

**BIODEGRADACIÓN DEL POLÍMERO PVC (Policloruro de vinilo) A PARTIR DE UN
EXTRACTO ENZIMÁTICO CRUDO PROVENIENTE DEL HONGO *Aspergillus niger*
CULTIVADO EN MEDIO SÓLIDO DE CÁSCARA DE PAPA**

**TANIA VANESSA RODRÍGUEZ ARISTIZÁBAL
PAULA DANIELA BECERRA ROJAS**

**Proyecto Integral de Grado para optar por el título de:
INGENIERO QUÍMICO**

**Director
DAVID LEONARDO SOTELO TOBÓN
Químico, MSc, cPhD.**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIRÍA QUÍMICA**

BOGOTÁ. D. C

2024

NOTA DE ACEPTACIÓN

Nombre
Firma del director

Nombre
Firma del presidente jurado

Nombre
Firma del Jurado

Nombre
Firma del Jurado

Bogotá D.C, septiembre de 2024

DIRECTIVOS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. MARIO POSADA GARCÍA PEÑA

Consejero Institucional

Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA PEÑA

Vicerrectora Académica

Dra. MARÍA FERNANDA VEGA DE MENDOZA

Vicerrector Administrativo y Financiero

Dr. RAMIRO AUGUSTO FORERO CORZO

Vicerrectora de investigaciones y extensión

Dra. SUSAN MARGARITA BENAVIDES TRUJILLO

Secretario General

Dr. JOSE LUIS MACIAS RODRIGUEZ

Decana Facultad de Ingenierías

Dra. NALINY PATRICIA GUERRA PRIETO

Director(a) de Ingeniería Química

Ing. NUBIA LILIANA BECERRA OSPINA

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis principalmente a Dios, por ser mi guía y fortaleza en cada paso de este camino, permitiéndome alcanzar esta meta con fe y perseverancia.

A mis queridos padres, Tatiana e Ivan, quienes con su amor incondicional y constante motivación, han sido mi mayor inspiración para seguir adelante, incluso en los momentos más difíciles.

A Cane, Luisa, Jhoan, Nancy, por su apoyo moral y su compañía inquebrantable en esas largas noches de investigación. Sus palabras de aliento y su presencia han sido un faro de esperanza en este arduo viaje.

A mi compañera de trabajo y mejor amiga Paula, sin cuya ayuda y apoyo constante, esta tesis no habría sido posible. Tu amistad y colaboración han sido un pilar fundamental en este camino.

Finalmente, a mi tutor de tesis, David Sotelo, cuya colaboración y disposición diaria fueron fundamentales para la realización de este trabajo.

Vanessa Rodriguez Aristizabal

DEDICATORIA

A mis padres María Angélica y Romel Gilberto, quiénes han sido mi motivación más grande y el pilar de mi vida, los 2 seres que me han tomado de la mano en cada etapa linda de ella, que con su amor, entrega desmedida y apoyo me han orientado para ser quién soy al día de hoy, a ellos que les debo tanto y espero poder llegar a ser algún día aunque sea la tercera parte de lo que ellos son.

A mi hermano David Santiago, el tesoro más grande que tengo, quién a pesar de ser menor que yo, ha sido mi inspiración en muchos aspectos de mi vida, mi compañero de camino, a quien admiro mucho más de lo que él se imagina y de quien espero ser una guía y motivo de orgullo.

A mis ángeles en el cielo que hoy ya no están, pero que sabían de antemano cuanto quería llegar hasta acá, a los cuales alguna vez les comenté sobre una de mis metas y pusieron toda su fe en mí. A ellos, que si bien, no me acompañan físicamente, los sentí en cada instante de este proceso.

De igual forma, dedico esta tesis a nuestro profesor y director David Sotelo, que vió en nosotras muchas capacidades, nos guió con sabiduría y nos impulsó a dejar lo mejor de nosotras con base a nuestras aptitudes y actitudes adquiridas y fortalecidas durante la carrera. Él con sus conocimientos jugó un papel importante en el desarrollo del proyecto y siempre estuvo presto a colaborarnos.

A mis amigos, aquellos que siempre estuvieron atentos y brindaron lo mejor de sí para motivarme, bien sea a distancia, a viva voz o con su compañía. Finalmente, a mi compañera de trabajo de grado, Vanessa, que, con su compromiso, dedicación y carisma durante el desarrollo del proyecto, me sacó sonrisas, mostrando siempre su disposición por aprender y dar lo mejor de sí misma; a ella, con quién compartí desde el primer semestre y hoy tengo el privilegio de llamar "Mejor amiga".

Paula Daniela Becerra Rojas

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia agradecemos a Dios por permitirnos llegar hasta este punto de culminación de nuestra carrera profesional, mostrándonos con claridad el camino de la excelencia, sabiduría y resiliencia.

A nuestros padres por ser el motor principal de nuestras vidas, por estar presentes y acompañarnos de manera incondicional, no solo a lo largo del desarrollo del proyecto, sino en nuestro crecimiento y desarrollo personal, su soporte, amor y apoyo han sido una gran fuente de motivación

A nuestra alma máter, la Universidad de América por abrirnos las puertas de su claustro y acogernos en este con el fin impulsarnos en la persecución de nuestro camino profesional. Gracias por brindarnos su apoyo con el préstamo de laboratorios, espacios de trabajo y suministrarnos material.

De antemano, agradecemos a nuestro director de tesis David Sotelo por su acompañamiento, orientación, apoyo, paciencia y dedicación con lo relacionado a la ejecución y desarrollo del proyecto desde el momento cero.

A nuestro semillero de investigación BIOSIDE por su aporte significativo, brindando conocimientos y estimulando nuestra imaginación direccionada a la búsqueda de diferentes soluciones a las problemáticas de la naturaleza siendo el crisol donde se incuba el futuro. También agradecemos al quipo de laboratorio por su amabilidad, cortesía y capacitaciones brindadas.

A la Universidad Javeriana por permitirnos realizar las pruebas de microscopía electrónica de barrido en sus laboratorios y a la empresa Pelikan Colombia S.AS por su préstamo de la cámara de luz UV.

A nuestros familiares, amigos y demás personas que nos brindaron su compañía en alguna etapa de la realización del trabajo de grado, gracias por sus palabras, consejos y apoyo, los cuales nos llenaron de ánimo e inspiración para lograr la ejecución total del proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	14
OBJETIVOS	17
1. GENERALIDADES Y MARCO TEÓRICO	18
1.1. Justificación: Contaminación por los residuos sólidos urbanos (RSU)	18
1.2. Polímeros	20
1.3. Clasificación de los polímeros	20
1.3.1. <i>Según su respuesta a la temperatura</i>	21
1.3.2. <i>Según su composición</i>	21
1.3.3. <i>Según sus propiedades físicas</i>	21
1.3.4. <i>Según su origen</i>	22
1.4. Clasificación de los polímeros	22
1.4.1. <i>Plásticos biodegradables</i>	22
1.4.2. <i>Plásticos recalcitrantes</i>	22
1.5. Policloruro de vinilo (PVC)	23
1.6. Degradación de los materiales plásticos	26
1.6.1. <i>Enzimas asociadas a la degradación de PVC</i>	27
1.6.2. <i>Reacciones principales de la degradación de PVC</i>	27
1.7. Proceso de biodegradación	28
1.7.1. <i>Etapas del proceso de biodegradación</i>	28
1.7.2. <i>Factores que afectan la biodegradación</i>	29
1.7.3. <i>Técnicas para medir la biodegradación</i>	29
1.8. Microorganismos degradadores de plásticos	32
1.9. <i>Aspergillus niger</i>	33
1.9.1. <i>Morfología</i>	33
1.9.2. <i>Taxonomía</i>	34
1.9.3. <i>Reproducción y crecimiento</i>	35
1.9.4. <i>Descripción microscópica</i>	36

1.9.5.	<i>Descripción macroscópica</i>	36
1.9.6.	<i>Importancia y aplicaciones</i>	36
1.9.7.	<i>Enzimas sintetizadas por A. niger</i>	37
1.9.8.	<i>Principales medios de cultivo de A. niger</i>	38
1.9.9.	<i>Residuos agroindustriales</i>	39
1.10.	<i>Solanum tuberosum L.</i>	39
1.10.1.	<i>Características morfológicas</i>	40
1.10.2.	<i>Estructura del tubérculo</i>	40
1.10.3.	<i>Taxonomía</i>	41
1.10.4.	<i>Perfil nutricional</i>	42
1.10.5.	<i>Producción y consumo</i>	43
1.10.6.	<i>Variedad de papa</i>	45
1.11.	Técnicas para determinar carbohidratos	46
1.12.	Técnicas para cuantificar proteínas	48
1.13.	Técnicas para identificar proteínas	58
1.14.	Técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM)	49
2.	METODOLOGÍA	51
2.1.	Lugar	51
2.2.	Métodos de análisis documental o experimental para cumplir con objetivo esp 1.	51
2.2.1.	<i>Banco de trabajo</i>	51
2.2.2.	<i>Tratamiento y caracterización de la cáscara de papa</i>	53
2.2.3.	<i>Cultivo del hongo y activación de la cepa</i>	54
2.2.4.	<i>Análisis de pureza</i>	56
2.2.5.	<i>Obtención del extracto</i>	57
2.2.6.	<i>Cuantificación de proteínas</i>	59
2.3.	Métodos de análisis documental o experimental para cumplir con objetivo esp 2.	64
2.3.1.	<i>Actividad enzimática</i>	65
2.3.2.	<i>Técnica de electroforesis</i>	71
2.4.	Métodos de análisis documental o experimental para cumplir con objetivo esp 3.	
2.4.1.	<i>Obtención y pretratamiento de las probetas de PVC</i>	77

2.4.2.	<i>Degradación de las probetas de PVC</i>	78
2.4.3.	<i>Caracterización de las probetas mediante SEM</i>	81
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	83
3.1.	Resultados del objetivo específico 1.	83
3.1.1.	<i>Tratamiento y caracterización de la cáscara de papa</i>	83
3.1.2.	<i>Cultivo del hongo, activación de la cepa y análisis de pureza</i>	83
3.1.3.	<i>Obtención del extracto</i>	87
3.1.4.	<i>Cuantificación de proteínas</i>	88
3.1.5.	<i>Cuantificación del extracto</i>	89
3.2.	Resultados del objetivo específico 2.	97
3.2.1.	Actividad enzimática	97
3.2.2.	Electroforesis	102
3.3.	Resultados del objetivo específico 3.	105
3.3.1.	<i>Obtención y pretratamiento de las probetas de PVC</i>	105
3.3.2.	<i>Degradación de las probetas de PVC</i>	107
3.3.3.	<i>Caracterización de las probetas de PVC mediante SEM</i>	115
4.	CONCLUSIONES	122
5.	RECOMENDACIONES	125
	BIBLIOGRAFÍA	126

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1: Clasificación de los bioplásticos	23
Figura 2: Obtención del polímero PVC	24
Figura 3. Morfología de <i>Aspergillus niger</i>	34
Figura 4. Observación micro y macroscópica de <i>A. niger</i>	36
Figura 5. Medios de cultivo de <i>A. niger</i>	39
Figura 6. Partes de la planta <i>Solanum Tuberosum L.</i>	40
Figura 7. Tubérculo de <i>Solanum tuberosum L</i>	41
Figura 8. Aporte nutricional de la papa.	43
Figura 9. Papa Sabanera	45
Figura 10. Papa pastusa	46
Figura 11. Reacción del DNS con D-glucosa.	47
Figura 12. Esterilización en el autoclave.	52
Figura 13. Obtención del banco de trabajo de <i>A. niger</i>	53
Figura 14. Medio sólido de cáscara de papa.	54
Figura 15. Cultivo de <i>A. niger</i> sobre cáscara de papa.	55
Figura 16. Procedimiento para el análisis de pureza	56
Figura 17. Diagrama de bloques objetivo específico 1 (Actividad 1,2 y 3)	57
Figura 18. Proceso inicial de obtención del extracto	58
Figura 19. Proceso de separación sólido – Líquido	59
Figura 20. Espectrofotómetro de luz UV-VIS	62
Figura 21. Diagrama de bloques objetivo específico 1 (Actividad 4)	64
Figura 22. Solución DNS	66
Figura 23. Preparación de soluciones con DNS	68

Figura 24. Solución buffer	68
Figura 25. Calentamiento de las diluciones de enzima	69
Figura 26. Diagrama de bloques objetivo específico 2 (Actividad 1)	71
Figura 27. Soluciones preparadas para geles de electroforesis	72
Figura 28. Geles de separación y concentración	74
Figura 29. Preparación de muestras para electroforesis	75
Figura 30. Funcionamiento cámara de electroforesis	76
Figura 31. Agitación de los geles con solución de tinción	76
Figura 32. Diagrama de bloques objetivo específico 2 (Actividad 2)	77
Figura 33. Proceso de secado probetas de PVC	79
Figura 34. Diagrama de bloques objetivo específico 3 (Actividad 1,2 y 3)	80
Figura 35. Diagrama de bloques objetivo específico 3 (Actividad 4)	82
Figura 36. Caracterización macroscópica del hongo <i>A. niger</i>	84
Figura 37. Estructura de <i>A. niger</i> con objetivo 4	85
Figura 38. Estructura de <i>A. niger</i> con objetivo 10	85
Figura 39. Crecimiento de <i>A niger</i> en ambos tipos de papa	86
Figura 40. Extracto enzimático después de 3 días en el shaker	87
Figura 41. Extractos obtenidos	87
Figura 42. Curva de calibración con albúmina	88
Figura 43. Soluciones de la curva de calibración con albúmina	89
Figura 44. Curva de calibración con glucosa	98
Figura 45. Actividad enzimática con DNS	99
Figura 46. Migración de proteínas con electroforesis	102
Figura 47. Gel de poliacrilamida	103
Figura 48. Gel de poliacrilamida en el foto-documentador	104

