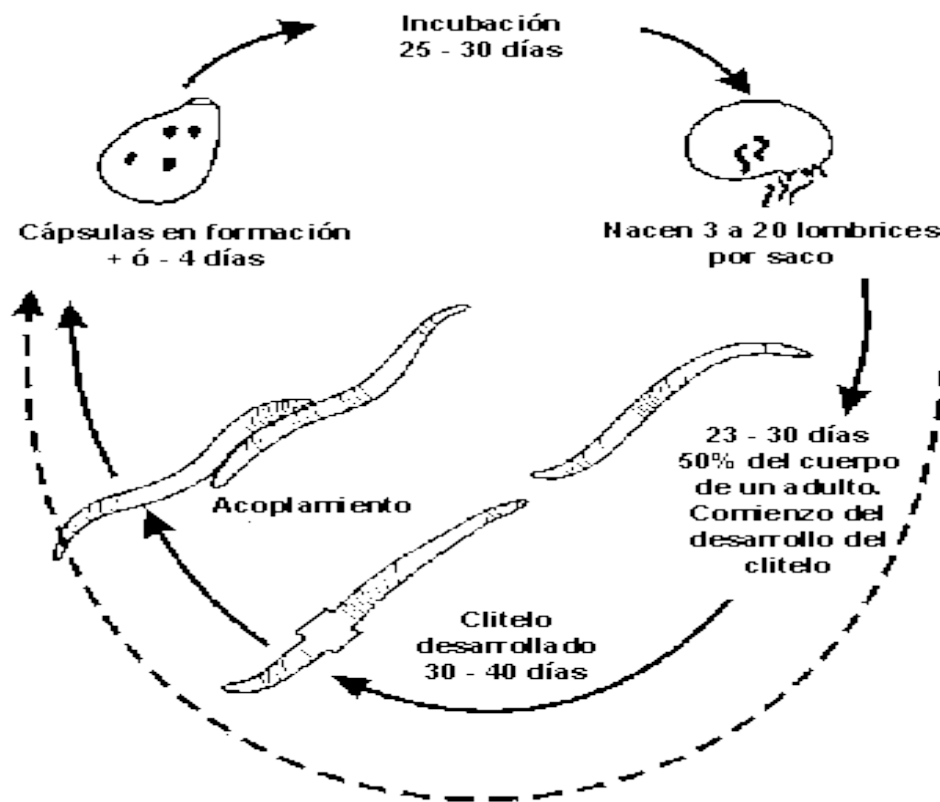


Figura. 2.2- Ciclo reproductivo de la lombriz *Eisenia foetida*

De cada cocón (huevo) depositado salen entre 2 y 20 lombrices que son totalmente independientes, de un tamaño de 1 mm, presentan un color blanco transparente que se vuelve rosado a los 5 ó 6 días, y que pasa definitivamente a rojo oscuro a los 15-20 días (Ambiente, 2006).

Para mantener en condiciones óptimas las lombrices y conseguir un buen vermicompost se necesita que la humedad del sustrato donde viven sea del 80% así, la movilidad y actividad de las lombrices es máxima; a menor humedad el movimiento y su peso disminuye; y a menos de 50% de humedad pueden morir. El medio donde viven las lombrices no debe estar seco ni fangoso. La humedad ideal se reconoce por la apariencia de tierra húmeda, requiriéndose aproximadamente 10 litros por día por cada m² (Montaño, 2009). La aireación debe ser natural, pero suficiente. Las camas de lombrices no deben tener más de 0,5 m de profundidad para facilitar la aireación. Esto

permite el desarrollo de una flora aerobia para la alimentación de las lombrices (Montaño, 2009). La *Eisenia foetida* necesita un sustrato con 1,5% de nitrógeno, el cual excreta en diversas formas aprovechables por las plantas. Si el contenido de nitrógeno en el sustrato supera el 6%, habrá que reducirlo o diluirlo. El contenido de nitrógeno y fijación de otros factores químicos apropiados para la vida de la lombriz se logra con un pre-composteo de la materia orgánica mediante cúmulos o pozas por 15 días aproximadamente (Montaño, 2009).

La temperatura ideal para la *Eisenia foetida* es 25 °C; por encima de 30 °C el crecimiento disminuye; los valores por debajo de 5 °C y encima de 35 °C son fatales para esta lombriz. Por ello, la lombricultura no se recomienda en zonas de climas extremos (Montaño, 2009).

Las lombrices viven debajo de la superficie del suelo, no toleran bien la luz, por lo que deberán de estar en un recipiente cubierto (Ambiente, 2006). En relación al pH, no soportan valores inferiores a 4.5, la acidez les resulta desagradable, aunque algo leve pueden tolerarla (Ambiente, 2006). En cuanto a su alimentación, prefieren los restos vegetales algo descompuestos con una relación C/N relativamente baja, esto hace que presenten una fuerte selectividad con respecto a la vegetación que existe sobre el suelo. Los restos de verduras y frutas de cocina son de su agrado en cuanto a la relación C/N (Ambiente, 2006).

Las lombrices actúan como un aireador, molino, triturador, degradador químico, estimulador biológico y degradador de residuos mediante múltiples acciones, por ello la importancia en biorremediación en la contaminación por xenobióticos. La degradación microbiana de estos contaminantes se acelera drásticamente, por lo que no están disponibles para las plantas y de esta forma no se produce intoxicación ni muerte de éstas.

II.5.-MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LOS BPC's

Los métodos analíticos para BPC's se basan en su separación por medio de cromatografía de gases, usando columnas capilares con diferentes polaridades y detectores específicos, tales como el detector de ionización de llama (FID), el detector de captura de electrones (ECD) y la espectrometría de masas (MS). Estos métodos sirven para identificar y cuantificar los BPC's (Robles, 2005).

- GC-FID: puede llegar a detectar 0.5 ppm de BPC's por cada μL de muestra, pudiendo ser usado como una segunda referencia. Es el más usado y el más sensible (Krupcik, 1992).
- GC-ECD: usado para detectar los congéneres de BPC's presentes en cualquier muestra. Es el más sensible para la detección de compuestos clorados.
- GC-MS: Su sensibilidad es menor que el GC-ECD, tiene una gran selectividad para los BPC's, puede distinguir y medir individualmente los congéneres de BPC's.

II.5.1.-ESPECTROMETRÍA DE MASAS

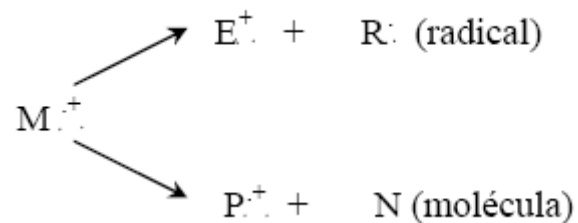
La espectrometría de masas (EM) es una técnica de análisis basada sobre la separación de acuerdo a sus razones masa/carga de las especies cargadas formadas a partir de la ionización de una muestra. Se trata de una técnica extremadamente sensible, de gran versatilidad y cuyos campos de aplicación experimentan un crecimiento vertiginoso en nuestros días. La EM suministra información muy valiosa sobre los compuestos químicos: la masa molecular, la fórmula global y, a partir del patrón de fragmentaciones, la estructura molecular, Así como la composición isotópica en sustancias naturales o marcadas. Debe reiterarse la elevada sensibilidad de la EM (en condiciones muy especiales pueden detectarse señales correspondientes a sólo 10 iones) por lo que es la preferida para la determinación de trazas en química ambiental y en los controles antidopaje.

II.5.1.1.-Principios

Los fundamentos de la espectrometría de masas se basa en el impacto generado por electrones acelerados a través de un campo eléctrico que adquieren energía cinética considerable y pueden interactuar con moléculas (M) para originar especies cargadas:



En este caso $M^{\cdot+}$ es un catión-radical molecular. Normalmente $M^{\cdot+}$ se forma en un estado excitado y puede sufrir fragmentación, que puede ser de diferentes formas:



Los iones E^+ y P^+ a su vez pueden fragmentarse y así sucesivamente. La forma de fragmentación dependerá en cada caso de la estructura molecular. La mayoría de los iones producidos tiene una carga correspondiente a la pérdida de un solo electrón ($e = 1.6 \cdot 10^{-19} \text{ C}$), aunque también se pueden obtener iones multicargados. La carga total de los iones se representa usualmente por q ($q=ze$), donde e es la carga del electrón y z el número de cargas sobre el ión.

El proceso de la espectrometría de masas comprende básicamente cuatro etapas

- Ionización de la muestra.
- Aceleración de los iones por un campo eléctrico.
- Dispersión de los iones según su masa/carga.
- Detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica.

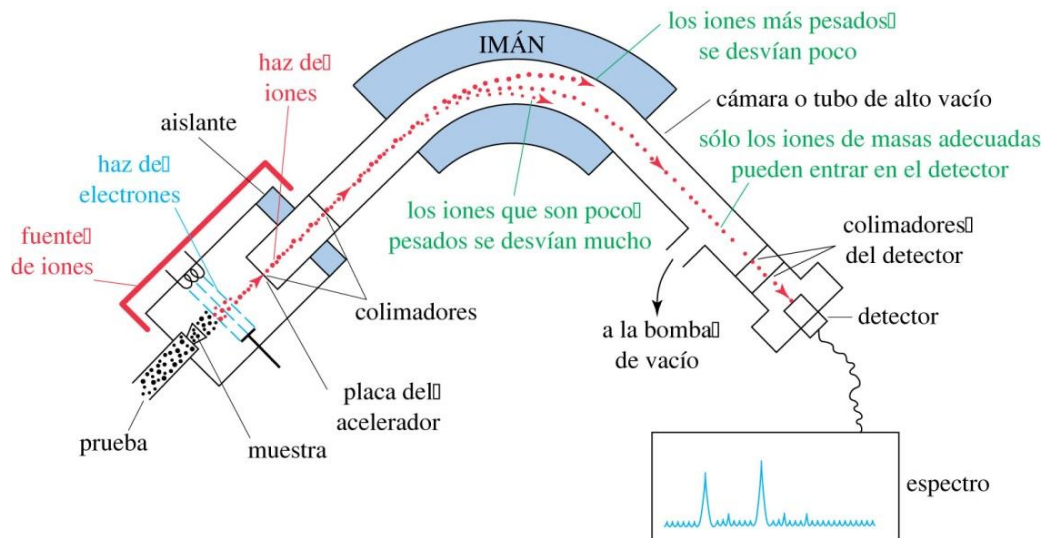


Figura 2.3.- Esquema de funcionamiento de un espectro de masas.

II.5.1.2.-Fuente de ionización

La fuente de iones es el elemento del espectrómetro que ioniza el material a ser analizado (el analito). Luego los iones son transportados por los campos magnéticos o eléctricos al analizador total.

Dos técnicas, usadas a menudo con líquidos y muestras biológicas sólidas, incluyen la ionización por electrospray y el láser Matriz-Asistido Desorción/Ionización (MALDI). Las fuentes inductivas del plasma se utilizan, sobre todo, para el análisis del metal en una amplia gama de los tipos de las muestras. Otras técnicas incluyen la ionización química rápida del bombardeo del átomo (FAB), termo spray, ionización química por presión atmosférica (APCI) y espectrometría de masa de Ion secundario.

II.5.2.-ACOPLAMIENTO CROMATOGRAFÍA-ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La cromatografía es un método utilizado para la separación de mezclas en sus componentes individuales, haciendo que éstos pasen a través de una columna de un sólido o un líquido. Para que ocurra el proceso cromatográfico, son necesarias una fase móvil y una estacionaria. En la cromatografía gaseosa (CG) la fase móvil es un gas y la estacionaria una columna embebida de líquido. El flujo de la fase móvil a través de la estacionaria, fuerza a la mezcla a moverse por la columna cromatográfica.

Por su parte, la espectrometría de masas es un método altamente eficiente para deducir la estructura química de una sustancia.

Para el análisis de mezclas complejas de sustancias se utilizan el acoplamiento CG-EM. La idea esencial es realizar la separación cromatográfica de los componentes de la mezcla, que una vez separados se inyectan en sucesión al espectrómetro de masas para obtener los espectros de cada uno de ellos, tal como se ilustra a continuación (Del Toro, 2001).

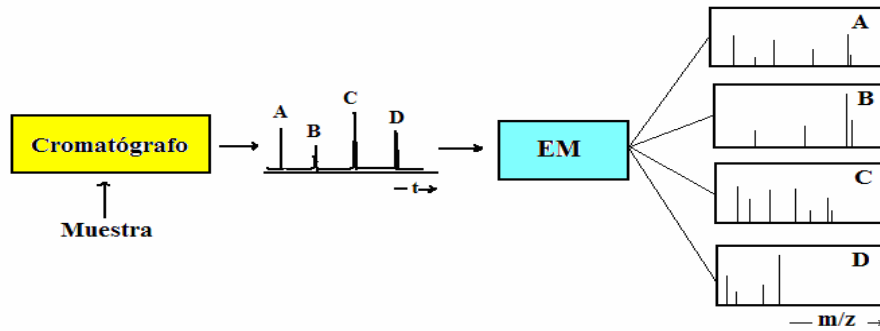


Figura 2.4.- Diagrama de funcionamiento de un sistema cromatógrafo-espectrómetro de masas.