Figura 49. Pretratamiento con luz UV	106
Figura 50. Estructura de las probetas al microscopio metalográfico.	107
Figura 51. Probetas de PVC con extracto enzimático 1	109
Figura 52. Probetas de PVC después de biodegradación enzimática 1	109
Figura 53. Probetas de PVC después de biodegradación enzimática 2	111
Figura 54. Estructura de las láminas al microscopio con objetivo 20	112
Figura 55. Dureza Shore'D	114
Figura 56. Tratamiento de las probetas para SEM	116
Figura 57. Resultados SEM para las probetas	117
Figura 58. Sales presentes en las perforaciones de las probetas	120
Figura 59. Composición de sales de las probetas	120

TA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1: Taxonomía de <i>A. niger</i>	35
Tabla 2: Clasificación taxonómica de <i>Solanum tuberosum L.</i>	42
Tabla 3. Preparación de la curva de calibración	60
Tabla 4. Cuantificación del extracto	62
Tabla 5. Alícuotas con solución intermedia 1	67
Tabla 6. Alícuotas con solución intermedia 2	67
Tabla 7. Preparación gel de separación	73
Tabla 8. Preparación gel de concentración	73
Tabla 9. Aporte nutricional del tipo de papa	83
Tabla 10. Resultados de la curva de calibración	88
Tabla 11. Cuantificación del extracto 1 (Sustrato de papa sabanera)	89
Tabla 12. Cuantificación de la mezcla de los extractos (Papa sabanera)	91
Tabla 13. Cuantificación del extracto 2 (Sustrato de papa pastusa)	93
Tabla 14. Cuantificación mezcla del extracto 2 (Sustrato de papa pastusa)	94
Tabla 15. Cuantificación mezcla del extracto 3 (Sustrato de papa pastusa)	95
Tabla 16. Resultados de la curva de calibración con glucosa	97
Tabla 17. Resultados de la lectura de los azúcares reductores	100
Tabla 18. Resultados de la actividad enzimática	102
Tabla 19. Pretratamiento de las probetas de PVC con luz UV	105
Tabla 20. Biodegradación de PVC con extracto 1 (Cascara de papa sabanera)	108
Tabla 21. Biodegradación de PVC con extracto 2 (Cascara de papa pastusa)	110
Tabla 22. Actividad enzimática después de biodegradación	114
Tabla 23. Prueba de dureza	115

RESUMEN

El presente proyecto plantea la biodegradación del polímero policloruro de vinilo (PVC), mediante un extracto enzimático crudo proveniente del hongo *Aspergillus niger*, el cual fue cultivado en medio sólido de cáscara de papa (*Solanum tuberosum L*), con el fin de mitigar el impacto ambiental generado por dos tipos de residuos sólidos urbanos (RSU): Los primeros corresponden a los plásticos, como es el caso del PVC, el cual es un polímero no biodegradable cuya residencia en la tierra es de más de 400 años y en segunda instancia los residuos agroindustriales de cáscara de papa que corresponden al 50% de los RSU.

Gracias a que la cáscara de papa posee un gran contenido de almidón, este sirve como fuente de carbono otorgándole los nutrientes necesarios para que *A. niger* crezca de manera óptima y sintetice las enzimas asociadas a la degradación de PVC. Para llevar a cabo este proceso, se tomaron los residuos de cáscara de papa (*Solanum tuberosum L*), de la variedad sabanera y pastusa como sustrato de cultivo para el hongo, el cual se incubó por 8 días para obtener el extracto enzimático y realizar la posterior cuantificación de proteínas mediante el método Biuret cuya concentración de los extractos se llevó a 75000 ppm para el extracto del hongo sobre papa sabanera y 30000 ppm para el extracto obtenido con sustrato de papa pastusa. Se midió la actividad enzimática por medio de la técnica de Miller (Método DNS) y de igual forma, con el fin de identificar el tipo de enzimas presentes en el complejo enzimático se evaluaron los pesos moleculares mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE arrojando que las enzimas presentes en el extracto fueron: catalasas, oxidorreductasa, peroxidasa, y proteasa.

Finalmente se sometieron 9 de las 20 probetas a la actividad enzimática por un periodo de 1 mes, para evaluar su degradación mediante la técnica de pérdida de peso cuyo resultado en porcentaje se encuentra en un rango del 0.2 al 0.6% de degradación y se caracterizaron las probetas mediante SEM. Estos resultados demuestran que el PVC a pesar de ser considerado “no biodegradable”, existen enzimas producidas por microorganismos capaces de alterar su estructura polimérica y de esta manera haciéndolo perteneciente al grupo de plásticos que pueden biodegradarse por acción enzimática como es el caso del polietileno de baja densidad más conocido como LDPE.

Palabras clave: Biodegradación, PVC, *Aspergillus niger*, *Solanum tuberosum*, SEM.

INTRODUCCIÓN

Los polímeros son materiales que están constituidos por macromoléculas de alto peso molecular conformados a su vez por unidades más pequeñas denominadas monómeros, pueden ser de origen natural o sintético y se dividen en plásticos y elastómeros [1]. El uso de los plásticos se ha incrementado gracias a sus propiedades de permeabilidad, resistencia mecánica, peso ligero y bajo costo; sin embargo, pese a su gran utilidad, la contaminación por acumulación de plásticos trae consigo un gran problema ambiental debido a su eliminación, pues este material no se degrada fácilmente [2].

La contaminación por este tipo de residuos es uno de los problemas medioambientales que aquejan al mundo actualmente. Gracias a los 29 artículos recopilados en el observatorio de salud y medio ambiente integrados en el informe “Contaminación por plástico: Uno de los mayores desafíos del S. XXI” elaborado por el instituto DKV (Deutsche Krankenversicherung) de la vida saludable en colaboración con ECODES (ecología y desarrollo), se estima que la producción mundial de plásticos ha aumentado desde 2 millones de toneladas métricas en 1950 a casi 490 millones de toneladas métricas para 2020 [3]. De igual forma, dentro del último informe de la ONU acerca de la contaminación por plásticos realizada en el 2021 que recibe el nombre de “From Pollution to Solution: A global assessment of marine litter and plastic pollution”, se destaca que en los sistemas acuáticos, esta contaminación ha crecido considerablemente, donde cerca de 8 millones de toneladas de plásticos se vierten cada año a los océanos, en contraste esto también representa un problema climático, pues en el 2015 se produjeron 1.7 gigatoneladas (Gt) de CO_2 equivalente (e) gracias a los plásticos y se estima según el informe en cuestión que para 2050 aumente a 6.5 Gt CO_2e [4], si no se generan medidas correctivas.

Por tal razón, se han buscado diversas alternativas para mitigar los impactos generados por estos materiales y acelerar su degradación. Existen dos formas de degradar el plástico, una de ellas es la degradación abiótica que se genera gracias a factores ambientales tales como temperatura y radiación ultravioleta; sin embargo, el tiempo en el cual se lleva a cabo este proceso puede durar de 100 a 1000 años. La segunda es la degradación biótica conocida como “Biodegradación, la cual es el resultado de microorganismos como hongos, bacterias y actinomicetos que, gracias a la acción de sus enzimas, modifican y consumen el polímero provocando a su vez, cambios en sus

propiedades [5]. Esta técnica representa una alternativa ecológica para eliminar los desechos plásticos a través del aprovechamiento de las enzimas (principalmente esterasas, lipasas, cutinasas o proteasas) y actividad metabólica ya que no genera contaminantes secundarios como lo hacen los tratamientos químicos y físicos [6].

La degradación microbiana depende de varios factores tales como, la estructura, química, longitud y cristalinidad del polímero y factores ambientales como temperatura, pH, humedad y contenido de oxígeno [5]. El proceso por el cual los microorganismos producen enzimas se denomina fermentación, puede ser aerobia o anaerobia y entre los microorganismos que se utilizan para llevar a cabo este proceso se encuentran los hongos filamentosos, pues estos poseen una estructura micelar la cual les da ventaja frente a otros microorganismos siendo aptos para crecer sobre materiales sólidos presentando una gran adherencia y penetración sobre las partículas del sustrato y además presentan sistemas enzimáticos completos que sirven para degradar polímeros [7]. Este es el caso de *Aspergillus niger*, el cual crece sobre materia orgánica, desarrollándose en ambientes oscuros, húmedos y cerrados, donde sus estudios involucran la biodegradación de materiales plásticos. Los medios de cultivo y el sustrato sobre el cual el microorganismo se desarrolla son de vital importancia ya que le proporcionan los nutrientes necesarios para sintetizar su material celular, entre los medios más utilizados se encuentra la materia orgánica por su gran cantidad de nutrientes y las enzimas o proteínas unicelulares se pueden obtener a partir de residuos agroindustriales con el uso de la fermentación [8].

Partiendo de lo anterior, uno de los residuos agroindustriales más representativos, son los residuos orgánicos de cáscara de papa, pues al utilizarlos como medio de cultivo para el crecimiento del hongo, se genera un beneficio económico (pues este material adquiere un valor agregado) y ecológico (eliminando en gran medida su contaminación). Esto, en razón a que actualmente, a nivel mundial se producen alrededor de 1600 toneladas por año de RS, donde más de 300 millones de ellas se desechan en rellenos sanitarios y 140 millones aproximadamente son reciclados [9]. Según un informe del Banco Mundial, titulado “What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050”, en el año 2016 el tratamiento y la eliminación de desechos generaron la emisión de 1600 millones de toneladas de CO_2 , lo que representa alrededor del 5 % de las emisiones mundiales [10], por tal razón, uno de los problemas más graves que deben enfrentar los

países es la eliminación de desechos sólidos responsables de la contaminación y que son en su mayoría provenientes de actividades comerciales, industriales o agrícolas, siendo este último sector el más representativo, pues un porcentaje del 46% aproximadamente de los RSU corresponden a la biomasa residual o residuos sólidos orgánicos (RSO) [11]. En 2017, la Unidad Administrativa Especial de Servicios Públicos (UAESP) y el consorcio NCU, mediante un estudio realizado en la ciudad de Bogotá, afirmaron que del total de residuos sólidos que ingresan al Relleno Sanitario Doña Juana son 6868 Ton/día, los residuos orgánicos representan el 51,32% lo que equivale a una descarga de 3490,57 Ton/día [12].

Esta biomasa residual pertenece a vertidos biodegradables, aguas residuales urbanas e industriales, residuos ganaderos y más cercanamente las basuras urbanas generadas en los domicilios, donde encontramos las cáscaras de papa (*Solanum tuberosum L*), estos residuos se han incrementado debido al alto consumo de tubérculos en razón a que es un producto frecuente dentro de la canasta familiar [13]. Su producción anual, representa aproximadamente la mitad de la producción mundial de todos los tubérculos y raíces, siendo de 350 millones de Ton/año; es decir que posee una alta demanda en el mercado y su uso radica principalmente en la industria alimenticia [14]. La cáscara de papa normalmente se desprende del tubérculo lo que representa aproximadamente el 2% del volumen total comestible; estos residuos contienen carbohidratos, proteínas, potasio y vitamina C que favorece a los procesos fermentativos al adicionar microorganismos [13], [14].

Teniendo en cuenta lo anterior y gracias a los nutrientes de la cáscara de papa, en el presente proyecto se plantea el uso de este tipo de residuo agroindustrial como medio de cultivo para el crecimiento del hongo *Aspergillus niger* (*A. niger*) y se busca biodegradar el PVC mediante la acción enzimática del extracto sintetizado por el hongo en cuestión. De esta manera, se mitiga el impacto ambiental generado por ambos tipos de residuos sólidos y en el caso de los residuos de materia orgánica (Cáscara de papa), se les otorga un valor agregado al servir como sustrato de cultivo para el crecimiento de *A. niger*, reduciendo de esta manera las emisiones de gases de efecto invernadero. Se trata de un paso importante hacia la consecución de una economía circular, en la que se minimicen los residuos y se maximice el valor de los recursos. Además, el uso de la cáscara de papa para este fin también puede conducir al desarrollo de nuevos productos e industrias, creando más oportunidades de empleo e impulsando el crecimiento económico.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficiencia y condiciones de biodegradación de probetas de PVC (Policloruro de vinilo) mediante un extracto enzimático crudo proveniente *Aspergillus niger* usando residuos de cáscara de papa como sustrato de cultivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener un extracto enzimático crudo proveniente del cultivo de *A. niger* en cáscaras de papa como sustrato.
- Definir cuáles son las enzimas extracelulares producidas por el hongo *Aspergillus niger* asociadas con la degradación de PVC
- Determinar la capacidad que tiene el extracto enzimático crudo de *Aspergillus niger* para la degradación de probetas de PVC.

1. GENERALIDADES Y MARCO TEÓRICO

1.1. Justificación: Contaminación por los residuos sólidos urbanos (RSU)

Los residuos sólidos urbanos (RSU), producto de las diferentes actividades humanas, son tan antiguos como la humanidad misma, la contaminación por desechos sólidos ha estado en constante crecimiento debido al mal manejo de los mismos, los cuales representan a su vez una problemática ambiental que afecta al ser humano y a su entorno en cuestiones de salud pública y recursos naturales (Renovables y no renovables), enfocados en alteraciones negativas sobre el recurso hídrico (Contaminación de cuerpos de agua, como ríos, mares u océanos), recurso atmosférico (Emisión de gases de efecto invernadero que dañan la capa de ozono y provocan el calentamiento global), el recurso suelo (Afectan la microfauna y causan la pérdida de productividad del mismo gracias a la contaminación de elementos lixiviados) y en el recurso paisajístico afectando la salud humana traducida en enfermedades asociadas al sistema respiratorio, problemas psicológicos, trastornos de atención, disminución de la eficiencia laboral y mal humor [15].

El 50% de los RSU corresponden a materia orgánica, el papel y el cartón comprende un 17%, los plásticos un 14% y el restante está distribuido en vidrio, metales y otros [3]. Partiendo de lo anterior, la industria de polímeros plásticos, por su parte ha adquirido una gran proliferación debido a su gran utilidad y propiedades, el plástico ha sido el material más utilizado desde el Siglo XX. Muchos de los objetos que tenemos a nuestro alrededor están fabricados por polímeros y los plásticos contenidos en los RSU son mayoritariamente polietileno y polipropileno con un porcentaje del 60%, en menor medida se encuentra el poliestireno, cloruro de polivinilo, polietilentereftalato, poliestireno-Butadieno o polímeros semisintéticos como el acetato de celulosa, nitrocelulosa o etionita [16],[17].

Como se mencionó anteriormente, entre los plásticos que corresponden al 14% de los RSU, se encuentra el policloruro de vinilo, también conocido como PVC, es uno de los plásticos más utilizados en el mundo y sus incontables aplicaciones están presentes en nuestro día a día de diversas formas como lo son: Piezas de automóviles, botellas de agua o leche, tuberías, juguetes, pavimentos para interior y exterior, ventanas, muebles, mangueras, puertas, entre otras, también puede ser utilizado como materia prima para producir nuevos productos, lo que reduce la cantidad

de residuos y disminuye la necesidad de producir nuevos materiales [18]; sin embargo, pese a su gran utilidad, que es un material sintético, versátil y reciclable, genera desechos en el planeta, los cuales al no degradarse rápidamente, resultan ser perjudiciales para el medio ambiente, pues este se considera un material no biodegradable [19].

En Colombia, anualmente se producen aproximadamente 1.4 millones de toneladas de plástico, de las cuales el 9% se recicla, el 12% se incinera y el 79% termina en vertederos, rellenos sanitarios o en medio ambiente lo que causa efectos negativos sobre el mismo en razón a que las propiedades físicas, resistencia mecánica y composición química de estos polímeros, hace que su degradación pueda tardar entre 100 y 600 años [20].

Teniendo esto presente, se buscan alternativas para mitigar el impacto generado por los plásticos y acelerar su degradación, una de ellas es la biodegradación, esta técnica es diferente a las físicas o químicas usadas normalmente y representa un reto para la microbiología ya que se expone como una alternativa ecológica y económicamente viable, cuyas condiciones de operación no son tan costosas ni drásticas, pues se basa en el proceso natural de descomposición de un material en CO_2 , CH_4 , H_2O y constituyentes orgánicos por la acción enzimática de microorganismos, estas enzimas son las causantes de la oxidación biótica de plásticos [21]. Entre los microorganismos capaces de sintetizar enzimas degradadoras de polímeros plásticos se encuentra el hongo *Aspergillus niger*, que gracias a su estructura micelar le permite crecer sobre materiales sólidos y ha sido fenómeno de estudio por su capacidad de adaptación, viabilidad en la obtención de proteínas y secreción de un alto nivel de enzimas con importancia comercial [8].

Por otro lado, hablando de lo RSU correspondientes a la materia orgánica que comprende el 50% de estos residuos, se encuentra la cáscara de papa (*S. tuberosum*), que debido al incremento de la población y al consumo de alimentos, su demanda ha aumentado, pues es cuarto cultivo alimenticio en el mundo después del trigo, el arroz y el maíz, su producción anual representa casi la mitad de la producción mundial de todos los tubérculos y raíces [13], pero así como su consumo aumenta, también lo hacen los residuos posconsumo que derivan de él, los cuales representan un problema ambiental. Con el fin de mitigar los impactos de contaminación generados por los mismos, se puede aprovechar como sustrato para el crecimiento de microorganismos ya que este

tipo de residuos son de bajo costo, fácil acceso y contienen nutrientes óptimos para que algunos hongos y bacterias puedan desarrollarse en el mismo y producir enzimas de interés, otorgándoles de esta manera valor agregado a los desechos [22], [23]. En consecuencia, se utilizará como sustrato el residuo agroindustrial de cáscara de papa (*Solanum tuberosum*) por sus componentes nutricionales para extraer un complejo enzimático de *A. niger* y llevar a cabo la degradación enzimática.

1.2. Polímeros

Los polímeros son una parte esencial de nuestra vida diaria, ya que se encuentran en muchos de los productos que usamos y consumimos, desde el plástico que se utiliza para hacer botellas y envases, hasta los materiales que se utilizan para hacer ropa. Los polímeros juegan un papel importante en nuestra sociedad moderna debido a que son una clase mucho más amplia de moléculas que engloba no solo a los plásticos, sino también a otros materiales como la celulosa, el ámbar y el caucho natural [24]. Estos están compuestos de átomos de carbono, que se unen a través de enlaces covalentes (Enlaces Fuertes que mantienen juntas las moléculas) formando la columna vertebral de la cadena polimérica, que luego se pliegan y se entrelazan para formar la estructura tridimensional del polímero [25].

El término "polímero" se deriva de las palabras griegas "poli" y "meros", que significan "muchos" y "partes", respectivamente. Esto se debe a que los polímeros están formados por la unión de muchas unidades repetitivas (Unidad más simple), también conocidas como "Monómeros". Por ejemplo, el policloruro de vinilo es una macromolécula formada por la polimerización del monómero de cloruro de vinilo ($CH_2 = CHCl$) [25].

1.3. Clasificación de los polímeros

A continuación, se presenta la clasificación de los polímeros según diversos factores, es de vital importancia reconocer su categorización puesto que estas características pueden influir positiva o negativamente en el proceso de biodegradación llevada a cabo por microorganismos o extractos enzimáticos como es el caso del presente proyecto, donde más adelante se puede reconocer la clasificación del PVC.

1.3.1. Según su respuesta a la temperatura

Según su respuesta a la temperatura, los polímeros se clasifican en termoplásticos y termoestables, los primeros poseen cadenas mayoritariamente lineales con algunas ramificaciones ocasionando que las fuerzas intermoleculares sean relativamente débiles ante la temperatura. Por otro lado, pueden ser reformados y volverse a calentar sin sufrir cambios significativos en sus propiedades [6], [26]. En cuanto a los termoestables, sus cadenas se conectan entre sí por enlaces entrecruzados, (cadena tridimensional extendida), esto le otorga rigidez a la estructura, son frágiles y resistentes térmicamente, no pueden volverse a calentar una vez hayan sido moldeados, a altas temperaturas se pueden llegar a degradar; sin embargo gracias a su estructura rígida y enlaces intermoleculares fuertes y entrecruzados son menos propensos a sufrir ataques de biodegradación en relación con los termoplásticos [27].

1.3.2. Según su composición

Dependiendo de su composición, los polímeros se clasifican en las siguientes 4 categorías: Polímeros orgánicos, que poseen una cadena principal de átomos de carbono, (lana o algodón). Los polímeros orgánicos vinílicos, están formados por enlaces dobles C-C, (poliolefinas, vinílicos halogenados, acrílicos). Los polímeros orgánicos no vinílicos, contienen átomos de oxígeno y/o nitrógeno en su cadena principal, además de carbonos, incluyen los poliésteres, las poliamidas y los poliuretanos. Finalmente, el último grupo corresponde a los polímeros inorgánicos, los cuales están basados en otros elementos como el azufre (polisulfuros) o el silicio (la silicona) [26].

1.3.3. Según sus propiedades físicas

Con base a las propiedades físicas, los polímeros se clasifican en **elastómeros**, los cuales tienen bajo módulo de elasticidad y alto grado de deformación, su estructura es reticulada, pero en menor proporción que en los materiales termoestables [26]. Los **plásticos**, por su parte, son materiales que se deforman irreversiblemente por la acción de un esfuerzo intenso, comprenden materiales rígidos y algunos flexibles, pueden ser termoplásticos o termoestables [1], [6], [26]. Las **fibras**, están constituidas por polímeros dispuestos en cristales, pueden ser naturales o sintéticas y su módulo de elasticidad es alto [27]. Los **recubrimientos**, son sustancias que forman una capa sobre un material para otorgarles una propiedad [26]. Por último, los **adhesivos**, tienen un buen potencial de adhesión y cohesión, estos mecanismos de unión pueden ser mecánicos o químicos [27].

1.3.4. Según su origen

Finalmente, la clasificación de los polímeros según su origen es: Naturales, semisintéticos, sintéticos y biopolímeros. Los naturales, son los provenientes de la naturaleza, como polisacáridos, y proteínas. Los semisintéticos se obtienen a partir de modificaciones de un polímero natural, sin alterar sus características moleculares. Los sintéticos se producen mediante procesos netamente industriales o de laboratorio, unos más resistentes que otros a ataques de degradación [1], [6], [26]. Por último, los biopolímeros, se derivan de recursos renovables, sintetizados por organismos y utilizando diferentes biomoléculas para dicho fin [6].

1.4. Clasificación de los plásticos

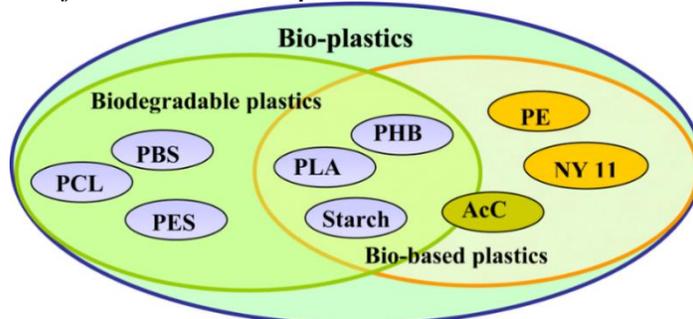
1.4.1. Plásticos biodegradables

Son polímeros susceptibles a la degradación mediante la actividad biológica acompañada de una reducción de su masa, entre ellos se integran los bioplásticos y algunos sintéticos como los poliésteres alifáticos, OLC, PES, PU y acrilato.

1.4.2. Plásticos recalcitrantes

Presentan un elevado peso molecular, lo que y elevada estabilidad, incluyen los procedentes de combustibles fósiles y algunos bioplásticos. Los plásticos como el PE, PP, PVC y PS, por su carácter recalcitrante son muy resistentes a la biodegradación; sin embargo, pese a esta característica, se han realizado estudios en los cuales se demuestra la existencia de comunidades microbianas capaces de degradar algunos plásticos pertenecientes a este grupo [6].

Figura 1.
Clasificación de los bioplásticos



Nota. La figura muestra la división de los bioplásticos, los que son bio-basados y biodegradables, los bio-basados no biodegradables y los biodegradables que no provienen de base biológica. Tomado de: Tokiwa, Y., Calabia, BP. *Review degradation of microbial polyesters* vol. 26, no. 15, pp. 1181-1189. (2004).

1.5. Policloruro de vinilo (PVC)

Es un polímero por adición que resulta de la polimerización del cloruro de vinilo o cloro-eteno, donde el átomo de cloro enlazado a cada átomo de carbono le otorga características amorfas y además generan momentos dipolares fuertes en la cadena polimérica provocando que sus moléculas posean una alta cohesión, esto se traduce en un impedimento estérico que crea repulsiones electrostáticas, las cuales reducen la flexibilidad de las cadenas. [27].

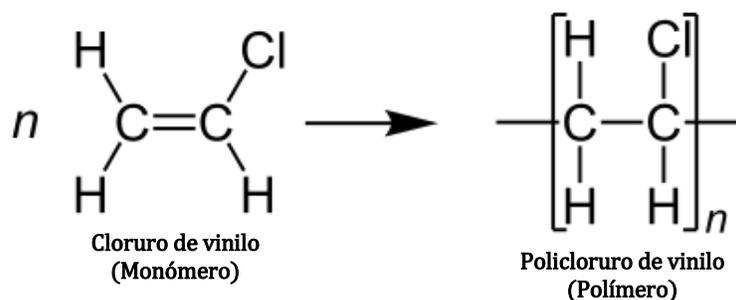
Teniendo en cuenta la clasificación expuesta en el apartado 1.3, el PVC según su respuesta a la temperatura es un termoplástico, según su composición es un polímero orgánico vinílico, donde la presencia de átomos de cloro dificulta su biodegradación por microorganismos. En cuanto a sus propiedades físicas es un polímero plástico rígido y finalmente, según su origen pertenece al grupo de los sintéticos. Por otro lado, posee buena resistencia eléctrica y a la llama. Estas características, junto con su estructura química, alto peso molecular y elevada estabilidad lo hace un plástico recalcitrante o no biodegradable [28].

Este plástico proviene del petróleo bruto en un 43% y de la sal común en un 57%, donde el 4% del consumo total del petróleo se utiliza para fabricar materiales plásticos y de ellos únicamente una octava parte corresponde al PVC [29]. Su producción implica el uso de productos químicos como el cloro y el etileno a altas temperaturas, este último, se obtiene a partir del petróleo por un proceso de craqueo, donde para separar el Cl presente en la sal, esta se disuelve en agua y es sometida a un

proceso de electrólisis, obteniendo de esta manera un gas monómero (Cloruro de vinilo) que se polimeriza para formar el PVC como se puede evidenciar en la figura 2. Estos reactivos son altamente contaminantes y pueden tener efectos negativos en la calidad del aire y del agua, por otro lado, durante el proceso de fabricación se emiten gases tóxicos como dioxinas y furanos que son contaminantes persistentes y peligrosos para la salud humana y el medio ambiente, considerándose un veneno para el mismo, toda vez que cuando se quema forma sustancias organocloradas las cuales emiten dioxinas perjudiciales para la biota. Además, si se desecha incorrectamente en vertederos o se libera al medio ambiente, puede tardar muchos años en degradarse y de esta manera, contaminar los suelos y las aguas subterráneas. [30].