CAPÍTULO III

III.1.-JUSTIFICACIÓN

Las lombrices de tierra son los organismos clave en la descomposición de materia orgánica vegetal, sus poblaciones se expanden en relación a la disponibilidad de la materia orgánica. Debido a su amplia distribución en el suelo, son consideradas organismos muy útiles para la evaluación de la contaminación del suelo, algunos residuos químicos pueden bioacumularse en estos organismos y se pueden distribuir a los tejidos de animales en los niveles tróficos más altos de la cadena alimenticia, también se tiene preocupación por el destino de la larga duración como contaminantes como las dioxinas y los BPC's.

Las lombrices de tienen un papel en la vigilancia biológica, ya que pueden bioacumularse o bioconcentrarse los xenobióticos químicos, y se usan para medir los niveles de metales pesados y compuestos orgánicos persistentes (Tharakan, 2005).

CAPÍTULO III

III.2.-OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el mecanismo de interacción entre los bifenilospoliclorados y el sistema de vermicomposteo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir las estructuras de los productos de degradación de bifenilospoliclorados, detectados en el vermicompostaje por cromatografía de gases y detector de masas.
- Determinar los mecanismos de interacción por los cuales se obtienen productos de degradación.

CAPITULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1.- Preparación de soporte y sustrato

IV.1.1.- Excreta de conejo (sustrato)

Se recolectaron 30 Kg de excreta de conejo en una granja ubicada en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez. Dicha muestra se secó a la sombra durante aproximadamente 48h. Con la muestra seca se procedió con la molienda, utilizando un molino de mano. Se tamizó con malla 100 obteniendo partículas de 0.2 mm. Esto se realizó debido a que durante el experimento se evaluó la cantidad de huevecillos, los cuales tienen un tamaño igual o mayor a 0.5mm.

IV.1.2.- *Peatmoss*(soporte)

Se utilizó *peatmoss* como soporte debido a su gran parecido en cuanto a propiedades físicas de suelo, lo que permite a las lombrices tener mayor área de movimiento y por tanto mayor homogenización del medio y aireación del mismo. Dentro de las características principales de este componente se encuentra su alta retención de humedad, debido a esto y para la estandarización del método a seguir se secó durante 24h.

Se continuó con la molienda y tamizado con malla 100.

IV.2.- Selección de lombrices

Las lombrices utilizadas para las unidades experimentales fueron adaptadas primero al soporte que se utilizó (*peatmoss* y excreta de conejo) durante 15 días en recipientes diseñados para la reproducción de las lombrices, con un ángulo de 3 grados en la base para evitar la acumulación de los ácidos húmicos. Los recipientes estaban bajo sombra y sin cubrir.

Se escogieron lombrices grandes con clitelo desarrollado (maduras sexualmente) y se retiró la máxima cantidad de composta de su superficie. Se pesaron en conjunto (masa inicial) y se introdujeron a las diferentes unidades experimentales.

IV.3.- Preparación de la solución de BPC's

El BPC utilizado fue decaclorobifenilo, debido a que representa el congénere más clorado de todos los existentes conteniendo un átomo de cloro en cada átomo de carbono, 10 en total. Con ayuda de una micro pipeta con capacidad de 1000 μ L, se agregó 1mL de pentano (98%) en el frasco que contenía los BPC's, se agitó y se extrajo con la micro pipeta para pasarlo a un matraz volumétrico de 100mL. Este paso se repitió 5 veces para poder trasvasar toda la muestra del frasco.

Al matraz de 100mL que contenían los BPC's se le agregaron 25 mL de pentano y se agitó cuidadosamente hasta que el contaminante se disolvió por completo. Finalmentese aforó con pentano.

El matraz volumétrico se introdujo a un sonicador, para poder obtener una mezcla homogénea, una vez homogenizada se pasó a un vaso de precipitado de 250mL para poder tomar de ahí las cantidades necesarias para alcanzar las concentraciones de BPC's en cada unidad experimental (100, 150 y 200 ppm).

IV.4.-Diseño experimental utilizado

Para este experimento se utilizó un diseño experimental llamado Arreglo Ortogonal Interno Taguchi L 9, integrado por 4 factores (decaclorobifenilo, Excreta de Conejo, *peatmoss* y lombrices), y 3 niveles para cada factor: 100, 150 y 200 ppm para los BPC's; proporciones soporte: sustrato95:5, 90:10, 85:15, y lombrices variando el número de 3, 5 y 7.

A continuación se detalla el diseño

Tabla 4.1 Diseño experimental tipoTaguchi L9, usado para el vermicompostaje

FACTORES	NIVELES		
Sustrato sólido	15:85 (A)	10:90 (B)	5:95 (C)
Concentración de BPC's (ppm)	100	150	200
Número de lombrices	3	5	7
VARIABLES DE RESPUESTA	Concentración de BPC's (ppm)		

IV.4.1.- Montaje del experimento

Se prepararon unidades experimentales que contenían 50g de *peatmoss*/excreta de conejo, en las diferentes proporciones en frascos con capacidad de 1L, color ámbar de boca ancha.

A continuación se agregó agua destilada a cada unidad experimental hasta alcanzar la humedad del 75 % (200mL), y se homogenizó con ayuda de espátulas.

Posteriormente se agregó la solución de decaclorobifenilo previamente preparada (100, 150 y 200 ppm). Para cada una de las concentraciones, se prepararon 60 unidades experimentales (U.E.) además de los controles negativos bajo las mismas condiciones, haciendo un total de 225 unidades experimentales. Se culminó la preparación con una perfecta homogenización con el uso de abate lenguas.

Se inocularon diferentes cantidades de lombrices adultas (3, 5, 7), con clitelo desarrollado, en cada una de las diferentes proporciones, esto después de eliminar el disolvente, lo cual se logró colocando las unidades experimentales en una campana de extracción por 48 horas. Los frascos se taparon con pañalina para impedir que las lombrices salieran y permitir el paso del aire.

Se realizaron tomas de muestra a los 7, 28, 49, 70 y 91 días para monitorear la concentración de decaclorobifenilo (BPC), peso final de lombrices (biomasa), número de huevecillos, número de lombrices y alguna observación en especial (color, actividad, etc.).

Los frascos se mantuvieron en incubación a 25°C y se observó el comportamiento de las lombrices.

IV.4.2.-Extracción de BPC's

De las unidades experimentales se pesaron 45 gramos de sólido (soporte:sustrato) en un recipiente de aluminio y se colocaron en un horno marca FELISA a 70 °C por 24 horas. Una vez terminado este proceso, se pesaron por duplicado las muestras de 15g y se pasaron a tubos Falcon de 50mL. Se agregaron 20mL de pentano (98%) y se agitó con ayuda de un

equipo Vortex durante 5min, después se sonicó durante 40 min (Ultrasoniccleaner 08855-00 Cole Parmer) (los tubos deben estar destapados y sin tocar las paredes del equipo). Se centrifugó (Eppendorf 5810r) a 4000 rpm durante 15min a 25 °C, esto para evitar alguna pérdida de compuestos; por último se vació el sobrenadante en un tubo Falcon de 50mL. Este procedimiento se realizó dos veces más utilizando el mismo sólido.

Los extractos obtenidos de las tres repeticiones se concentraron en un tubo Falcon de 50 mL. Se dejaron evaporar en la campana de extracción hasta tener un volumen de 1mL aproximadamente, y se guardaron en refrigeración (4°C) para su posterior análisis.

IV.4.3.- Tratamiento a la lombriz

El tratamiento a la lombriz se realizó de manera simultánea al del soporte. El primer paso fue sacar las lombrices de los frascos y lavarlas con agua destilada para quitar el soporte que se le haya adherido. Posteriormente se observaron las características físicas de las lombrices, como el color, tamaño y peso. Se dejaron las lombrices en un vaso de plástico con tapa durante 24h para que excretaran el sustrato que aún tenían en su tracto digestivo.

Pasadas las 24h se congelaron con nitrógeno líquido, se agregó el doble de su peso en sulfato de potasio y se trituro hasta obtener un polvo fino. Posteriormente se introdujo el polvo a un tubo Falcon de 50mL y se agregaron 15mL de pentano (98%) y se agitó con ayuda de un equipo Vortex durante 5min, después se pasaron a un sonicador (los tubos deben estar destapados y sin tocar las paredes del equipo) durante 40min. Una vez terminado este proceso se centrifugó a 4000 rpm durante 15min a 25°C. Finalizada la centrifugación se vació el sobrenadante en un tubo Falcon de 50mL. El tratamiento de extracción se realizó por triplicado a cada uno de los tubos.

Los extractos obtenidos de los tres se concentraron en un solo tubo Falcon. Se dejaron evaporar en la campana de extracción hasta tener un volumen de 1mL aproximadamente, y se guardaron las muestras en refrigeración para su posterior análisis.

IV.5.- Cuantificación de BPC's

Se tomaron los tubos Falcon con la muestra extraída y concentrada en 1 mL aproximadamente para resuspenderlas en 5mL de pentano (98%), utilizando una micro pipeta de 200 μ L. La muestra seagitó durante 5min en un Vortex para una mejor homogenización. El siguiente paso fue la inyección de la muestra (1 μ L) mediante una microjeringa de 10 μ L a un cromatógrafo de gases (GC) marca Agilent Technologies modelo 5975 con detector de espectrometría de masas (EM) modelo 597C VLMSD, empleando una columna cromatográfica PE-XLB con dimensiones 30m x 0.25 μ m x 0.25mm, utilizando como gas acarreador He a 16 psi, la temperatura de inyección fue de 110°C, la del detector de 150°C y la temperatura inicial 110°C por 0.5 min. El programa de temperaturas fue de 110°C - 300°C - 15°C/min y de 300°C - 320°C por 5 min y la temperatura final fue de 320°C, mientras que el flujo se mantuvo a 1.4 mL/min.

Previamente a la lectura de las muestras en el CG se realizó una curva patrón con concentraciones de BPC's conocidas de 50-1000ppm, usando pentano como solvente.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1.-Degradación de decaclorobifenilo

Se llevaron a cabo los experimentos de 100 y 150 ppm, en donde se evaluó la degradación de decaclorobifenilo, usando a *Eiseniafoetida*, en vermicomposta formada por excreta de conejo y *peatmoss* en diferentes proporciones (85/15, 90/10 y 95/5), tomando muestras los días 7, 28,49, 70 y 91, evaluando la concentración de decaclorobifenilo por el método EPA 8082 utilizando un cromatógrafo de gases con detector de masas.

Se observa en el gráfico 1, el experimento a 100 ppm en el cual se puede observar que no hay diferencia estadística significativa respecto al número de lombrices que se agregan a las unidades experimentales, lo que nos indica que la degradación, no va en función a estas, sino al tiempo que se mantiene en contacto con el contaminante. En estas condiciones se observa una remoción del decaclorobifenilo del 77.61% después de 91 días de vermicomposteo.

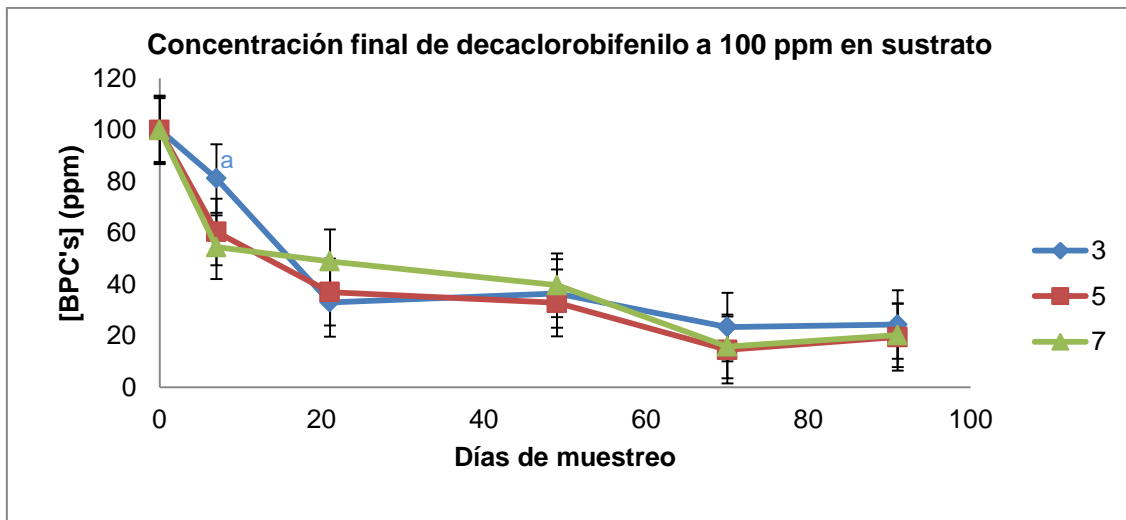


Figura 5.2.- Curva de degradación de decaclorobifenilo 100 ppm.