Figura 2.

Obtención del polímero PVC



Nota. La figura evidencia la reacción de polimerización por radicales libres del cloruro de vinilo para formar PVC. Fuente: Textos científicos. “Policloruro de vinilo”. 2005. [En línea]. Tomado de: <https://www.textoscientificos.com/polimeros/pvc>

El producto obtenido de este proceso es un polvo blanco fino e inerte conocido como resina de PVC, su densidad es de 1,330 g/cm³, no presenta punto de fusión; sin embargo, presenta cambios significativos en un intervalo de 170-180°C. El PVC sin modificar es duro, quebradizo y con una estabilidad al calor baja, por ende, es que se le añaden aditivos, lubricantes, estabilizantes, pigmentos y rellenos con el fin de mejorar sus propiedades [27], por otro lado, es un material resistente, ligero, inocuo, inerte, impermeable, aislante, de elevada transparencia, no propaga llama, de fácil transformación, con buena durabilidad, resistente al agua, la humedad, la corrosión, la abrasión y a los productos químicos, esto quiere decir que tiene una vida útil más larga, lo que reduce la necesidad de reemplazarlos con frecuencia, el consumo de recursos y la cantidad de

residuos. A comparación de otros plásticos, la producción del PVC requiere menos energías y agua, lo que resulta en una huella de carbono relativamente baja [18].

Gracias a sus propiedades, este tipo de polímero tiene varias aplicaciones, en su forma flexible se usa normalmente para recubrir conductores eléctricos, cables, juguetes, calzados, manteles, muebles y en su forma rígida, su aplicación más conocida es en tuberías, envases, canaletas, marcos de puertas y ventanas, gracias a su resistencia mecánica y dureza. Ambos tienen alta resistencia a la abrasión y a los productos químicos, se usan en componentes para la construcción como perfiles y paneles para revestimientos exteriores, ventanas, puertas, cielorrasos y barandas, tejas y tabletas para pisos; en partes de electrodomésticos y computadores; en vallas publicitarias, tarjetas bancarias y otros elementos de artes gráficas; en envases de alimentos, detergentes y lubricantes; también pueden estirarse hasta 4 veces y se suele copolimerizar con otros monómeros para modificar y mejorar la calidad de la resina [27], [29].

Entre los 3 productos principales en el mercado de los plásticos, actualmente, se encuentran las resinas de PVC, donde el sector de construcción e infraestructura utiliza el 60% de estos productos en tuberías de plástico, accesorios eléctricos y de plomería. En contraste, su cadena de valor aumenta en razón a que abarca a productores de materias primas petroquímicas, proveedores de aditivos y cargas, procesadores (equipos y herramientas), minoristas y consumidores [18]. Sin embargo, pese a su fácil acceso, gran uso y bajo costo, a medida que aumenta su producción, también lo hacen los desechos que derivan de él una vez terminada su vida útil, pues estos se vierten en rellenos sanitarios generando contaminación, a la hora de incinerarse liberan dioxinas y otros contaminantes al aire. Varios estudios atribuyen al PVC una toxicidad preocupante, entre ellos se encuentra el denominado “Our Health, PVC, and Critical Infrastructure” publicado por la organización ambientalista “The center for Health, Environment and Justice” (CEHJ), donde se afirma que es el responsable de muchos tipos de cáncer y defectos de nacimiento, por tal razón, una gran serie de empresas han planteado reducir su uso o eliminarlo de los procesos de producción, aunque su implementación sigue creciendo de manera acelerada [30].

Luego de cumplir su vida útil, normalmente el PVC es incinerado [18]; sin embargo este proceso libera dioxinas y otros contaminantes al aire, otra fracción del mismo es reciclado; es decir que los

desechos de PVC son 100% reciclables siempre y cuando se genere una recolección efectiva que evite la contaminación, por tal razón es que este reciclaje solo se alcanza entre un 15% - 20%, esto ocasiona que una gran parte de estos residuos se descarguen en vertederos o se filtren directamente al medio ambiente, sin embargo al ser un plástico no biodegradable, su residencia en la tierra puede durar hasta 500 años [18], [30].

1.6. Degradación de los materiales plásticos

Los plásticos pueden degradarse mediante diferentes técnicas, entre ellas se destacan: El **compostaje** se basa en una degradación biológica que produce CO_2 , H_2O , compuestos orgánicos y biomasa, este proceso se realiza como un reciclado de la fracción orgánica de los residuos sólidos domésticos y no deja residuos tóxicos visibles. En la **oxo-degradación**, se realiza un proceso de etapas múltiples implementando aditivos químicos para iniciar la degradación, en la primera etapa interviene la luz UV y tensión mecánica que inician el proceso de degradación por oxidación reduciendo el peso molecular que posteriormente pasa a un proceso de biodegradación. La **fotodegradación**, por su parte, hace referencia a la degradación por la acción de los rayos UV provenientes de la radiación solar, pues esta energía es mayor que la unión de los enlaces moleculares de C-C y C-H, donde el polímero pierde resistencia y se fragmenta en pequeñas partículas; es decir que se rompen las cadenas moleculares del polímero, lo que reduce su peso molecular y propiedades mecánicas. La **solubilización en agua** es una técnica utilizada para aquellos materiales que, en un rango específico de temperatura y presión, son solubles en presencia de agua para posteriormente biodegradarse por la acción de microorganismos. La **biodesintegración**, se aplica a materiales compuestos por una parte orgánica biodegradable y otra con poliolefinas, donde los microorganismos metabolizan la fracción orgánica degradándola y la fracción polimérica no sufre cambios importantes. La **termodegradación** se debe a los cambios de temperatura, la **degradación química**, se genera por la acción de agentes químicos, la **degradación mecánica** es debida a influencias mecánicas. Finalmente, la **biodegradación** se genera gracias a procesos metabólicos y enzimáticos llevados a cabo por microorganismos, los cuales secretan enzimas capaces de fragmentar la estructura molecular de los plásticos causando su degradación [1], [31].

1.6.1. Enzimas asociadas a la degradación de PVC

En el campo de la biodegradación de polímeros, se ha encontrado una gran variedad de enzimas que pueden descomponer estos materiales de manera eficiente. Sin embargo, es importante tener en cuenta que no todos los polímeros son iguales y algunos son más difíciles de degradar que otros. En particular, el PVC es un polímero que se caracteriza por tener un enlace carbono – carbono (C-C), lo que lo hace muy resistente al ataque de las enzimas [32], lo anterior es atribuible principalmente a que el enlace C-C, es covalente y está formado por la compartición de electrones entre dos átomos de carbono. Por otro lado, la longitud del enlace es corto (1.5 Ångström) y su alta energía de disociación es de 347 kJ/mol, lo que hace que sea más fuerte y resistente al ataque enzimático [33].

Las enzimas implicadas en el proceso de biodegradación del policloruro de vinilo son principalmente las hidroxilasas, catalasas y peroxidasas. Debido a las características hidrofóbicas y recalcitrantes del polímero, las enzimas ideales para la degradación del PVC son aquellas que tienen una alta especificidad y actividad en la presencia de este tipo de compuestos. Por ejemplo, se pueden mencionar el alcanohidroxilasa y la hidroquinona peroxidasa [32], [34].

El alcanohidroxilasa es una enzima que puede oxidar los alcanos, lo que permite la ruptura de los enlaces C-C en el PVC. La hidroquinona peroxidasa, por su parte, puede oxidar la hidroquinona, un compuesto presente en el PVC, lo que también contribuye a su degradación. Las lacasas, a su vez, son enzimas capaces de oxidar los fenoles, otro tipo de compuestos presentes en algunos tipos de PVC. Sin embargo, aunque estas enzimas son efectivas para la degradación del PVC, su uso en procesos industriales aún se encuentra en etapas experimentales. Se requiere de un mayor conocimiento acerca de la especificidad y la eficiencia de estas enzimas para poder aplicarlas de manera efectiva en la industria, y así contribuir a la disminución de la contaminación ambiental causada por los polímeros [32].

1.6.2. Reacciones principales de la biodegradación del PVC

La biodegradación de plásticos como el PVC implica al menos tres reacciones bajo las vías de hidrólisis de enlaces y oxidación por radicales, partiendo de microorganismos biodegradables, como es el caso de los hongos y las bacterias, condiciones ambientales (Temperatura, humedad,

pH) y por compuestos auxiliares (Surfactantes y biosurfactantes). Estas reacciones son: **a) despolimerización** o ruptura de cadenas de polímeros, **b) formación de intermedios oxidados** y **c) mineralización** de intermedios a CO_2 , Cl^- y H_2O ; cuando el PVC es el objetivo de degradación, la primera y esencial reacción es la despolimerización [34].

1.7. Proceso de biodegradación

Hace referencia a la degradación generada por microorganismos (hongos, bacterias, algas y actinomicetos) o por sustancias que ellos secretan en sus procesos biológicos (enzimas), se lleva a cabo en materiales que contienen alta fuente carbono en sus moléculas, consiste en un proceso natural de descomposición de un material comúnmente en dióxido de carbono (CO_2), nitrógeno (N_2), agua (H_2O), metano (CH_4) y constituyentes orgánicos o biomasa, sin embargo dependiendo del sustrato a degradar se produce la síntesis de nuevos compuestos de gran utilidad para el microorganismo; esta descomposición se obtiene gracias al proceso metabólico y por la acción enzimática de los microorganismos, lo que provoca la alteración de la estructura física y química de la cadena polimérica minimizando a su vez el peso molecular del mismo [32].

El proceso de biodegradación consiste en la descomposición de un material en los diferentes elementos químicos que lo conforman y para que genere el deterioro del material, se necesita la acción catalítica de las enzimas; es decir que dependiendo del material y del microorganismo, se producirán una serie de enzimas asociadas a la degradación de los polímeros, las cuales catalizan la formación de una o varias reacciones en la superficie del material, entre estas se encuentran las reacciones de oxidación, reducción, hidrolisis y esterificación, por otro lado algunas de las exoenzimas usan oxígeno o peróxido para generar grupos carbonilo o hidroxilo sobre el polímero [18]. Este tipo de degradación puede seguir la vía aerobia, donde los microorganismos degradan en presencia de oxígeno o anaerobia, en ausencia de él [35].

1.7.1. Etapas del proceso de biodegradación por microorganismos

- a.** Biodeterioro: Se degrada superficialmente el material alterando sus propiedades físicas gracias a la formación de biopelículas microbianas sobre el polímero o en el interior de él, que son el

resultado de la secreción de una matriz polimérica que se filtra en las estructuras porosas, lo que causa la fragmentación del material [6].

- b.** Biofragmentación o despolimerización: Comienza la acción catalítica de las enzimas sobre los polímeros plásticos [18], estas enzimas descomponen las moléculas poliméricas en monómeros u oligómeros reduciendo a su vez, el peso molecular del material.
- c.** Asimilación: El polímero es consumido como sustrato por los microorganismos, en este proceso los microorganismos son capaces de crecer y reproducirse mientras consumen sustratos nutritivos; es decir que implica la integración de los compuestos derivados del plástico al metabolismo celular del microorganismo [35].
- d.** Mineralización: algunos metabolitos simples y complejos son mineralizados excretando al medio circundante compuestos como dióxido de carbono, metano, agua o nitrógeno [6].

1.7.2. Factores que afectan la biodegradación por microorganismos

- a.** Condiciones del medio: pH, temperatura, oxígeno, cantidad de luz, nutrientes, humedad [6],[29],[32].
- b.** Estructura fisicoquímica del polímero: Peso molecular, longitud de la cadena polimérica, grado de cristalinidad, flexibilidad y estabilidad estructural del polímero, área superficial, tensión superficial, forma, densidad, porosidad, tipo de enlace químico y disponibilidad de grupos funcionales que aumentan las propiedades hidrofílicas [6], [32],[36].
- c.** Características de las enzimas: Está relacionado con su capacidad para realizar el proceso de biodegradación dependiendo de factores ambientales y su asociación con el tipo de polímero a degradar [18], [29].