El mismo fenómeno sucede en el gráfico 2(150 ppm, 91 días), este experimento obtuvo una remoción del 88.17%, comprobando que la degradación va en función del tiempo. *Tharakan et al.*, (2005), reportan resultados parecidos, usando *Eiseniafoetida* en camas de lodos proveniente de superficies contaminadas del lago Ralston Street, Gary en Estados

Unidos, reportando una degradación del 66% de mezclas de BPC's. Contreras-Ramos *et al.*, (2008); usó hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's), tales como fenantreno (Phen), benzo α pireno (BaP) y antraceno (Anth), usando a *Eisenia foetida* en superficies estériles y no estériles de suelos contaminados durante 70 días, teniendo como resultado un porcentaje de remoción en suelo estéril del 100% de Phen, 63% de Anth y 58% de BaP; y en suelo no estéril un 91% de Anth, 16% BaP y 99% Phen. Por ello se considera que la aplicación de lombrices de tierra en un sitio contaminado podría ser una alternativa de eliminación de hidrocarburos en el suelo.

Cabe destacar que *Eisenia foetida* contiene microorganismos en su tracto digestivo capaces de degradar hidrocarburos, como se observa en los estudios descritos anteriormente. Si las lombrices se adicionan a suelo contaminado, se mejoran las condiciones de aireación y se estimula la actividad microbiana, aumentando la biodegradación de los mismos (Contreras-Ramos *et al.*, 2006). Es bien conocido que bacterias como *Alcaligenes eutrophus* H850, *Pseudomonas* sp LB400, *Alcaligenes* sp. M5 y *Acinetobacter* sp., son capaces de degradar BPC's bajo condiciones anaeróbicas-aeróbicas (Tharakan, 2004).

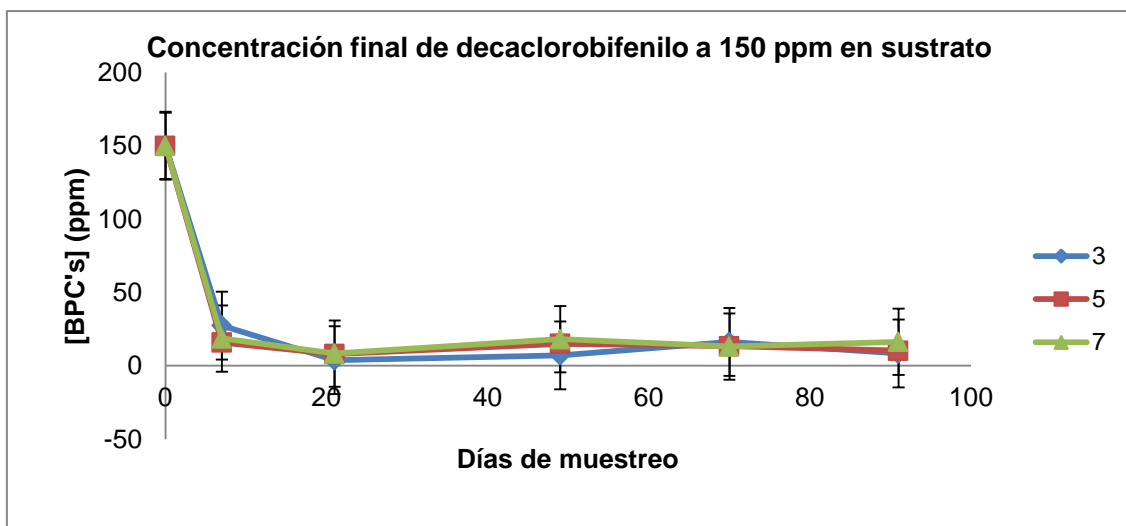


Figura 5.2- Curva de degradación de decaclorobifenilo 150 pm.

V.2.- Identificación de compuestos orgánicos presentes en los componentes de la vermicomposta.

Los compuestos identificados en los componentes del sistema, antes de exponerlos al decaclorobifenilo fueron detectados utilizando cromatografía de gases acoplado a masas y presentan grupos funcionales variados, tales como alcanos, ácidos carboxílicos, aldehídos, cetonas y ésteres, todos deshalogenados. En la tabla 2 se presentan los compuestos identificados, la matriz y su tiempo de retención (t_r) en minutos.

Tabla 5.1.- Compuestos presentes en excreta de conejo, *peatmoss* y lombriz, introducidos en la vermicomposta donde t_r = Tiempo de retención.

Excreta de conejo (t_r , min)	Peatmoss (t_r , min)	Lombriz (t_r ; min)
Etil-iso-alocolato (12.51)	Betulina (13.61)	9-octadecenamida (11.48)
13-heptadecin-1-ol (10.35)	13-heptadecin-1-ol (10.35)	Ácido oleico (8.84)
6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (8.01)	Hentriacontano (7.13, 8.32)	Colesterol (15.90)
3-etil-5-(2-etilbutil)-octadecano (14.03, 13.05)	Ácido erúcico (12.50)	Ácido-2-oxo-etil-éster-tetradecanoico (11.64, 14.60)
	3-etil-5-(2-etilbutil)-octadecano (10.96)	3-etil-5-(2-etilbutil)-octadecano (10.96)

Además de los compuestos descritos en la tabla 5.1, se encontraron en las tres materias primas (excreta de conejo, *peatmoss* y lombriz) los siguientes compuestos comunes 1,3-bis (1,1 dimetiletil) benzeno (3.36 min), tetradecano (4.47 min), hexadecano (6.09), ácido octadecanoico (7.60), 2,4 bis (1,1 dimetiletil) fenol (5.50 min), heptadecano (6.80), heptacosano (8.61 min). Las estructuras se pueden observar en el anexo 1.

El espectro del contaminante tuvo un tiempo de retención de 14.30 minutos teniendo una variación +/- 0.04, esto se observa en la figura 5 (flecha negra).

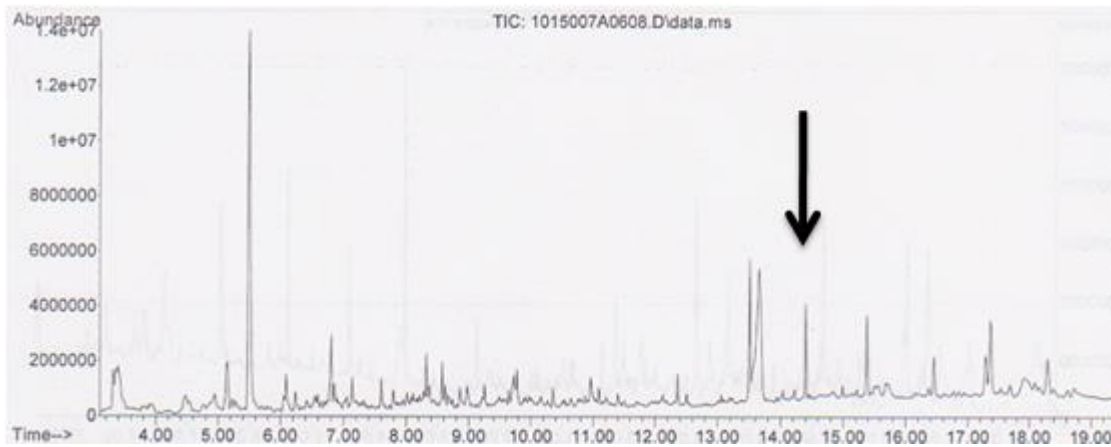


Figura5.3.- Cromatograma de sustrato proveniente del muestreo del día 7 (150 ppm, 7 lombrices, sustrato A)

Después de terminado el experimento, se hizo el análisis de los espectros de masas obtenidos, haciendo una eliminación de los compuestos caracterizados previamente; los compuestos que son productos de degradación de decaclorobifenilo se muestran a continuación

V.2.1.-Ácido ascorbico-2,6-dihexadecanoato.

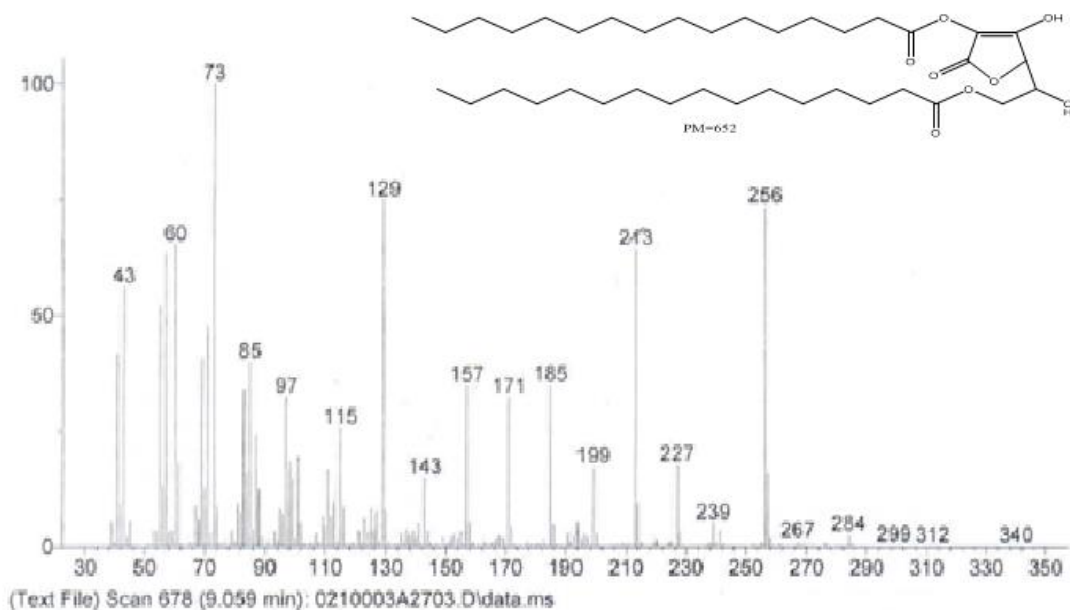
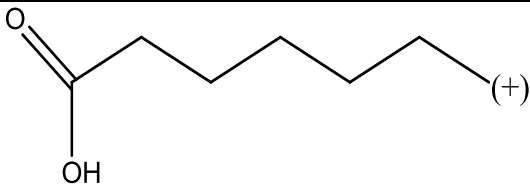
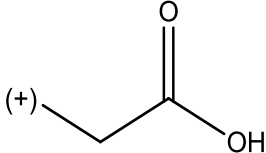


Figura 5.4.- Patrón de fragmentación de ácido ascórbico-2.6- dihexadecanoato.

Tabla 5.2.- Fragmentos de ácido ascórbico -2,6-dihexadecanoato.

Fragmento	m/z
	129
	73

En la figura 5.4, se observan el espectro de masa del ácido ascórbico -2,6-dihexadecanoato; proveniente del muestreo del día 7, (100 ppm, 3 lombrices, sustrato A), el cual coinciden con el ácido-2-hidoxi-6-oxo-6-(2-hidroxifenil)-2,4-hexadecanoico: producto de degradación de 2-hidroxifenil, reportado por Sondossi, (1991), usando a *Pseudomonas toteroni* B-356; cuyos fragmentos coincidentes son $m/z = 73$ ($\text{COOH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-M}$) y $m/z = 129$ ($\text{COOH-(CH}_2)_5\text{-CH}_2\text{-M}$); lo cual nos indica que ambos compuestos son productos de la meta ruptura.

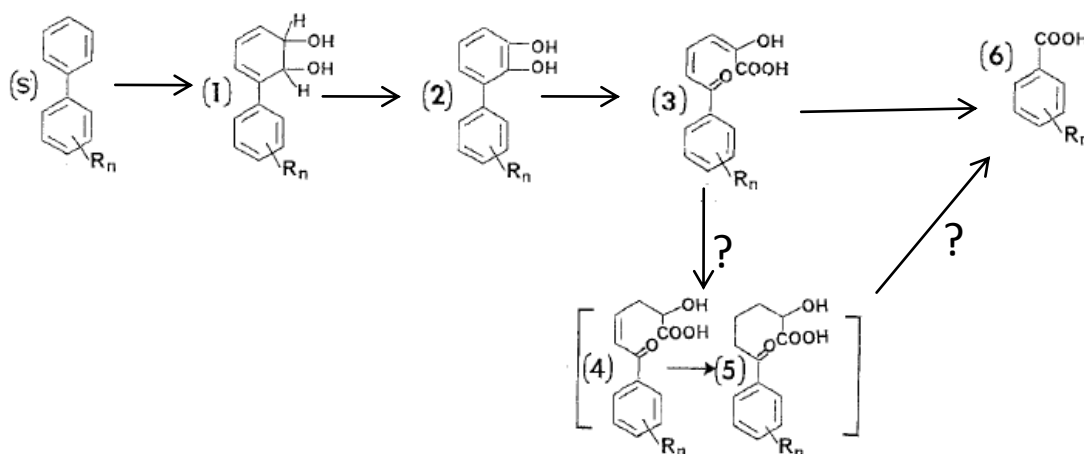


Figura 5.5.-Principal vía catabólica para degradación bacteriana de bifenilos y bifenilos sustituidos, R= H, Cl, OH.