1.7.3. Técnicas para medir la biodegradación

Las técnicas empleadas para medir la biodegradación de los polímeros son muy importantes para evaluar la capacidad que tuvieron los microorganismos para descomponer el polímero. Las técnicas comúnmente empleadas son:

- a.** Pérdida de masa con el tiempo: Esta técnica es usada para determinar la disminución del peso a lo largo del tiempo y es muy útil para evaluar la capacidad de los polímeros para

descomponerse [36]. La pérdida de masa puede ser causada por una variedad de factores, incluyendo [37]:

- ✓ **Exposición a la luz ultravioleta:** Cuando el PVC se expone a la radiación UV procedente del sol o de fuentes artificiales, la energía luminosa puede romper las cadenas poliméricas, haciendo que se fragmenten en trozos más pequeños. Este proceso, conocido como foto degradación, puede debilitar la estructura del material y provocar una pérdida de masa.
 - ✓ **Exposición a temperaturas elevadas:** Cuando el PVC se calienta, el aumento de energía puede hacer que las cadenas poliméricas se rompan más rápidamente, lo que provoca una pérdida de masa. Esto es especialmente problemático en aplicaciones en las que el PVC está expuesto a altas temperaturas durante periodos prolongados, como en el cableado eléctrico o los componentes de automoción.
 - ✓ **Exposición a productos químicos:** Sustancias químicas como ácidos, bases y disolventes pueden atacar las cadenas poliméricas, provocando su ruptura y una pérdida de masa. Esto puede ser preocupante en industrias como la farmacéutica, donde el PVC se utiliza en envases y debe ser resistente a la exposición química.
 - ✓ **Biodegradación:** El PVC puede ser biodegradado por ciertos microorganismos, como bacterias y hongos. Aunque esto puede parecer un rasgo deseable, ya que permitiría que el PVC se descompusiera de forma natural y reduciría los residuos, el proceso también puede provocar una pérdida de masa y una disminución de la resistencia y durabilidad del material.
- b.** Alteraciones en la morfología de la superficie: Aumento de la rugosidad, formación de picaduras y de grietas: Ciertas sustancias químicas pueden reaccionar con el polímero y provocar la formación de pequeñas picaduras y depresiones en la superficie. Esto puede dar lugar a una superficie rugosa y desigual, menos agradable estéticamente y más propensa a la corrosión y el desgaste. Además, la exposición prolongada a ciertos tipos de bacterias y hongos puede provocar la biodegradación de los polímeros, lo que puede hacer que la superficie se vuelva áspera y picada.
- c.** Cambios en la energía superficial o la humectabilidad: La energía superficial del PVC puede disminuir a medida que se degrada, haciendo que el material sea más difícil de mojar. La

capacidad de humectación se refiere a la capacidad de un líquido para extenderse sobre una superficie sólida [37], [38].

- d.** Modificaciones de color o apariencia: El color del polímero puede alterarse a medida que se degrada. El polímero puede adquirir un tono más claro u oscuro dependiendo su estado original. El aspecto del polímero también puede transformarse, volviéndose más opaco o brillante, a medida que se degrada [36], [37].
- e.** Cambios en las propiedades mecánicas: La degradación puede afectar las características mecánicas del polímero, como su resistencia a la tracción y alargamiento a la rotura, entre otras propiedades. Estas pueden sufrir una disminución debido a este proceso [38].
- f.** Cambios en las propiedades térmicas: Las cualidades relacionadas con el calor del polímero pueden variar durante el proceso de deterioro. La temperatura en la que el polímero pasa de ser un material rígido a uno más flexible (T_g) y el punto en el que se funde (T_m) pueden reducirse como resultado de la degradación [37], [38].
- g.** Alteraciones en la estructura química: La composición química del polímero puede sufrir alteraciones durante el proceso de degradación. A medida que se produce la degradación, el peso molecular del polímero puede disminuir, y pueden formarse nuevos grupos funcionales [38].
- h.** Liberación de productos de degradación: El polímero puede liberar productos de degradación con el tiempo. Estos productos de degradación pueden ser monómeros, oligómeros u otros compuestos de menor tamaño.
- i.** Liberación de gases: Esta técnica mide la liberación de gases (CO_2) que son presentados en el proceso de biodegradación, indicando la actividad metabólica que realizan los microorganismos en el polímero [36]. Los gases más comunes que se liberan del PVC degradado son el dióxido de carbono y el metano [34].

1.8. Microorganismos degradadores de plásticos

La biodegradación se da a través de procesos metabólicos y enzimáticos de los microorganismos como: bacterias, hongos, etc, quienes secretan enzimas que se encargan de fragmentar la estructura molecular de las cadenas carbonadas en dióxido de carbono o metano, donde la naturaleza y la actividad catalítica de las diferentes enzimas implicadas en la biodegradación varían en función de la especie microbiana y de la cepa utilizada. Los microorganismos actúan de forma individual, colonias o en consorcios microbianos, desarrollando un papel importante en el ecosistema y a su vez están estrechamente relacionados con la biodegradación de plásticos sintéticos, naturales y biodegradables [36]. Esta biodegradación implica 2 fases, una despolimerización inicial y una degradación de las moléculas más pequeñas. Las bacterias y hongos son microorganismos productores de enzimas extracelulares que favorecen la degradación de diversos bioplásticos y plásticos sintéticos que tienen la capacidad de crecer en diferentes ambientes naturales y bajo condiciones de estrés [6].

Las bacterias son microorganismos procariotas unicelulares con ADN circular y sin núcleo, clasificadas según su forma como cocos y bacilos o por su capacidad de retención de colorante (Gram positivas o gram negativas) y algunas pueden contener flagelos. Los hongos filamentosos, por su parte, son microorganismos pluricelulares que se constituyen por filamentos llamados hifas y son capaces, bajo un tratamiento especial, de degradar el plástico, como muchos residuos sólidos en niveles que alcanzan más de 50%, lo que representa un gran avance, esto se lleva a cabo mediante la secreción de enzimas extracelulares que descomponen los polímeros en compuestos simples, de igual forma los hongos tienen la capacidad de crecer entre bajas y altas temperaturas. [38], [6].

Entre las bacterias capaces de crecer en medios terrestres se encuentran las actinobacterias tales como: *Amycolatopsis*, *Actinomadura*, *Nonomuraea* y *Streptomyces*, bacterias como *Thermoactinomyces*, *Laceyella*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Bulkholderia*; género que se ha identificado por su capacidad para degradar plásticos. En cuanto a los hongos filamentosos, los principales son *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* [6], por otro lado, se destaca un grupo mixto de la familia de los hongos, el cual es una coalición de *Cladosporium cladosporioides*, alianza que tuvo presencia de varias especies, incluyendo *C. pseudocladosporioides*, *C.*

tenuissimum, *C. asperulatum* y *C. montecillanum*, además de otros dos tipos de hongos *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium chrysogenum* [39].

En ambientes acuáticos, el grupo de microorganismos degradadores de plásticos son las bacterias, destacando géneros como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alcanivorax*, *Tenacibaculum*, *Leptothrix*, *Enterobacter*, *Variovorax* y *Gracilibacillus* y en menor proporción se encuentran aislamientos de especies de actinomicetos como *Actinomyces* y *Streptomyces* [6].

1.9. *Aspergillus niger*

Aspergillus es un hongo filamentoso hialino, saprofito, perteneciente al filo *Ascomycota*. Se encuentra formado por hifas hialinas septadas y puede tener reproducción sexual (con formación de ascosporas en el interior de ascas) y asexual (con formación de conidios) [40].

Aspergillus niger se encuentra en una amplia variedad de ambientes, incluyendo: suelos, aire, agua, alimentos, a su vez tiene una buena tolerancia a diversas condiciones las cuales le permite crecer en un amplio rango de temperaturas y pH [41].

1.9.1. Morfología de *A. niger*

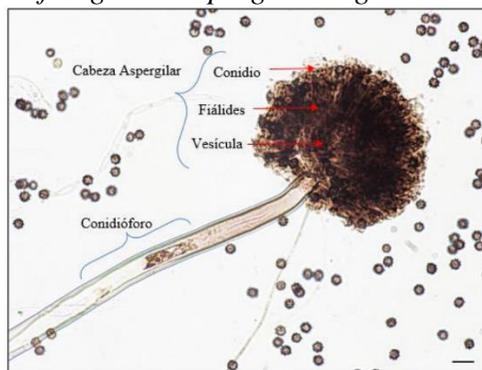
Es de vital importancia reconocer la morfología y características principales del hongo *A. niger*, puesto que es el microorganismo que sintetizará las enzimas asociadas a la degradación del PVC en el presente proyecto. De igual forma, sirve para identificar que el hongo que está creciendo sea realmente el que se cultivó, sin la presencia de patógenos que interfieran en el crecimiento y la síntesis de enzimas.

Las cabezas de los hongos conidiales pueden tener diferentes formas y colores que van desde negro hasta tonos grises y cafés, y están compuestas por cadenas de conidios que pueden ser irregulares o bien definidas. Los conidióforos, que son los que sostienen las cabezas, son transparentes o de color café claro. Estos se ramifican en la punta, lo que le da una forma similar a un árbol. Las vesículas son redondas o globulosas, transparentes o cafés, y miden entre 20 y 100 micrómetros de diámetro. A medida que maduran, producen células conidiogénicas en su superficie, lo que crea un aspecto radiado. Los conidios, que son las esporas asexuales responsables de la propagación,

varían en color según la madurez y la especie, pudiendo ser negros, marrones o verdes oscuros [42], [43].

En agar, las colonias de estos hongos suelen ser de color negro debido a los pigmentos oscuros, aunque también pueden variar entre marrón y verde dependiendo del ambiente. Las hifas, que son los filamentos largos y delgados que forman el cuerpo del hongo, tienen muchas ramificaciones y paredes internas que dividen las células. Estas son transparentes y bien desarrolladas. Los conidios, que se forman en estructuras llamadas conidióforos, son pequeños y ovalados [44].

Figura 3.
Morfología de Aspergillus niger



Nota. La figura muestra la estructura a escala microscópica de *A niger* con sus partes principales. Tomado de: G.Partillo. “*Aspergillus niger*”. [En línea]. Disponible en: <https://www.jardineriaon.com/aspergillus-niger.html>

1.9.2. Taxonomía

La clasificación taxonómica del hongo filamentoso *Aspergillus niger* se muestra en la tabla 1 [45].

Tabla 1.
Taxonomía de A. niger

Dominio	<i>Eukarya</i>
Reino	<i>Fungi</i>
Filo	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Eurotiomycetes</i>
Orden	<i>Eurotiales</i>
Familia	<i>Trichocomaceae</i>
Género	<i>Aspergillus</i>
Especie	<i>Aspergillus niger</i>

Nota. La tabla expone la clasificación taxonómica del hongo *Aspergillus niger*. Tomado de: L. Abarca. "Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial". Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona), Spain. [PDF]. (2005) Disponible: <http://www.reviberoammicol.com/2000-17/S79S84.pdf>

1.9.3. Reproducción y crecimiento

Conocer la reproducción de *Aspergillus niger* en el contexto de la investigación es crucial para determinar los factores ambientales como pH, temperatura y humedad que favorecen su crecimiento óptimo y síntesis de enzimas de interés. A continuación, se mencionan dichas características.

La reproducción de estos organismos se produce de forma sexual y asexual, sin embargo, se caracteriza más por la reproducción asexual gracias a que pueden producir conidios y estos se encuentran en el suelo en muchos de sus tratamientos naturales y la mayoría de ellos es termo tolerante, por lo que puede crecer en un rango de 9°C a 57°C aproximadamente, con baja humedad, y a su vez pueden sobrevivir a temperaturas muy altas como de 70°C. Su pH óptimo es de 4 a 6.5 [28], [42].

Los hongos que pertenecen a este género son saprófitos y se encuentran en hábitats en los que hay mucha humedad. Su hábitad ideal es el heno y el compostaje. Crecen principalmente sobre la materia orgánica muerta, a la que ayudan a descomponer. Debido a ello, estos hongos son parte importante de las cadenas alimentarias de los ecosistemas en los que se encuentran, ya que son un

potente elemento descomponedor de la materia orgánica, transformándola en abono para el suelo [4].

1.9.4. Descripción microscópica

Es un hongo filamentoso hialino y conidióforo, formado por hifas hialinas tabicadas, estas hifas forman un hilo y se encuentran divididas por un septo y son transparentes. Tiene vesículas globosas y sus conidióforos son largos (400-3000µm) lisos y biseriados. Es un hongo ubicuo de distribución mundial de vida saprófita, que produce un moho negro en vegetales, comúnmente en la lechuga, el tomate o la acelga y limón. Es una de las especies más corrientes del género *Aspergillus* [46].

1.9.5. Descripción macroscópica

Este tipo de organismo crecen en colonias de rápido crecimiento por lo cual es muy fácil de detectar, cuando este se presenta con un color blanco significa que es un micelio joven y mientras pasa el tiempo empieza a tener un color más oscuro, hasta llegar a un negro azabache y un marrón oscuro [28], [46].

Figura 4.
Observación micro y macroscópica de A. niger



Nota. En la figura se muestra la estructura del hongo *A. niger*, la imagen izquierda evidencia la morfología microscópica del microorganismo, mientras que la derecha muestra la observación macroscópica del mismo. Tomado de: F. Mokobi “*Aspergillus niger*- An Overview”. (29/04/2021). Disponible en: <https://microbenotes.com/aspergillus-niger/>

1.9.6. Importancia y aplicaciones

Es uno de los microorganismos más importantes y utilizados en el campo de la biotecnología, ya que con él se puede producir enzimas extracelulares, ácido cítrico y ácido glucónico, además es utilizado para la biotransformación y tratamientos de residuos [47]. En las últimas décadas se ha

desarrollado como un importante huésped de transformación para sobre expresar enzimas alimentarias o de interés industrial [41], [47]. Esta información es relevante, pues gracias a su alta variedad de enzimas, es que se eligió el microorganismo capaz de sintetizar enzimas biodegradadoras de plásticos como lo es en este caso, el PVC.

1.9.7. Enzimas sintetizadas por A. niger

El género *Aspergillus* es conocido por su capacidad para secretar un alto nivel de enzimas al medioambiente. Estas enzimas son de importancia comercial, debido que su obtención es económicamente viable y son utilizadas a nivel industrial como suplementos y aditivos alimentarios, entre otros usos. Dentro de las enzimas extracelulares reportadas, se pueden encontrar: tanasa, lacasa, α -amilasa, oxidasa, glucosa oxidasa, catalasa, deshidrogenasa, hidrolasa, celulasa, pectinasa, Proteasa, lipasa, fitasa, pitasa, invertasa, keratinasa, DNasa, elastasa, OTasa, α -galactosidasa y β -galactosidasa, nucleasa, amiloglucosidasa, β -glucosidasa, xylanasa, tirosinasa, β -gluconasa, glucoamilasa, glucosa aerodeshidrogenasa, α -glucosidasa, α -D-glucosidasa, β -glucosidasa, hemicelulasa, hesperidinas, peroxidasa, esterasa, cutinasa [41].

Aspergillus niger es un hongo conocido por su capacidad para producir enzimas que pueden ser útiles en la biodegradación de varios polímeros, pero que en este caso nos centraremos del PVC [29], [32].

- a.** Lipasas: Este tipo de enzimas descomponen los ésteres; es decir, los enlaces covalentes que unen los monómeros que conforman el PVC.
- b.** Hidrolasas: Estas enzimas pueden romper los enlaces entre átomos de carbono y oxígeno, liberando de esta manera monómeros de cloruro de vinilo.
- c.** Oxidorreductasas: Son las enzimas encargadas de catalizar las reacciones de oxidación y reducción, las cuales ayudan a romper las cadenas moleculares del PVC.

Para el caso del presente proyecto el tipo de degradación es extracelular, en razón a que las enzimas se liberan al medio y descomponen el PVC en fragmentos más pequeños.

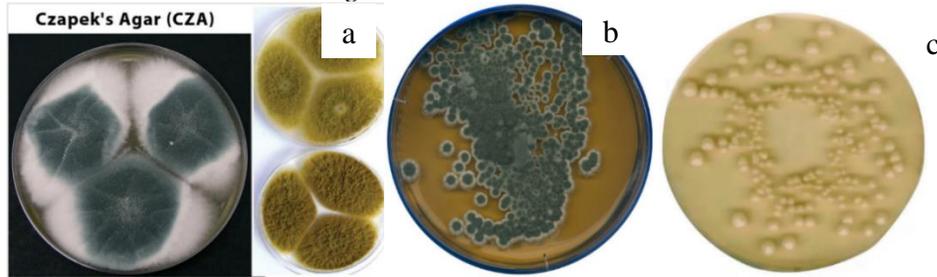
1.9.8. Principales medios de cultivo de *Aspergillus niger*

- a.** El Agar Modificado Czapek-Dox (CZA) es un medio de cultivo muy útil para el crecimiento de hongos y la formación de clamidosporas por *C. albicans*. También se utiliza para estudios taxonómicos de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Actinomycetes*. Este medio contiene fuentes químicamente definidas de nitrógeno inorgánico y carbono, así como reguladores de pH como el nitrato de sodio, la sacarosa, las sales de potasio, el cloruro de potasio, el glicerofosfato de magnesio y el sulfato ferroso. Para evitar la precipitación de fosfato de magnesio, se prepara sin sulfato de magnesio y fosfato de potasio. Además, si se necesitara, se puede aumentar la acidez del medio para los organismos acidófilos. Es interesante destacar que el agar bacteriológico es el agente que permite que el medio se solidifique, lo que es crucial para la observación de los cultivos [48].

- b.** El Extracto de Malta Agar (MEA) es un medio de cultivo que se obtiene a partir de ingredientes como la maltosa, la peptona, la sal y el agar. Este medio es altamente nutritivo y rico en carbohidratos. Contiene dextrina y glicerol como fuentes de carbono y peptona como fuente de nitrógeno. El agar bacteriológico es el agente solidificante que le da a este medio su consistencia característica. Su pH ácido es óptimo para el crecimiento de levaduras y hongos, pero no para el crecimiento de bacterias [49].

- c.** Agar papa dextrosa (PDA) es un tipo de medio de cultivo que se prepara utilizando una infusión de patata y dextrosa. Este medio es altamente nutritivo, lo que significa que ayuda a que los hongos y las levaduras crezcan y produzcan pigmentos en algunos tipos de dermatofitos. Para evitar el crecimiento bacteriano, se puede bajar el pH del medio utilizando ácido tartárico al 10%. También se utiliza agar para solidificar el medio, lo que permite que los microorganismos crezcan en forma de colonias. La papa proporciona nutrientes como carbohidratos, proteínas y sales minerales que favorecen el crecimiento de hongos y levaduras, mientras que la dextrosa es una fuente de carbono que estimula el crecimiento de microorganismos [50].

Figura 5.
Medios de cultivo de A. niger



Nota. En la figura se muestra los medios de cultivo del hongo *A. niger*, la imagen (a) se evidencia el crecimiento en Agar Modificado Czapek-Dox (CZA), en la imagen (b) Extracto de Malta Agar (MEA) y por último en la imagen (c) se evidencia en el medio de cultivo de Agar papa dextrosa (PDA). Tomado de: OPS (Organización panamericana de la salud) Género *Aspergillus niger*. (2019). Disponible:

<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.paho.org%2Fes%2Ffile%2F86739%2Fdownload%3Ftoken%3DitKk-0dc&psig=AOvVaw2zO5rq3rqRi6i7Wfxj5F01&ust=1716314884831000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CAUQn5wMahcKEwj48LTY6pyGAXUAAAAAHQAAAAQBA>

1.9.9. Residuos agroindustriales

El hongo *Aspergillus niger* tiene la capacidad de crecer en una gran variedad de residuos agrícolas gracias a su alto contenido de nutrientes. Estos desechos incluyen el bagazo de caña, la cáscara de frutas, verduras o tubérculos, granos, café y semillas. Todos estos elementos contienen azúcares, proteínas y otros elementos que son una fuente de alimento esencial para su crecimiento [51].

1.10. *Solanum tuberosum L*

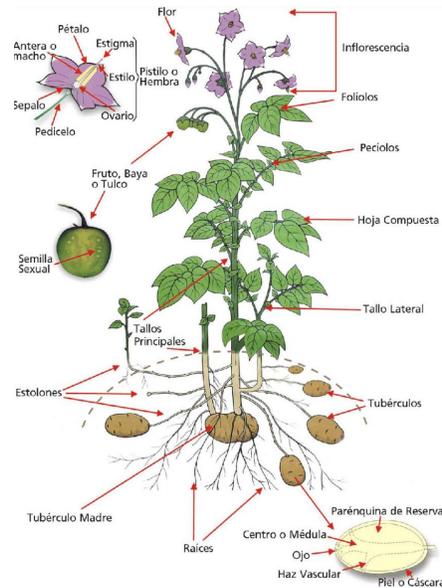
La papa, también conocida como "*Solanum tuberosum L*", es una planta de naturaleza herbácea tocosa perenne, originaria de la cordillera de los Andes sudamericanos, la cual ha evolucionado gracias a cruces con otras especies silvestres del mismo género desarrollándose gran variedad de esta [52].

1.10.1. Características morfológicas

Pertenece a la familia de las *Solanáceas*, entre las que se encuentran el tomate, pimiento, ají y berenjena, entre otras. Está compuesta por un sistema aéreo que incluye la inflorescencia, hojas compuestas, tallos, frutos y un sistema subterráneo compuesto por raíces, estolones y tubérculos, sus raíces son finas, largas y presentan ramificaciones, se componen de tallos subterráneos

(Estolones), los cuales originan el tubérculo [54]; este último (Objeto de interés debido a que su cáscara servirá como sustrato para el crecimiento del hongo), es un tallo con tejido caulinar y parenquimático el cual reserva almidón, siendo uno de los nutrientes principales que consume *A. niger* [42].

Figura 6.
Partes de la planta Solanum Tuberosum L.



Nota. En la imagen se muestran las partes principales de la planta de papa *S. tuberosum L.* Hojas, flores, fruto, tallo, tubérculo, entre otras. Tomado de: Agronotips. “Morfología de la planta *Solanum tuberosum L.*”. (2023). Tomado de: <https://www.portalfruticola.com/noticias/2023/03/02/morfologia-de-la-planta-de-papa-solanum-tuberosum-l/>

1.10.2. Estructura del tubérculo

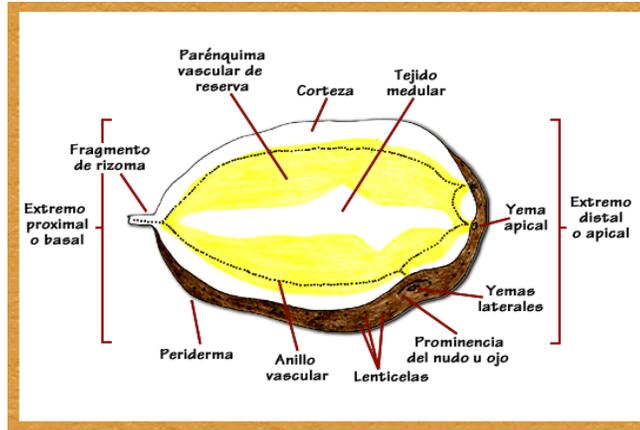
El tubérculo de la planta *S. tuberosum L.*, contiene almidones, principalmente amilosa y amilopectina en una proporción de 1:3, vitamina C y una de las vitaminas del complejo B, una pequeña porción de proteína y varios minerales, lo que ha hecho de este cultivo uno de los más importantes para la alimentación. El almidón de la papa se utiliza para la elaboración de papel, textiles, pegamentos, bebidas alcohólicas y varios alimentos [52].

En cuanto a su estructura, se encuentra la cáscara conformada por 2 secciones, la parte exterior del tubérculo (periderma) y la franja estrecha poco visible (corteza), posee un tallo modificado que se

ramifica hacia las yemas, denominada médula. El espacio entre la médula y la corteza está relleno de un tejido que recibe el nombre de parénquima vascular de almacenamiento, el cual está separado en dos porciones por el anillo vascular. El tubérculo está constituido por aproximadamente 2% de cáscara, 75% a 85% de parénquima vascular de almacenamiento y de 14% a 20% de médula, como se muestra en la figura 5 [14].

Figura 7.

Tubérculo de Solanum tuberosum L.



Nota. En la imagen se muestra la estructura del tubérculo de papa con sus partes. Tomado de: H. Flores “Validación de un modelo basado en el concepto grados día para el pronóstico del riego en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum L.*) en el norte de Sinaloa”. (2007). Disponible en: https://www.researchgate.net/figure/Figura-17-Tuberculo-de-papa-con-sus-estructuras-externas-e-internas_fig5_262601962

1.10.3. Taxonomía

En la tabla 2, se sintetiza la descripción taxonómica de *Solanum tuberosum L* según la información proporcionada en la base de datos para nomenclatura “Trópicos” [55]. Esta información sirve como punto de partida para reconocer la proveniencia del sustrato de cultivo a utilizar (Cáscara de papa), brindando características específicas según su clasificación, como lo es ser una especie tuberosa; es decir un tallo subterráneo (Tubérculos), los cuales funcionan como órganos de almacenamiento de nutrientes [52].

Tabla 2.

Clasificación taxonómica de Solanum tuberosum L.

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Asteridae</i>
Superorden	<i>Asteranae Takht</i>
Orden	<i>Solanales Juss. ex Bercht. & J. Presl</i>
Familia	<i>Solanaceae Juss</i>
Género	<i>Solanum</i>
Subgénero	<i>Potatoe</i>
Sección	<i>Petota</i>
Especie	<i>Tuberosum L</i>
Serie	Tuberosa

Nota. La tabla expone la taxonomía de la planta de papa *Solanum Tuberosum L.* Tomado de: Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. [En línea]. Disponible en: <https://www.tropicos.org/name/Search?name=Solanum%20Tuberosum%20L>

1.10.4. Perfil nutricional

Conocer el perfil nutricional de *Solanum tuberosum*, juega un papel importante en el proyecto en cuestión, puesto que brinda información acerca del contenido de nutrientes que posee la papa, los cuales pueden relacionarse positiva o negativamente con las condiciones nutricionales que necesita *A. niger* para crecer y desarrollarse, determinando su viabilidad como sustrato de cultivo.

Teniendo en cuenta lo anterior, la papa después de la postcosecha posee un contenido de humedad de 70%-75%, azúcares totales entre 15,06-24,16%; azúcares reductores de 0,72-6,39% y almidón de 8,67-22,72% y concentración de proteínas de 2,1% [13]. La materia seca se encuentra en un porcentaje de 25 a 30% donde el 60-80% corresponde a almidón, el cual está constituido por sacáridos tales como celulosa, amilasa y amilopectina en una proporción 1:3 que se convierte en glucosa y sacarosa gracias a su descomposición [54].

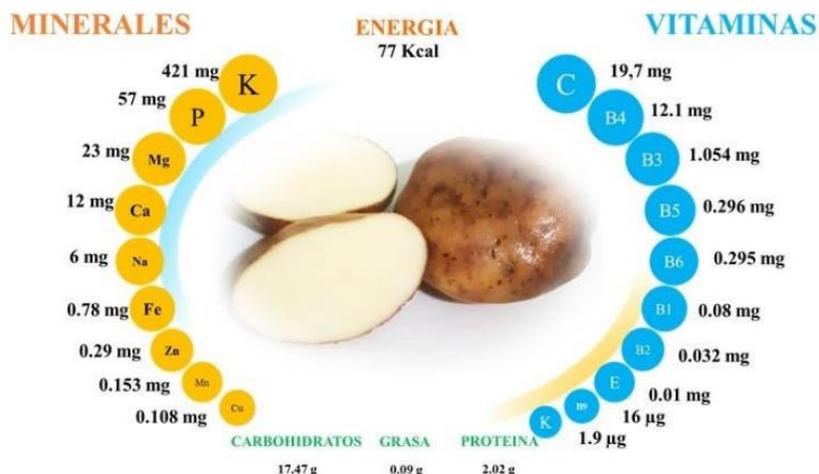
En cuanto al contenido de proteína es equivalente al de los cereales, contiene una cantidad moderada de hierro, vitamina C, B1, B3 y B6, así mismo, minerales como potasio, fósforo y magnesio y compuestos como folato, ácido pantoténico, ácido ascórbico, riboflavina y fenoles

como ácido gálico (518- 643 mg/g de papa), flavonoides (61-87/100 g de papa), mirecetina y ácido clorogénico. Por otro lado, tiene antioxidantes alimentarios, gran cantidad de carbohidratos, fibra y poca grasa [56]. La cantidad de nitrógeno total en base seca se encuentra alrededor del 2%, las proteínas presentes corresponden en un 60-70% a globulinas y de un 20-40% a gluteínas, finalmente en los últimos estudios se han identificado alrededor de 21 aminoácidos que constituyen el tejido del tubérculo [54].