Se observa en la figura 5.5, la ruta de degradación de meta ruptura, la cual es la principal ruta de degradación de BPC's, en donde se lleva a cabo una dioxigenación preferentemente en el anillo no sustituido, el anillo dihidroxilado es subsecuentemente atacado en la posición *meta*. Un conjunto de enzimas se

encarga de hidrolizar al anillo produciendo ácidos clorobenzoicos (Sondossi, 1991).

El compuesto reportado por Sondossi, (1991); se obtuvo bajo condiciones de incubación en presencia del sustrato con *Pseudomonas putida* KT2440.

V.2.2.-2- bromometil-4,4'-dimetil-3-(3-oxobut-1-enil) ciclohexano-2-enilato de formilo.

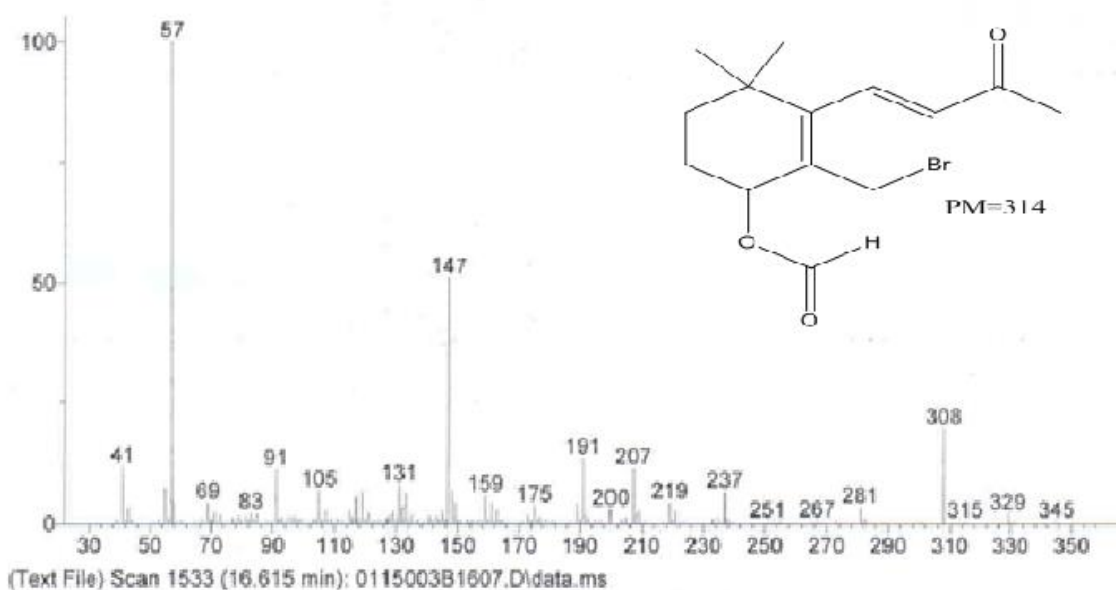


Figura 5.6.- Patrón de fragmentación de -2- bromometil-4,4'-dimetil-3-(3-oxobut-1-enil) ciclohexano-2-enilato de formilo.

Tabla 5.3.- Fragmentos de -2- bromometil-4,4'-dimetil-3-(3-oxobut-1-enil) ciclohexano-2-enilato de formilo.

Fragmento	m/z
	105
	57

En la figura 5.6, se observa el patrón de fragmentación del -2- bromometil-4,4'-dimetil-3-(3-oxobut-1-enil) ciclohexano-2-enilato de formilo, proveniente del muestra del día 7, (150 ppm, 3 lombrices, sustrato B); este compuesto coincide con el reportado por Bedard *et al.*, 1987, en donde se usó como sustrato 2,3,2',5'-tetracloro bifenilo, empleando a *Alcaligenes eutropus H850* como agente degradador, dando como producto de degradación 2',3' -cloroacetofenona; cuyos fragmento coincidentes son $m/z= 105$ ($C_6H_5-CH-M-CH_3$) y fragmento $m/z=57$ (CH_3-CO-M).

V.2.3.-1,4-epoxy-1- (2H)-metanol-4, 5,7-tris (1,1-dimetil)-3,4-dihidro naftaleno

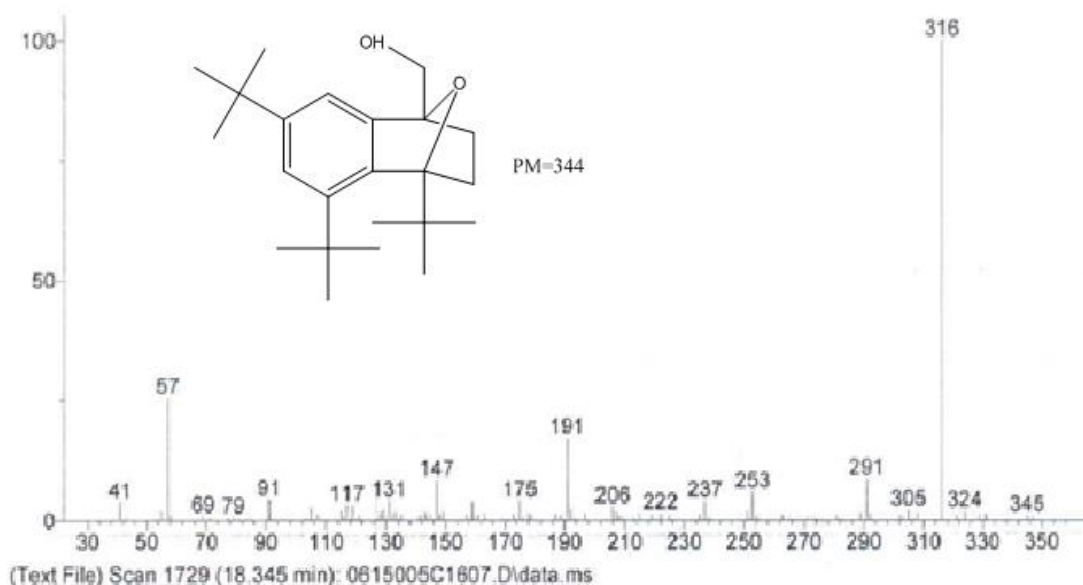


Figura 5.7- Patrón de fragmentación de 1,4-epoxy-1- (2H)-metanol-4, 5,7-tris (1,1-dimetil)-3,4-dihidro naftaleno.

Tabla 5.4.- Fragmentos de 1,4-epoxy-1- (2H)-metanol-4, 5,7-tris (1,1-dimetil)-3,4-dihidro naftaleno.

Fragmento	m/z
	69
	57

En la figura 5.7, se muestra el patrón de fragmentación de 1,4-epoxy-1- (2H)-metanol-4,5,7-tris (1,1-dimetil)-3,4-dihidro naftaleno proveniente del muestreo del día 7 (150 ppm, 5 lombrices, sustrato C); este compuesto coincide con el reportado por Bedard *et al.*, 1987, en donde se usó como sustrato 2,3,2',5'-tetracloro bifenilo, empleando a *Alcaligenes eutropus H850* como agente degradador, dando como producto de degradación 2',3' -cloroacetofenona; cuyos fragmentos coincidentes son $m/z=57$ ($\text{CH}_3\text{-CO-M}$) y $m/z= 69$ ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-M}$).

V.2.4.-1,5-Bis (4-metoxi fenil) biciclo (3,2,0) heptano

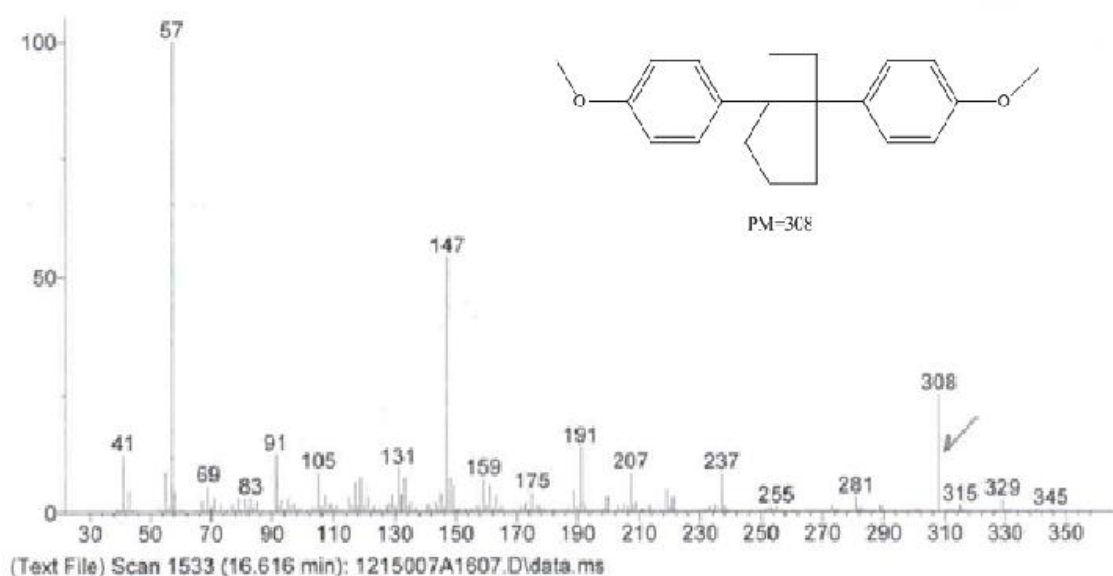


Figura 5.8- Patrón de fragmentación de 1,5-Bis (4-metoxi fenil) biciclo (3,2,0) heptano.

Tabla 5.5.- Fragmentos de 1,5-Bis (4-metoxi fenil) biciclo (3,2,0) heptano.

Fragmento	m/z
	105
	57

Se observa en la figura 5.8 el patrón de fragmentación de 1,5-bis (4-metoxi fenil) biciclo (3,2,0) heptano proveniente del muestro del día 7, (150 ppm, 7 lombrices, sustrato A); este compuesto coincide con el reportado por Bedard *et al.*, 1987, en donde se usó como sustrato 2,3,2',5'-tetracloro bifenilo, empleando a *Alcaligenes eutropus H850* como agente degradador, dando como producto de degradación 2',3' -cloroacetofenona; cuyos fragmento coincidente son $m/z = 105$ ($C_6H_5-CH-M-CH_3$) y $m/z = 57$ ($CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-M$).

V.2.5.-3,5-diciclohexil-4-hidroxi benzoico de metilo

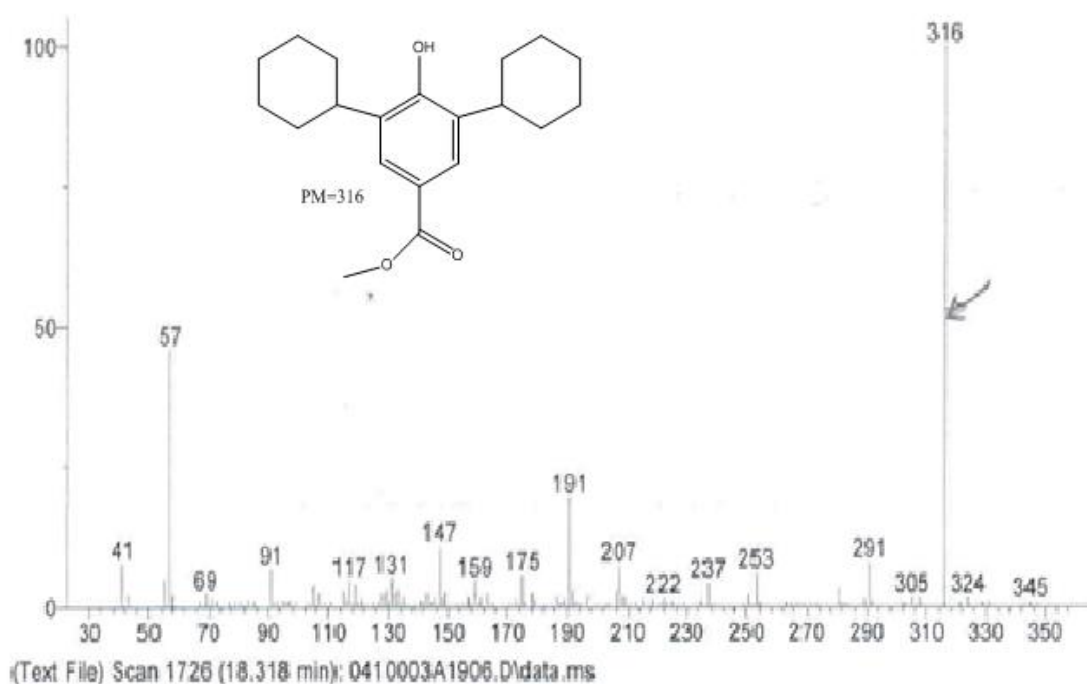


Figura 5.9.- Patrón de fragmentación de 3,5-diciclohexil-4-hidroxi benzoico de metilo.

Tabla 5.6.- fragmentos de 3,5-diciclohexil-4-hidroxi benzoico de metilo

Fragmento	m/z
	69
	57

En la figura 5.9 se observa el patrón de fragmentación de 3,5-diciclohexil-4-hidroxi benzoico de metilproveniente del día 70 (100 ppm, 3 lombrices, sustrato A); este compuesto coincide con el reportado por Bedard *et al.*, 1987, en donde se usó como sustrato 2,3,2',5'-tetracloro bifenilo, empleando a *Alcaligenes eutropus H850* como agente degradador, dando como producto de degradación 2',3'-cloroacetofenona; cuyos fragmentos coincidentes son $m/z=57$ ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-M}$) y $m/z=69$ ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-M}$).

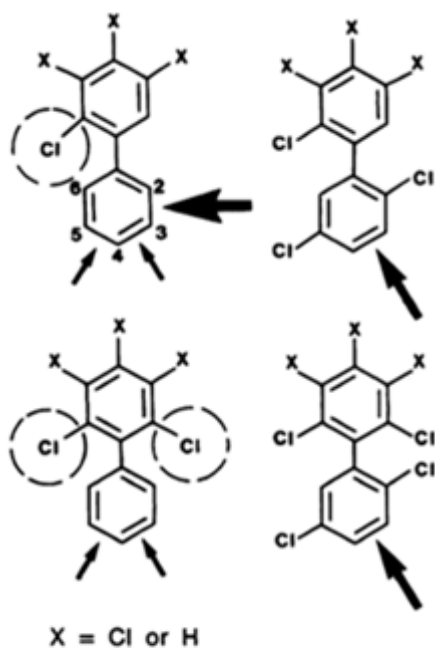


Figura 5.10.- Modelo propuesto para la degradación de BPC's

La principal característica de estos compuestos, radica que son productos de la vía de metabolismo 2,3, dioxigenasa, la cual se cree que es la probable responsable de la oxidación de algunos congéneres de BPC's; Bedard *et al.*, 1987 proponen el siguiente modelo de degradación de BPC's (Figura 5.10).

De acuerdo con este modelo; los congéneres que contienen un anillo no sustituido son degradados por la enzima 2,3 dioxigenasa; sin embargo cuando ambos anillos están sustituidos en especial en la posición *orto*, se presenta

el fenómeno de impedimento estérico. La ruta de degradación más rápida cuando los anillos están *di-orto*-sustituidos, es cuando la sustitución está en la posición 2,5- o 3- cloro bifenilo, sugieren que estos congéneres pueden ser degradados por una enzima capaz de oxidar al carbono de la posición 3,4 (o 5,6) y esta enzima prefiere un anillo sustituido en la posición 2,3- o 3- cloro bifenilo (Bedard *et al.*, 1987).

V.2.6.-9H-Flouren-9-dicholorometil-3,6-difluoro

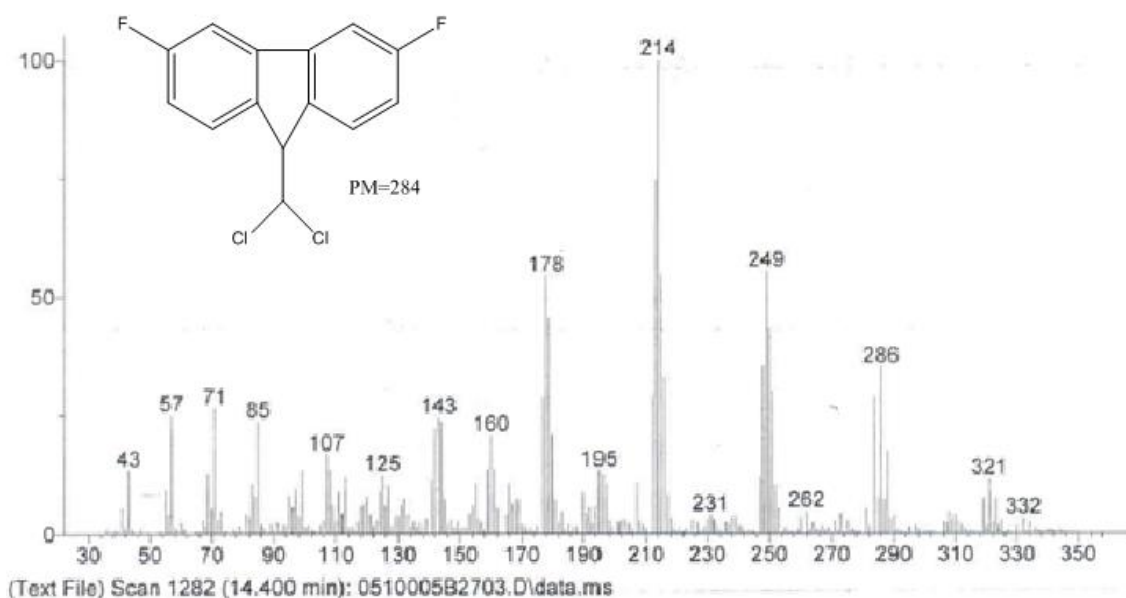




Figura 5.11.- Patrón de fragmentación de 9H-Flouren-9-dicholorometil-3,6-difluoro.

Tabla 5.7.- Fragmentos de 9H-Flouren-9-dicholorometil-3,6-difluoro.

Fragmento	m/z
 (+)	85
 (+)	43

En la figura 5.11, se observa el patrón de fragmentación de 9H-Flouren-9-dicholorometil-3,6-difluoro, proveniente del día 7 (100 ppm, 5 lombrices, sustrato B); este compuesto coincide con el reportado por Bedardet *al.*, 1987, usando como sustrato 2,4,5, 2',4',5' hexaclorobifenilo, empleando a *Alcaligenes eutrophus H850*, teniendo como producto de degradación 2,3,4 tricloroacetofenona; los fragmentos que coinciden son m/z= 85 (CH₃-(CH₂)₄-CH₂-M) y m/z=43 (CH₃-CH₂-CH₂-M).

V.2.7.-1-Ciclohexil-2-metil-prop-2-en-1-ona

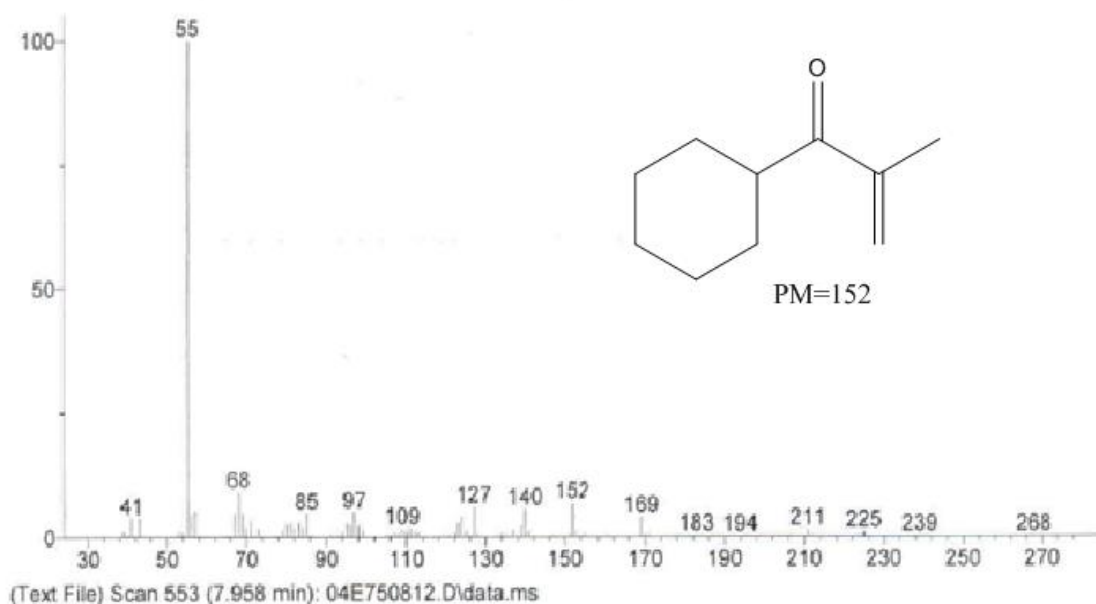
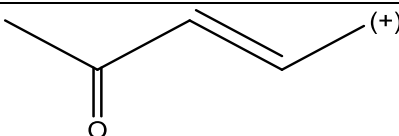
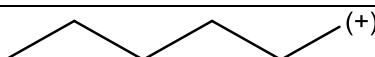


Fig. 5.12.- Patrón de fragmentación de ciclohexil-2-metil-prop-2-en-1-ona

Tabla 5.8.- Fragmentos de ciclohexil-2-metil-prop-2-en-1-ona

Fragmento	m/z
	97
	85

Se observa el patrón de ciclohexil-2-metil-prop-2-en-1-ona proveniente del experimento estéril de 75 ppm; este compuesto coincide con el reportado por Bedardet *al.*, 1987, usando como sustrato 2,4,5, 2',4',5' hexaclorobifenilo, empleando a *Alcaligeneseutrophus H850*, teniendo como producto de degradación 2,3,4 tricloroacetofenona; sus fragmentos coincidentes son m/z= 85 (CH₃-(CH₂)₄-CH₂-M) y m/z= 97 (CH₃-CO-CH₂-CH=CH-CH₂-M),

V.2.8.-Miristato de (1,3-diacetil)-2-propilo

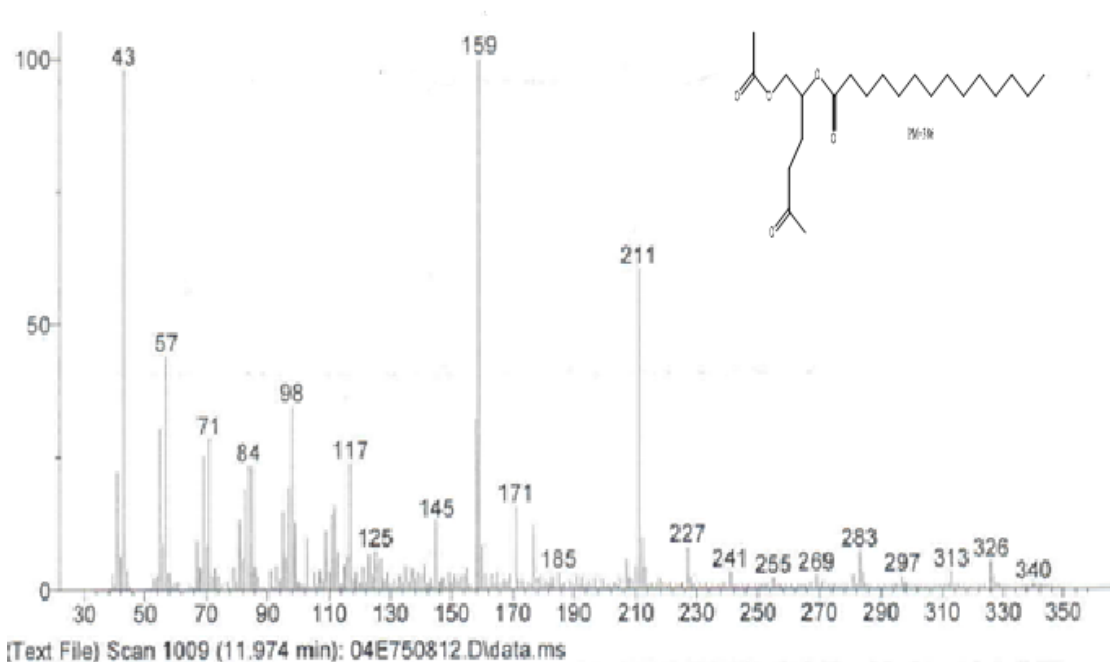


Figura 5.13.- Patrón de fragmentación de miristato de (1,3-diacetil)-2-propilo.

Tabla 5.9.- Fragmentos de miristato de (1,3-diacetil)-2-propilo.

Fragmento	m/z
	84
	43

Se observa el patrón de fragmentación de miristato de (1,3-diacetil)-2-propilo proveniente del experimento estéril de 75 ppm; este compuesto coincide con el reportado por Bedardet *al.*, 1987, usando como sustrato 2,4,5, 2',4',5' hexaclorobifenilo, empleando a *Alcaligeneseutrophus H850*, teniendo como producto de degradación 2,3,4 tricloroacetofenona; los fragmentos que coinciden son m/z= 84 (CH₃-CO-CH₂-CH=CH) y m/z=43 (CH₃-CO-M).