En el sistema enzimático de la papa se pueden encontrar enzimas tales como, la amilasa, fosforilasa, estas dos forman azúcares durante el almacenamiento a bajas temperaturas, también puede estar presente la tirosinasa, que se encarga de la decoloración y transformación posterior de la apariencia de la papa [14][52].

Figura 8.

Aporte nutricional de la papa.



Nota. En la imagen se muestra la composición nutricional de la papa donde se evidencia mayor cantidad de minerales que de vitaminas y la mayor fuente de nutrición son los carbohidratos. Tomado de: G. Serrano., L. F. Castro. “Caracterización fisicoquímica de cinco (5) variedades de papa nativa de la región del Pantano de Arce (Subachoque, Cundinamarca)”. (2020).

1.10.5. Producción y consumo

La papa es el cuarto cultivo alimenticio más importante del mundo en términos de consumo humano, después del trigo, maíz y arroz. La parte comestible es el tubérculo y el consumo es gracias a sus excelentes propiedades y a su facilidad de crecimiento. Su producción anual,

representa aproximadamente la mitad de la producción mundial de todos los tubérculos y raíces, actualmente la producción mundial por año es de 350 millones de toneladas producidas en 19 millones hectáreas situadas en 158 países, siendo la República de China el primer productor de papa a escala mundial [57]. Se cultiva en el continente americano como en el viejo mundo y esto da una gran diversidad morfológica en los tubérculos, ya sea en sus colores, formas o sabores [14].

Según el “XXII Congreso nacional para productores de papa” llevado a cabo en el año 2024, se determinó que, para el caso de Colombia, este tubérculo es uno de los cultivos más importantes representando el tercer lugar después del trigo y el arroz, la papa es sembrada en 11 departamentos cuya producción promedio anual es de 21.5 toneladas y el consumo per cápita es de 57 kg por persona [58]. Cuatro de estos departamentos, concentran su área y producción en un 90%, con una participación del 39%, 24%, 21% y 6%, para los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Nariño y Antioquia respectivamente. Para el caso del mayor productor, el cual es Cundinamarca, los municipios principales son: Villapinzón, Chocontá, Tausa, Bogotá, Subachoque, Pasca, Zipaquirá, Carmen de Carupa, Lenguaque y Guasca [59]. Según el plan de ordenamiento de papa para los años 2019 a 2023, anualmente se siembran 130 mil hectáreas y se producen cerca de 2.8 millones de toneladas de papa [60], de acuerdo con lo reportado por Argonet en el año 2022, la mayor cifra en este periodo ocurrió en el 2019 siendo de 161.064,35 hectáreas (ha), con una producción aproximada de 2.694.789,02 toneladas (ton) y un rendimiento aproximado de 22,81 ton/ha [59].

Teniendo en cuenta que la papa es uno de los tubérculos principales dentro de la canasta básica familiar, cuyo cultivo, producción y consumo se mantiene como un ingreso sostenible, cabe resaltar que el posconsumo genera gran acumulación de desechos. Según estudios realizados en el informe del banco mundial en el año 2017, los desperdicios de alimentos representan un 30% aproximadamente de todos los alimentos a nivel global, donde el proceso de descomposición de los mismos genera gas metano [14]. En el caso de las cáscaras de papa, estos desechos se han aumentado por el creciente consumo de tubérculos, donde la cáscara es desprendida del tubérculo representando aproximadamente el 2% del volumen total comestible y su acumulación en la industria y en los hogares se genera a razón de 2 kg por cada 100 kg de papa [15], estos residuos de cáscara de papa, gracias a los avances biotecnológicos y su contenido de proteínas y

carbohidratos pueden ser aprovechadas a través del proceso de fermentación llevado a cabo por microorganismos y de esta manera otorgarle un mayor tiempo de vida útil al producto [20].

1.10.6. Variedad de papa

En Colombia, las variedades de papa más utilizadas son Tuquerreña o Sabanera, Parda o Pastusa, Rubí, Salentuna, Carriza, Diacol Capiro o R12, ica Única, ica Nevada, ica Nariño, Milenio-1, Diacol Monserrate y papa criolla - yema de huevo [59]. En el caso del presente proyecto se hará énfasis en 2 tipos de papa que fueron utilizados como sustrato para el crecimiento del hongo.

- a. Papa sabanera: Su nombre común es “Sabanera”, cuyo nombre científico es “*Solanum tuberosum*”, pertenece al género “*Solanum*” de la familia de las “*Solanaceas*” y su especie es “*Solanum tuberosum*”, siendo un tipo de tubérculo sabanero. Es una variedad de papa popular en la región andina de Colombia. Es conocida por su forma redondeada a ovalada, con un diámetro mayor a 6.5 cm, su textura es dura y consistente, La piel puede ir desde, el amarillo claro, hasta un café oscuro o roja al madurar y un interior blanco brillante. Tiene un sabor ligeramente dulce y suave, que la hace perfecta para combinar con otros ingredientes en una gran variedad de platos. La papa sabanera es muy apreciada por su alto contenido en nutrientes, como las vitaminas B y C, así como por su contenido en fibra [61], [62], [63].

Figura 9.
Papa Sabanera



Nota. La figura representa el tipo de papa sabanera. Tomado de: Gobernación de Boyacá | Secretaría de Agricultura. “papa”. 2012. [En línea]. Disponible en: <https://www.boyaca.gov.co/secretariaagricultura/papa/>

- b. Papa pastusa: Su nombre común es “Parda o pastusa”, cuyo nombre científico también es “*Solanum tubersum*”, perteneciente al género “*Solanum*”, de la familia “*Solanáceas*”, su especie es “*Solanum tuberosum*” y el tipo es “*Magnoliopsida*”. La papa pastusa se cultiva principalmente en Cundinamarca y Boyacá, principalmente en regiones de clima frío a templado. Es fácil de reconocer por su forma ovalada y tamaño mediano. La piel de la papa pastusa es oscura, sin manchas y esto indica que está fresca y en buen estado. Es una excelente fuente de carbohidratos complejos, fibra dietética, vitaminas (como la vitamina C y algunas del complejo B) y minerales (como el potasio, magnesio y fósforo) [63], [64], [65].

Figura 10.
Papa Pastusa



Nota. En la imagen se muestra la papa parda o pastusa. Tomado de: W. Cortes. Respuesta de papa “*Solanum tuberosum*” variedad Parda Pastusa en rendimiento y calidad a la aplicación de Ácido Glutámico. tesis pre. Facultad de ciencias agropecuarias. Universidad de ciencias ambientales y aplicadas, Bogotá, Colombia, 2022.

1.11. Técnicas para determinar carbohidratos

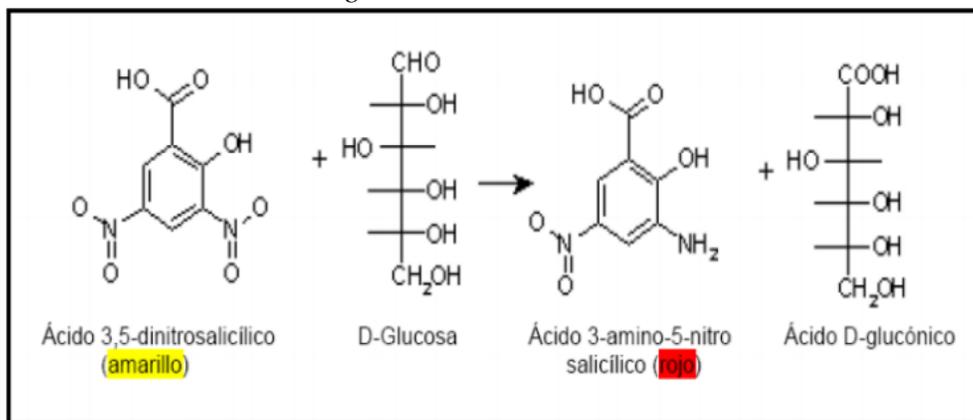
Al realizar determinación de carbohidratos, se asegura que los extractos enzimáticos tengan buena actividad enzimática, permitiendo evaluar la eficacia de las enzimas y de esta manera se puede determinar la cantidad de enzimas activas en la muestra, esta última, se define como la actividad enzimática por cantidad de proteína [66].

Las técnicas implementadas para determinación de carbohidratos tienen como finalidad la cuantificación de azúcares reductores que se encuentran en una muestra problema, los cuales se

miden mediante espectrofotometría UV-Visible, esta es una técnica analítica, donde a determinada longitud de onda, las moléculas contenidas en una muestra absorben las radiaciones electromagnéticas; es decir que permite hallar la concentración de determinado compuesto en solución. El instrumento implementado para llevar a cabo esta técnica es el espectrofotómetro, el cual tiene como principio medir y analizar la luz en función de su longitud de onda, permitiendo la cuantificación y caracterización con exactitud de las propiedades de la luz, como la intensidad, el color y la transmitancia. En el ámbito de la bioquímica y la biología molecular se usan los espectrofotómetros para la determinar de la concentración de proteínas y ácidos nucleicos en muestras biológicas [66]. Teniendo esto presente, entre las técnicas de cuantificación de carbohidratos más utilizadas que requieren de un espectrofotómetro se encuentra el método DNS.

El método DNS (Ácido dinitrosalicílico) o técnica de Miller, es una técnica colorimétrica basada en reacciones redox, donde se usa el ácido 3.5 dinitrosalicílico para hidrolizar los polisacáridos contenidos en una muestra, la cual mediante la ley de Lambert- Beer, permite determinar absorbancias de luz a una longitud de onda de 540-600 nm. Este método se enfoca en una reacción endotérmica que produce un cambio de coloración en la muestra debido a la reducción del DNS (Color amarillo) por la acción de un azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico que presenta un cambio de coloración a rojo ladrillo, naranja o café. [67]

Figura 11.
Reacción del DNS con D-glucosa



Nota. En la imagen se muestra la reacción de oxido-reducción entre el DNS y un azúcar reductor que en el caso del ejemplo es la D-glucosa. Tomado de: C. Díaz, M. Yacelis. “Determinación del contenido de azúcares, proteínas y nitrógeno presentes en medios de cultivos modificados para el crecimiento in vitro del hongo *colletotrichum sp* fitopatógeno del ñame (*dioscórrea alata*) en montería-córdoba”. (2020).

1.12. Técnicas para cuantificar proteínas

La importancia de la cuantificación de proteínas en una muestra problema recae en que permite calcular la cantidad de enzimas presentes en el extracto enzimático y de esta manera estandarizar las condiciones experimentales asegurando un uso adecuado de las enzimas en cada reacción.

Estas técnicas se usan para determinar la cantidad de proteínas presentes en una solución. Muchos de los métodos, se basan en la propiedad intrínseca que poseen las proteínas para absorber la luz y en muchos de los casos la capacidad de ciertas proteínas para formar derivados químicos. Entre los métodos más utilizados, se encuentran: Biuret, Lowry y Bradford, siendo el primero el más implementado por su bajo costo, pocas interferencias y porque es bastante específico para proteínas [68].

El método Biuret detecta la presencia de compuestos de 3 o más enlaces peptídicos, se basa en la formación de un complejo coloreado entre el Cu^{2+} y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio alcalino, donde 1Cu^{2+} se acompleja con 4 NH; es decir que este método se resume en una reacción de las proteínas con una solución alcalina de sulfato de cobre (II), la cual produce una coloración violeta medible a 545 nm en el espectrofotómetro. Cabe resaltar que la intensidad de la coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra, entre más proteínas, más enlaces peptídicos [68].

1.13. Técnicas para identificar proteínas

En el contexto de la investigación, es de vital importancia identificar las proteínas presentes en una muestra problema (Extractos enzimáticos), en razón a que permite correlacionar el tipo de enzima con su eficacia en la reacción que cataliza, que en este caso es la degradación de PVC.

Estas técnicas son implementadas con el fin de identificar o reconocer el tipo de enzimas o proteínas presentes en una muestra, entre ellas se encuentran las técnicas de cromatografía, espectroscopía y electroforesis, siendo esta última la más utilizada por su bajo costo y menor complejidad. La electroforesis es una técnica de laboratorio diseñada para evaluar los pesos moleculares con el objetivo de tener noción de la clase de enzimas presentes en una muestra problema [69]. Esta técnica sirve para separar las moléculas en función de su tamaño y su carga,

estas moléculas son desplazadas a través de un gel y esta velocidad de migración depende de la relación entre su carga y su tamaño, por ende, las moléculas con mayor carga a masa migraran más rápido que aquellas que tiene una carga menor [70]. Existen diferentes tipos y entre ellos los más comunes son: Electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en acetato de celulosa, electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), electroforesis bidimensional electroforesis capilar, Isoelectroenfoque [71].