En el caso de estos compuestos se han propuesto cuatro probables rutas de degradación, la primer ruta propone que la enzima dioxigenasa ataca en un sitio clorado del anillo aromático, sin embargo esto no ha sido demostrado; estudios hechos por Bedardet *al.*, 1986 y Bopp, 1986 han evidenciado que *Alcaligeneseutrophus H850* y *Pseudomonasputida LB400* presentan enzimas capaces de atacar a un carbono clorado; una segunda opción consiste en el metabolismo de monooxigenasa a través de un epóxido, esta ruta es común del metabolismo de una gran variedad de compuestos aromáticos en células eucariotas, incluyendo a 4,4'-bicloro bifenilo y 2,5,2',5'- tetraclorobifenilo, se cree que es responsable de la oxidación de 2,4,5,2',4',5'- hexaclorobifenilo. Este mecanismo de oxidación también se produce en células procariontas; otro posible mecanismo es la oxidación de 2,4,5,2',4',5'-hexaclaro bifenilo, el cual implica la hidroxilación óxido no areno, llevado a cabo por una monooxigenasa, muy probablemente por contacto directo, esto haciendo la inserción de un átomo de oxígeno en un enlace carbono-hidrógeno; finalmente la sustitución directa de un cloro por un grupo hidroxilo. Se ha demostrado en el caso de ácido-3-clorobenzoico en *Pseudomonas* sp., y para ácido-4-cloro benzoico en *Artherbacterium Nocardias* sp., en al menos un caso, el grupo hidroxilo se derivó de agua, no, de oxígeno molecular y el desplazamiento fue catalizado por una hidroxilasa (Bedardet *al.*, 1987).

Este experimento reportado por Bedardet *al.*, 1987; se llevó a cabo por medio de incubación de *Alcaligeneseutrophus H850*, en un medio el cual contenía 2,4,5, 2',4',5' hexaclorobifenilo y otro, el cual contenía 2,3,2',5'-tetracloro bifenilo, ambos experimentos se incubaron por 72 horas a 30° C a 250 rpm en un agitador giratorio, pasadas las 72 horas, se pasó a su respectiva extracción y análisis en cromatografía en gases acoplada a masas.

V.2.9.-4, 2- ácido cresótico, 6-metoxi-bimol, ester, metil, ester -4, 6- dimetoxi-o-toluato

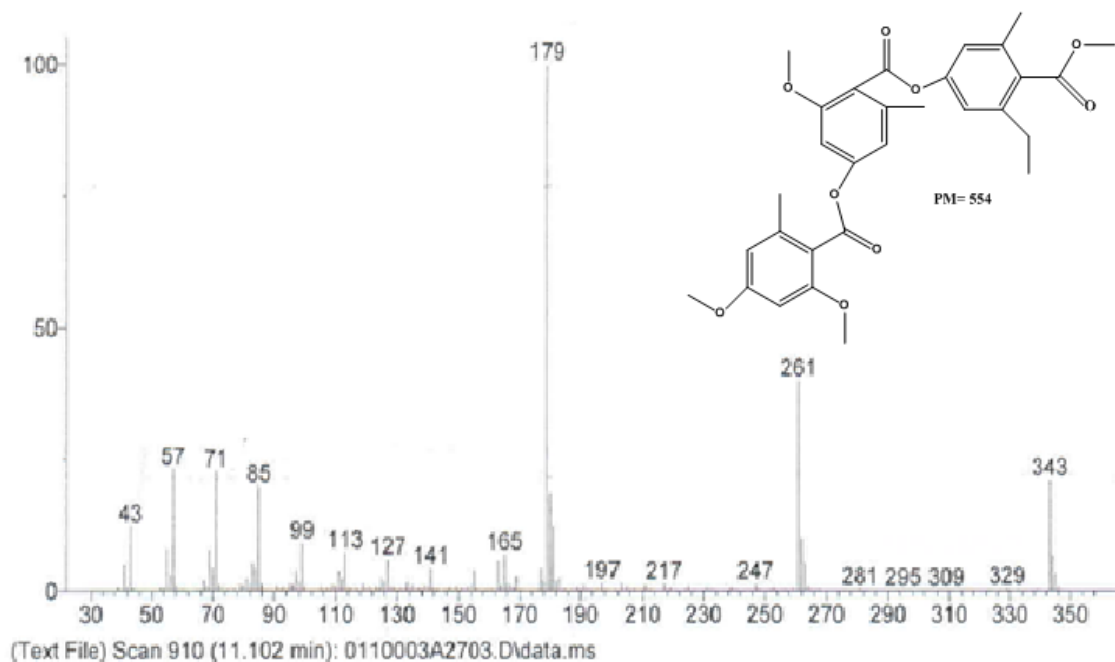


Figura 5.14.- Patrón de frgmentación de 4, 2- ácido cresótico, 6-metoxi-bimol, ester, metil, ester -4, 6- dimetoxi-o-toluato

Tabal 5.10.- Fragmentos de 4, 2- ácido cresótico, 6-metoxi-bimol, ester, metil, ester -4, 6- dimetoxi-o-toluato.

Fragmento	m/z
	99
	85

En la figura 5.14, se observa el patrón de fragmentación de 4, 2- ácido cresótico, 6-metoxi-bimol, ester, metil, ester -4, 6- dimetoxi-o-toluato proveniente del día 7 (100 ppm, 3 lombrices, sustrato A), el cual coincide con el reportado por Arensdorf y Focht, 1995, cuyo sustrato fue 4-clorocatecol, empleando a *Pseudomonacepacia P166*, obteniendo como producto de degradación ácido-5-

cloro-4-hidroxi-2-oxo pentanoato, cuyos fragmentos coincidentes son $m/z = 99$ ($\text{CH}_3\text{-O-CO-CH=CH-CH}_2\text{-M}$) y $m/z = 85$ ($\text{CH}_3\text{-O-CO-CH=CH-M}$).

El compuesto obtenido, es producto de la *meta* ruptura, como se representa en

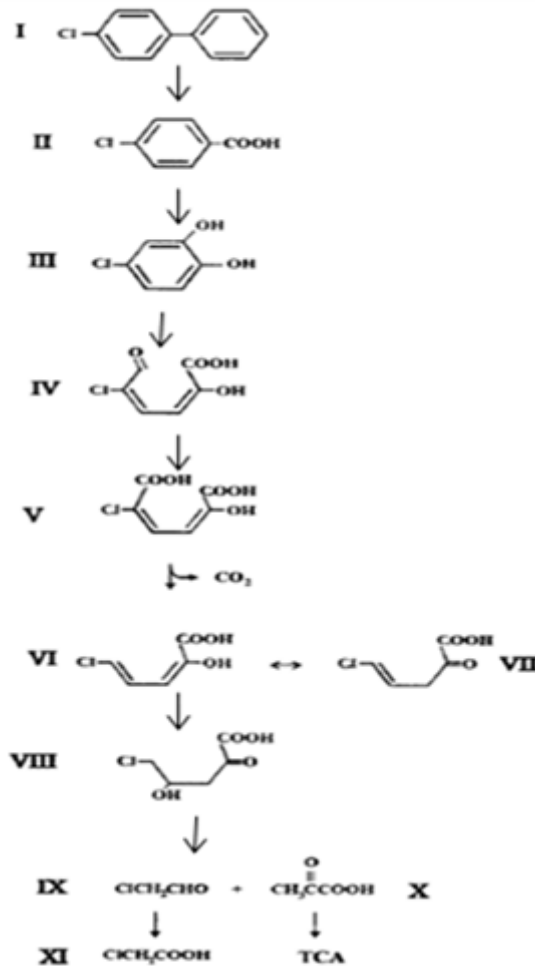


Figura 5.15.- Ruta propuesta para el catabolismo de 4-CB, I.- Clorobifenilo, II.-4. clorobenzoico, III.-4-cloro catecol, IV.-5-cloro-2-hidroximuconico semialdehido, V.-Ácido-5-cloro-2-hidroximuconico, VI.-Ácido-5-cloro-2-hidroxipent-2,4-dienoico, VII.-Ácido-5-cloro-2-oxopent-4-enoico, VIII.-Ácido-5-cloro-4-hidroxi-2-oxopentanoico, IX.- Cloro acetaldehido, X.- Ácido pirúvico, XI.-Ácido cloroacético, TCA (ácido ciclo tricloro acético)

el Esquema 3. El 4-clorobifenilo es metabolizado por meta ruptura a 4-clorocatecol, esta ruta ha sido extensivamente estudiada por Maset *al.*, 1997 y Ahmad *et al.*, 1990; una ruptura hidrolítica convierte a 5-cloro-2-hidroxi muconico semialdehido. La encargada de producir ácido-5-cloro-2-hidroximuconico es una hidrolasa, mientras que la descarboxilasa produce ácido-5-cloro-2-hidroxipent-2,4-dienoico, una isomerasa genera ácido-5-cloro-2-oxopent-4-enoico; por medio de la enzima hidratasa se produce ácido-5-cloro-4-hidroxi-2-oxopentanoico, y finalmente la enzima aldolasa rompe y produce cloro acetaldehído y ácido pirúvico, los cuales se degradan a ácido tricloro acético y ácido cloroacético, respectivamente.

Se describió una posible ruta, la cual nos da un compuesto pequeño, sin embargo el compuesto reportado es

más grande, esto se debe a la interacción que hay entre la lombriz, *peatmoss* y excreta de conejo, al momento de degradarse, se une con otros compuestos presentes (Arendorf y Focht, 1995).

Para la obtención del producto reportado por Arendorf y Focht, 1995; la cepa

de *Pseudomonacepacia P166*, se inoculó en un medio de sales minerales suplementando con 4-clorobifenilo, se mantuvo a 28°C a 225 rpm por 25 horas, pasadas las 25 horas se pasó a la extracción y cuantificación por medio de cromatografía de gases acoplada a masas.

V.2.10.-2-(7-hidroximetil-3,11-dimetil dodeca-2, 6,10-trienil)-1,4-benzoquinona

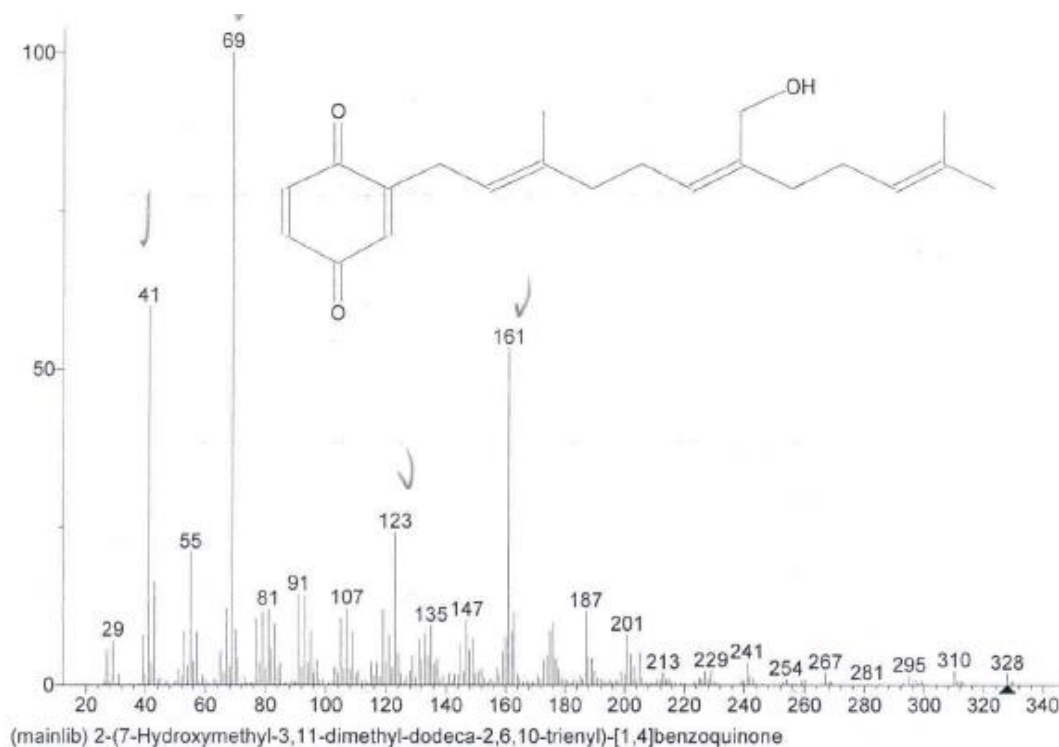


Figura5.16.- Patrón de fragmentación de 2-(7-hidroximetil-3,11-dimetil dodeca-2, 6,10-trienil)-1,4-benzoquinona.

No se encontró en la literatura ningún reporte para este compuesto, sin embargo se reporta la producción de benzoquinonas a partir de BPC's, por medio de la generación de radicales semiquinona (SQ*) por oxidación/reducción de hidroquinonas(H₂Q) y quinonas (Q).

Existen varias rutas, una de ellas es la ruta xantina oxidasa, por medio de un electrón reducido de la quinona, dará su correspondiente radical semiquinona, la tirosinasa (TYR) es una enzima que contiene cobre, y se encuentra en los tejidos de plantas y animales. En la reacción, la tirosinasa cataliza la oxidación de una molécula de BPC *orto*-hidroquinona a su quinona con la reducción de

media molécula de oxígeno formado una molécula de H₂O. Esta introducción de quinona permitirá la formación de SQ* a través de la comproporciónación de hidroquinona y quinona (Figura 5.17) (Song *et al*, 2008).

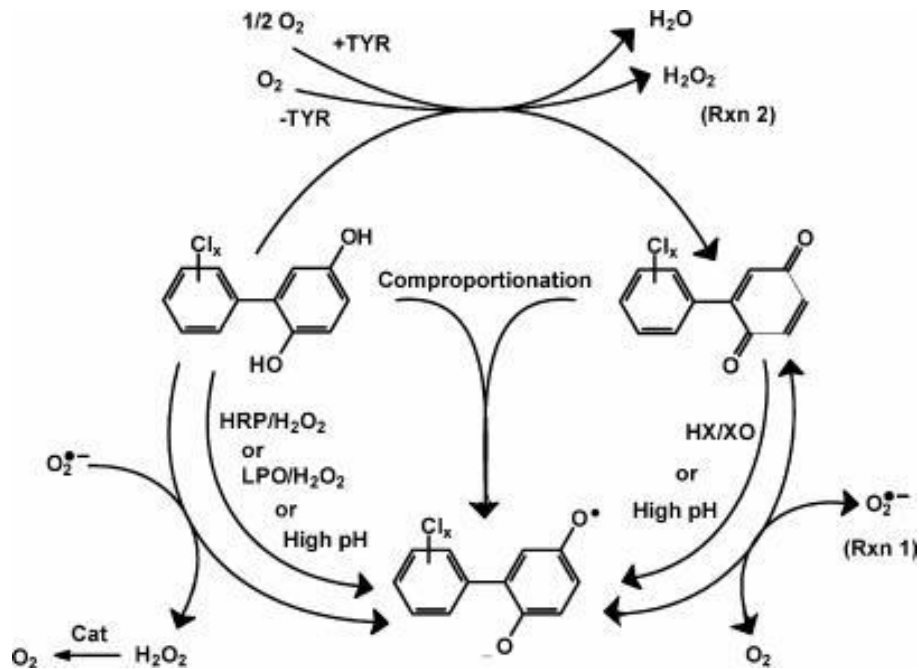


Figura 5.17.- Rutas de reacción de PBC hidroquinona, semiquinona y quinona.

Además se han planteado posibles mecanismos adicionales para la formación de radicales; uno de ellos es la autooxidación en soluciones aerobias, cuando el OH fenólico de las hidroquinonas se ionizan, los aniones son propensos a la rápida autooxidación y generar semiquinonas (Figura 5.18 A); otro posible mecanismo sugiere que la generación de SQ* en solución alcalina, sólo es la primera etapa de la auto-oxidación de los fenoles dihidroxilados, el radical puede continuar para oxidarse a la quinona, a continuación, una reacción de comproporciónación generará una molécula de hidroquinona y una molécula de quinona en dos moléculas de SQ* (Figura 5.18B); se propone un tercer posible mecanismo, que sugiere una adición de Michael catalizada por base de un OH, al anillo quinona (OH-pueden, en principio, ser sustituidos para cualquiera de los tres hidrógenos en el anillo de quinona; sólo un ejemplo de posibilidad) (Figura 5.18C); finalmente, el peróxido de hidrógeno cuyo anión, es un nucleófilo potente, mucho más reactivo que el anión hidróxido, el cual reacciona con BPC quinona, similar a OH-, sin embargo, la reacción será probablemente mucho más rápida (Figura 5.18D) (Song *et al.*, 2008).

Para la síntesis de hidroquinonas y quinonas a partir de BPC quinonas, primero se sintetizaron los compuestos, luego los compuestos sintetizados se llevaron a espectroscopia, obteniendo sus respectivos espectros, los cuales fueron analizados para checar cómo se pueden degradar las benzoquinonas y quinonas.

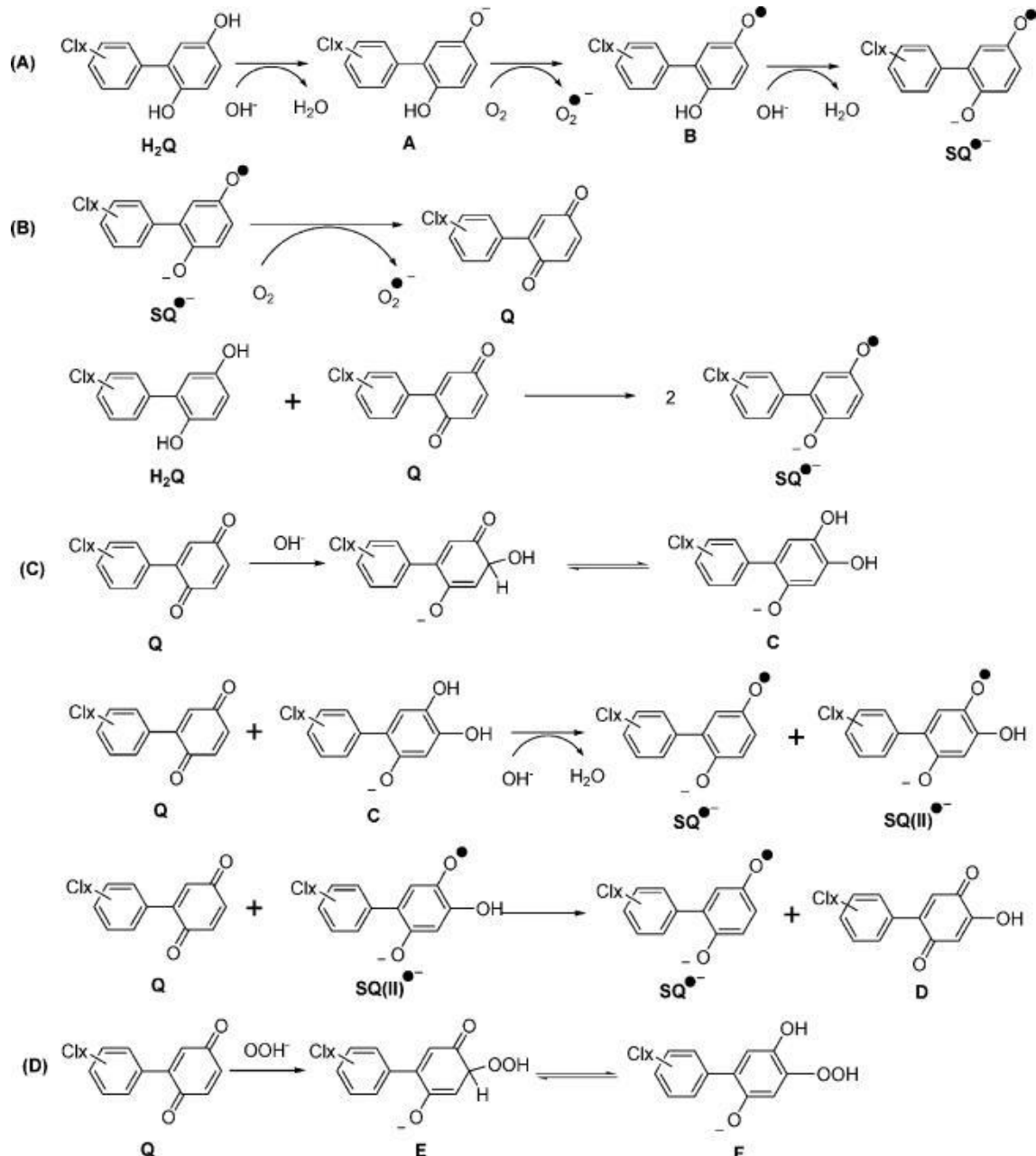


Figura 5.18.- Mecanismo de autooxidación de PBC hidroquinona y quinona que generan $\text{SQ}^{\bullet-}$ y radicales secundarios $\text{SQ(II)}^{\bullet-}$.

La biodegradación de BPC's ocurre, por suerte, con enzimas no específicas (co-metabolismo) o mediante enzimas altamente específicas que tienen como

fin el de aprovechar tales moléculas como fuentes de nutrientes y/o energía que aporta el crecimiento de dichos microorganismos (Arbeli, 2009).

En otros casos el contaminante puede servir a los microorganismos como una fuente de uno o más elementos esenciales para su crecimiento (carbono, nitrógeno, fósforo). En este escenario la biodegradación está relacionada con el crecimiento de los microorganismos. Para este tipo de degradación las enzimas son normalmente específicas y, por tanto, la tasa de reacción es mucho más rápida. Además, en tales casos la contaminación nos da una ventaja ecológica a los microorganismos que llevan a cabo el proceso de degradación, pues al hallar una fuente de energía su población irá en aumento y, a su vez se incrementará la tasa de degradación (Arbeli, 2009).

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

- Los bifenilospoliclorados fueron removidos en un 80% del sustrato excreta de conejo: *peatmoss* en un sistema de vermicomposteo utilizando *Eiseniafoetida*.
- Los compuestos detectados como productos de degradación son ésteres, ácidos carboxílicos, cetonas, aldehídos y alcanos, todos deshalogenados.
- De acuerdo a las estructuras de los compuestos identificados por CG-EM, primeramente se deshalogenaron y posteriormente perdieron la aromaticidad, generándose compuestos con estructuras más sencillas, biodisponibles y no tóxicas.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

- Se sugiere realizar el monitoreo durante períodos más cortos, sobre todo al inicio de los experimentos, ya que cuando se observó más remoción fue en los primeros siete días.
- Aislar e identificar a las bacterias que se encuentran en las materias primas (*peatmoss*, excreta de conejo y lombriz) para plantear los posibles mecanismos de remoción de BPC's.
- Realizar la cuantificación de BPC, utilizando un detector de captura de electrones, ya que podrían identificarse otro tipo de estructuras que con el método de masas no pudieron ser identificadas.

CAPÍTULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad D, Sylvestre M, Sondossi M, Massé R. Bioconversion of 2-hidroxy-6-oxo-6-(4'-chlorophenyl)hexa-2,4-dienoic acid, the *meta*- cleavage product of 4-chlorobiphenyl. *Journal General of Microbiology*. 1991;137:1375-1385.

Ambiental CP. 2003. Bifenilos Policlorados. *Comisión para la Cooperación Ambiental de América del Norte*, 2.

Ambiente GD. 2006. Manual de vermicompostaje Grama. 16.

Arbeli Z. 2009. Biodegradación de compuestos orgánicos persistentes (COP): I. El caso de lo Bifenilos polclorados. *Acta biol.*, Vol 14 No, 1, 2009, 55-86.

Arendorf JJ, Focht DD. Formation of Chlorocatecholmeta Cleavage Products by a Pseudomonad During Metabolism of Monochlorobiphenyls. *Appl Environ Microbiol*. 1994;60:2884-2889.

Arendorf JJ, Focht DD, A *meta*Cleavage Pathway for 4-Chlorobenzoate, an Intermediate in the Metabolism of 4-Chlorobiphenyl by *Pseudomonacepacia*P166. *Appl Envirom Microbiol*. 1995;61:443-447.

Báez MC. 2008. Biodegradación. 42

Bedard DL. Polychlorinated Biphenyls in Aquatic Sediments: Environmental Fate and Outlook for Biological Treatment. En: Haggblom MM, Bossert ID, editors. *Dehalogenation Microbial Processes and Environmental Applications*. Kluwer Academic Publishers; 2003. p. 443-465.

Bedard DL, Haberl ML, May RJ, Brennan MJ, Evidence for Novel Mechanisms of Polychorinated Biphenyl Metabolismo in *Alcaligeneseutrophus*H850. *Appl Environ Micro*. 1987;53: 1103-1112.

Bedard DL, Unterman R, Bopp H, Brennan MJ, Haberl ML, Johnson C. Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls. *Appl Environ Microbiol.* 1986;53:1094-1102.

Boop LH. Degradation of highly chlorinated PBC's by *Pseudomonas* strain LB400.

Contreras SM, Álvarez Bernal D, Dendooven L. Removal of polycyclic hydrocarbons from soil amended with biosolid or vermicompost in the presence of earthworms (*Eisenia foetida*). *Soil Biology & Biochemistry.* 2008; 40: 1954-1959.

Contreras S.M, Álvarez Bernal D, Dendooven L. *Eisenia foetida* increased removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil. *Environmental Pollution.* 2006. 141:396–401.

Creativa T A. 2008. Manual Básico para hacer Vermicompost. 9.

Del Toro P. 2001. Espectrometría de masas. 15.

Focht DD. Biotransformation of Halogenated Pesticides. En: Haggblom MM, Bossert ID, editors. *Dehalogenation, Microbial Processes and Environmental Application.* Kluwer Academic Publishers; 2003. p. 303-332.

Hernandez BS, Arensdorf JJ, Focht DD. Catabolic Characteristics of Biphenyl-Utilizing Isolates which Cometabolize PCBs. *Biodegradation.* 1995;6:75-82.

Krupcik J, Koean A, Petrck J, Leclercq RA, Ballschmiter K. 1992. On the Use of Reference Standards for Quantitative Trace Analysis of PCBs by HRGC. *Analyses of Technical PCB Formulations by HRGC/FID.* *Chromatographia*, 33: 514-520.

Lopera E, Aguirre J. 2006. Purification of mineral insulating oil contaminated with polychlorinated biphenyls (PCB's). *Dyna*, 73: 75-88.

Mars AE, Kasberg T, Kaschabek SR, Agteren H, Janssen D, Reineke W. Microbial Degradation of Chloroaromatics: Use of the *meta*-Cleavage

Pathway for Mineralization of Chlorobenzene. *Journal of Bacteriology*. 1997;179: 4530-4537.

Montaño NA. 2009. Programa de manejo integral de residuos sólidos en el parque nacional natural gorgona, Cauca, Colombia. 172.

Robles HA, Cuevas G, Hernández D. 2005. Determination of PCBs in transformer oil using gas chromatography with mass spectroscopy and aroclors (A1254:A1260). *Journal of Mexico Chemistry and Society*, 49(3): 263-270).

Ruiz G. Diagnóstico Nacional de Bifenilos Policlorados en México. Reporte Final. Acosta y Asociados. Proyecto INE-1/01. Diciembre del 2001/ Abril 2003. Preparado para: Instituto Nacional de Ecología No. INE/AD-084/2001

Sondossi M, Sylvestre M, Ahmad D. Effects of Chlorobenzoate Transformation on the *Pseudomonas Testosteroni* Biphenyl and Chlorobiphenyl Degradation Pathway. *Appl Environ Microbiol*. 1992;58:485-495.

Sondossi M, Sylvestre M, Ahmad D, Massé R. Metabolism of hydroxybiphenyl and chloro-hydroxy by biphenyl/chlorobiphenyl degrading *Pseudomonas testoreni*, strain B-356. *Journal of Industrial Microbiology*. 1991;7:77-88.

Song Y, Wagner BA, Lehmler H-J, Buettner GR. Semiquinone Radicals from Oxygenated Polychlorinated Biphenyls: Electron Paramagnetic Resonance Studies. *Chem Res Toxicol*. 2008;21: 1359-1367.

Tharakan J.; Addagada A.; Tomlinson D. 2004. Vermicomposting for the bioremediation of PCBs congeners in superfund site media. Conference: international conference on waste management and the environment. 117-124

Tharakan J. 2005. Application of microbes and earthworms for the biological remediation of polychlorinated biphenyl contaminated sludge. Jordan International Chemical Engineering Conference V.

CAPÍTULO IX

ANEXOS

Compuestos identificados en las materias primas antes del experimento

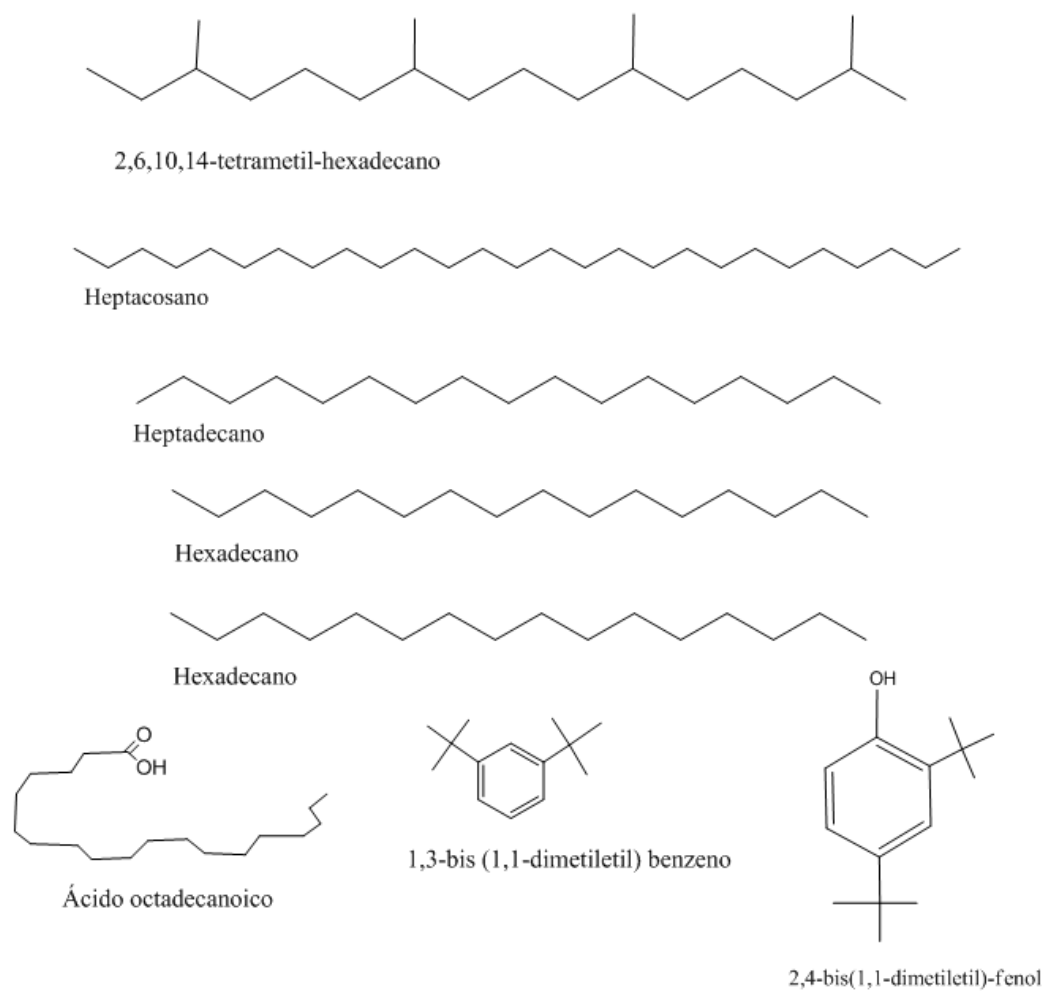


Figura 9.1.- Compuestos comunes hallados en materias primas.

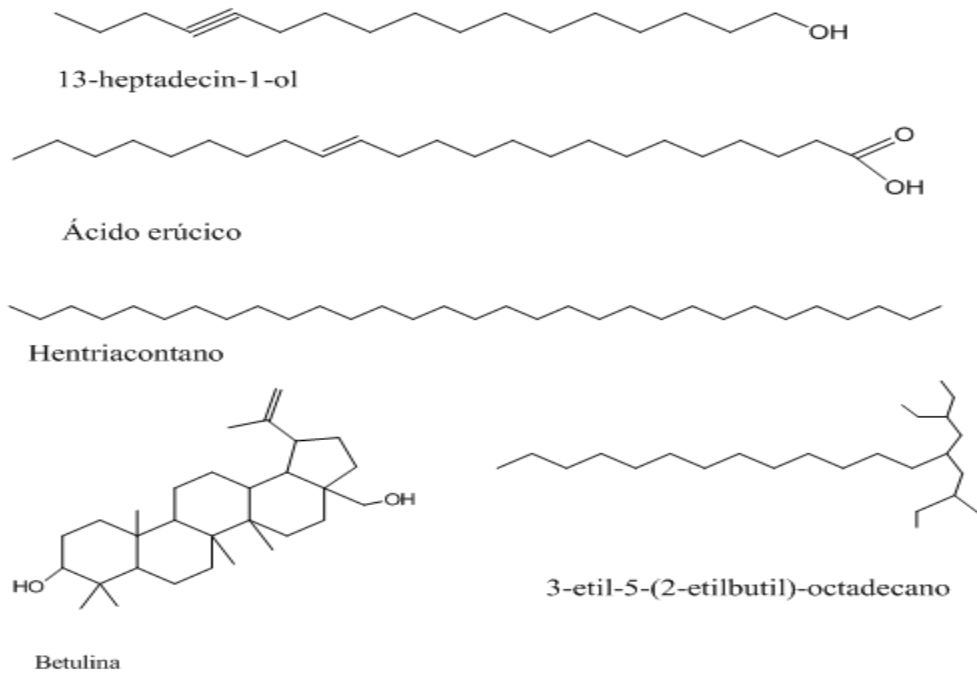


Figura 9.2.- Compuestos identificados en *peatmoss*

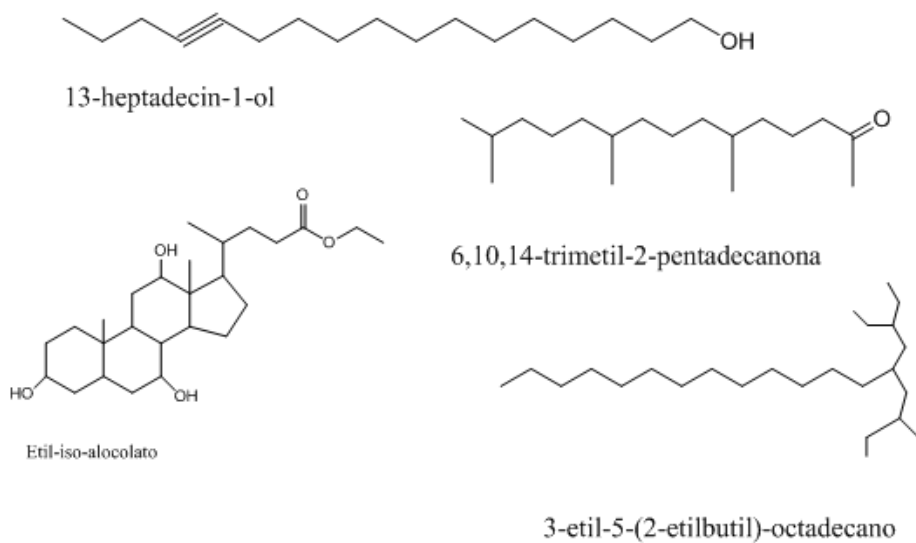


Figura 9.3.- Compuestos identificados en excreta de conejo

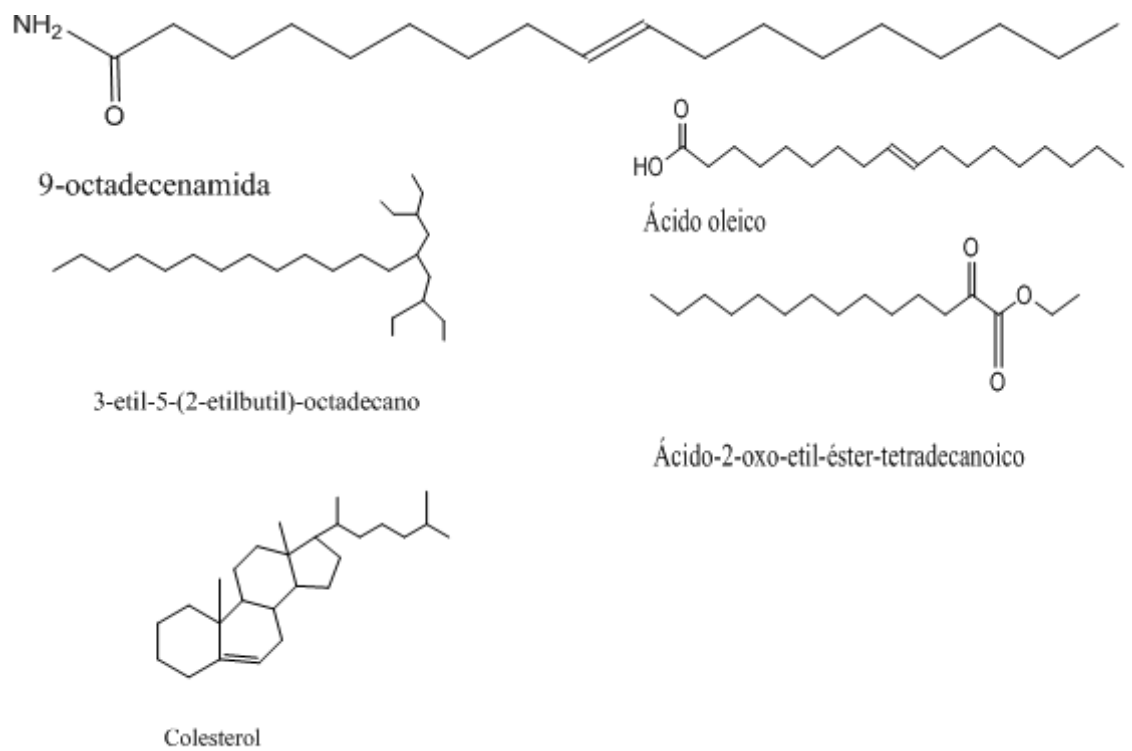


Figura 9.4.- Compuestos identificados en lombriz