Para este caso se implementará la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE por sus siglas en ingles “Sodium Dodecil Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis”. Esta técnica se basa en 2 componentes fundamentales: El SDS (Dodecilsulfato de sodio) y el gel de poliacrilamida, el cual cumple el papel de separar las proteínas mediante una matriz [71]. Las proteínas se solubilizan en la presencia del detergente aniónico SDS, el cual rompe las interacciones hidrofóbicas, desnaturalizando las proteínas y uniéndose a ellas. Las proteínas desnaturalizadas de las muestras adquieren una estructura con moléculas de SDS cargadas negativamente a lo largo de la cadena polipeptídica. Es decir; por cada 2 residuos de aminoácidos se une una molécula de SDS. Los complejos SDS-proteínas presentan un valor carga/masa constante, ocasionando su separación de acuerdo con su tamaño cuando estas migran desde el cátodo al ánodo a una velocidad relacionada únicamente con su peso molecular [70].

1.14. Técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM)

La implementación de esta técnica es crucial para el desarrollo del proyecto, puesto que permite una observación detallada de la morfología del polímero (PVC), identificando defectos superficiales como grietas, porosidades o inclusiones provocadas por tratamientos como es el caso de la acción enzimática. Con el fin de realizar un seguimiento analítico de la estructura de un material, se lleva a cabo una técnica que permite la observación y caracterización superficial de muestras en 3 dimensiones gracias a que, a diferencia de los microscopios tradicionales, se aumentan los objetos millones de veces detectando a su vez detalles microscópicos de difícil detección para el ojo humano con una resolución de 10 nm [72].

Esta técnica se puede estudiar en diferentes tipos de materiales como: Metales, cerámicos, polímeros, composites y materia orgánica, cuyas muestras deben encontrarse secas, limpias y ser

buenos conductores eléctricos y resistentes al alto vacío, en tal caso que sea un material no conductor, este se somete a una metalización; es decir que se recubre con una ligera capa metálica como C, Au o Pt/Pd para otorgarle esta propiedad [73].

El equipo implementado para este proceso es un microscopio electrónico el cual arroja una imagen virtual a partir de una señal emitida por la muestra, otorgando un buen poder de resolución, profundidad del campo y contraste, en el cual un haz de electrones acelerados por un alto potencial eléctrico (25.000 Voltios) constituye la fuente de radiación de un microscopio electrónico de barrido (SEM) por sus siglas en inglés “Scanning Electron Microscope”; es decir que este método se fundamenta en la detección y posterior visualización de las señales que son el resultado de las interacciones entre un haz de electrones con la materia, suministrando la composición estructural de un material con base a los ejes (xyz) [73] [74].

2. METODOLOGÍA

2.1.Lugar

Las pruebas en laboratorio tanto de la caracterización, cultivo y crecimiento del hongo, como de la evaluación de la biodegradación sobre las probetas de PVC y pruebas de electroforesis fueron desarrollados en los laboratorios de la Fundación Universidad de América, para el caso de la microscopía electrónica de barrido (SEM), esta técnica se realizó en la Universidad Javeriana de Colombia y finalmente, las pruebas de pretratamiento de los polímeros se efectuaron con el préstamo de la cámara de luz UV por parte de la empresa Pelikan Colombia S.A.S. El alcance del proyecto fue a nivel laboratorio sin llegar a un escalado ni de planta piloto ni industrial.

La metodología del Proyecto de investigación se dividió en 3 secciones; es decir, las actividades realizadas para cumplir cada uno de los 3 objetivos específicos planteados como se muestra a continuación.

2.2. Métodos de análisis documental o experimental para cumplir con objetivo esp. 1.

(Obtener un extracto enzimático crudo proveniente del cultivo de *A. niger* en cáscaras de papa como sustrato)

2.2.1. Banco de trabajo

El proyecto tuvo como punto de partida, la preparación del banco de cultivo del hongo *Aspergillus niger*. Esta preparación, se realizó con el fin de conservar *ex situ* (Fuera de sus ambientes naturales), los microorganismos; que constituyeron el material de trabajo para el proyecto. Dentro de las condiciones óptimas para conservar las cepas, se encuentran: La pureza del cultivo, prevención de contaminaciones, viabilidad celular (70 – 80%) durante el tiempo de conservación y estabilidad genética de las células [75]. El tipo de método de conservación para el hongo implementado en el presente proyecto (*A. niger*) fue un método a corto plazo, pues el uso de la cepa es frecuente; es decir que es necesario que esta se mantenga activa. El método consistió en una conservación por suspensión en una solución nutritiva con caldo Sabouraud, el cual contiene dextrosa (proporciona carbono y energía), mezcla de digerido péptico de tejido animal y pancreático de caseína (1:1) que proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos y como agente solidificante contiene gar bacteriológico [76].

Para la preparación de esta solución se vertieron 1.3 mL de glicerol, 1.14 g de caldo Sabouraud y 37 mL de agua destilada en un frasco shoot (Estas cantidades fueron para preparar un banco de trabajo de 15 tubos eppendorf con los discos de *A. niger*), dejando en agitación por 15 minutos a una temperatura de 30°C [77]. El material a utilizar en la cabina (Asas, tubos eppendorf, puntas azules) se envolvió en papel Kraft y junto con la solución preparada anteriormente se ingresó al autoclave; es de vital importancia colocar cinta indicadora encima de los materiales, pues el cambio de coloración de la misma una vez finalizada la esterilización, confirmara que este proceso fue efectivo. Una vez introducidos los materiales al autoclave, se cerró la tapa verificando que no hubiese escape de aire y que la válvula de presión se encontrara cerrada. La esterilización se llevó a cabo a una temperatura de 120°C hasta llegar a los 15 psi [78], acto seguido se dejó reposar el autoclave por 15 min y se abrió la válvula de presión hasta que esta llegase a 0 Psi. La cabina laminar por su parte se limpió con etanol y se esterilizó con luz UV por un periodo de 15 minutos. Posterior a ello, se abrió la tapa del autoclave verificando que la cinta indicadora se hubiese tornado de color negro, lo que indicó una correcta esterilización, de esta manera los materiales del autoclave se ingresaron a la cabina, dejándolos reposar un tiempo prudente para que la temperatura no afectara el hongo cuando este se introdujera en el medio.

Figura 12.

Esterilización en el autoclave.

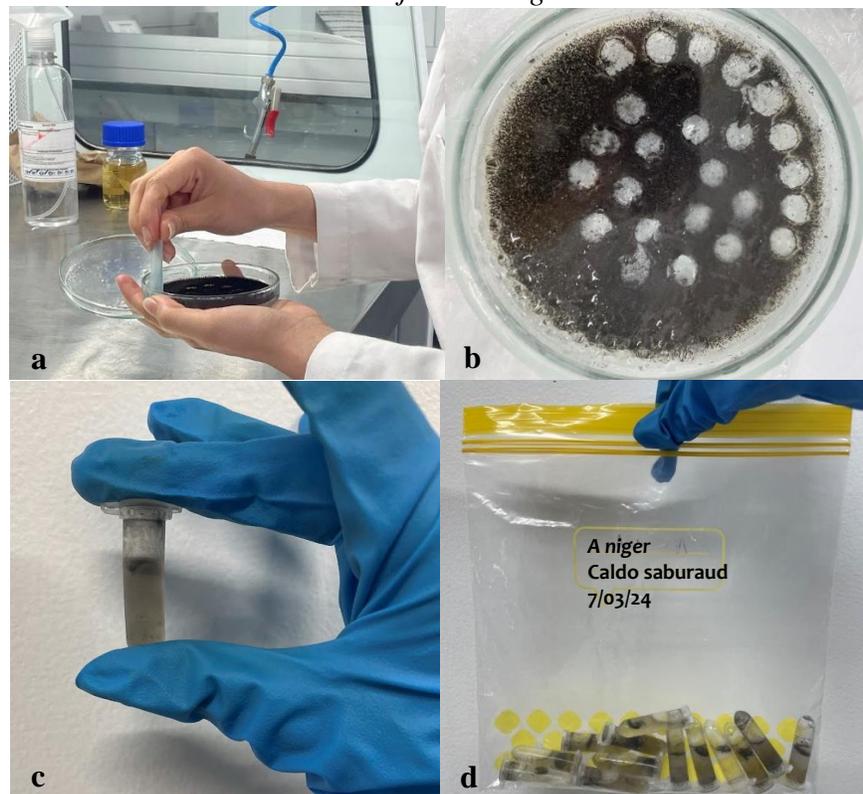


Nota. La figura muestra el proceso de esterilización, en la imagen “a” se puede evidenciar el autoclave implementado para la esterilización del material a utilizar y cuando este llega a los 15 psi, en la imagen “b” se muestra como la cinta indicadora evidencia una esterilización efectiva gracias al cambio de coloración de la misma en los elementos ingresados.

El cultivo del hongo que se implementó fue *Aspergillus niger* CMPUJ:H002 proveniente de una cepa proporcionada por la Universidad Javeriana de Colombia. Una vez esterilizados los materiales y la cabina se midieron 1.5 mL aproximadamente de solución y se adicionaron al tubo eppendorf [79], acto seguido se tomó una punta azul para marcar el disco del hongo, el cual se encontraba cultivado en cajas Petri y con un asa redonda se colocó el disco dentro del tubo eppendorff que contenía la solución del caldo nutritivo. Finalmente se embolsaron, marcaron y se refrigeró el banco de trabajo a una temperatura de 4°C.

Figura 13.

Obtención del banco de trabajo de A. niger



Nota. En la imagen a y b se muestran la obtención de los discos realizadas con puntas azules, las imágenes c y d, por su parte muestran cada uno de los tubos eppendorf con caldo sabraud y en el interior de este, los discos del hongo *A. niger*.

2.2.2. Tratamiento y caracterización de la cáscara de papa

Para este procedimiento, se realizó la siguiente técnica de muestreo: Recolección papas sabaneras y pastusas medianas (Aproximadamente 5 de cada una), verificando parámetros de calidad tales como: Las papas seleccionadas fueron homogéneas; es decir que se verificó que estuviesen libres

de magulladuras, picaduras y heridas. Por otro lado, se aseguró que se encontraran en buen estado de madurez fisiológica, presentando características como: Una piel más gruesa y resistente a los daños (Al cortar la papa pastusa, esta debe tener una consistencia firme y harinosa, mientras que la sabanera debe ser menos harinosa. En contraste al frotar la piel de las papas, esta no debe desprenderse), por otro lado, una papa en buen estado de maduración pasa de un amarillo pálido a un amarillo más oscuro o marrón, la forma fue redonda y firme, indicando la ausencia de puntos blandos ni imperfecciones [80].

Una vez obtenidas las papas, se lavaron bien para retirar toda clase de mugre y suciedad contenida en la cáscara que pueda afectar el crecimiento del hongo o una esterilización efectiva y posterior a ello, se pelaron con el fin de recolectar los residuos de cáscara de papa. Mediante revisión bibliográfica se realizó la caracterización de las cáscaras de papa de ambas variedades para de esta manera comparar el aporte nutricional de las mismas y su influencia en el crecimiento de *A. niger*. Las cáscaras de papa se introdujeron en cajas Petri de vidrio simulando una “Cama” para su posterior esterilización [54].

Figura 14.

Medio sólido de cáscara de papa.



Nota. La figura muestra la cama de cáscara de papa en la caja Petri que se utilizará como medio de cultivo sólido para el crecimiento del hongo *Aspergillus niger*

2.2.3. Cultivo del hongo y activación de la cepa

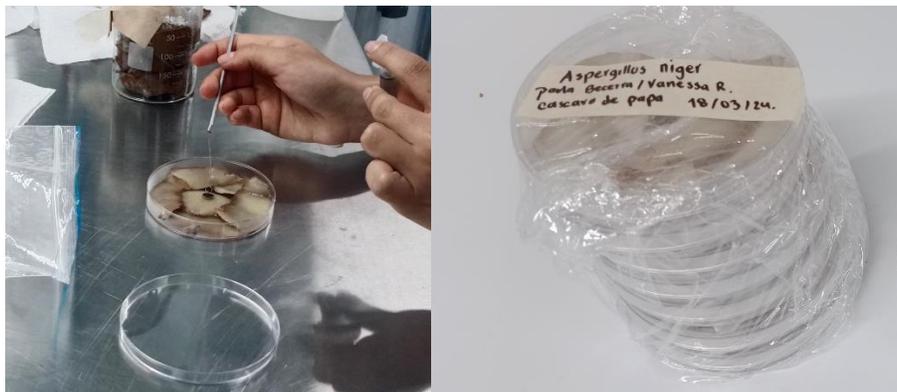
Este proceso fue el punto de partida para que *A. niger* iniciara su crecimiento en los residuos agroindustriales de cáscara de papa. La activación de la cepa comenzó con la esterilización de los equipos y materiales a utilizar, para el caso de la cabina laminar se limpió con etanol y se esterilizó

con luz UV por un tiempo de 15 minutos, para el caso del material, se ingresó al autoclave tanto las asas redondas, como las cajas Petri de vidrio con una cama de cáscara de papa previamente lavada y cortada, estos materiales se dejaron en el autoclave hasta que la presión alcanzara los 15 Psi y una vez alcanzados, se deja reposar por 15 minutos y se abre la válvula de presión para que esta llegue a 0 Psi [78]. Una vez ocurrido esto, se ingresaron a la cabina ya esterilizada los materiales del autoclave y se llevó a cabo el cultivo del hongo.

Para ello, se verificó que la cáscara de papa estuviese a una temperatura de cachete y de esta manera no afectara el crecimiento del hongo o causara su muerte debido a la alta temperatura. Una vez verificada la temperatura, se tomó con la ayuda de un asa redonda un disco de *Aspergillus niger* del tubo eppendorf del banco de trabajo preparado con anterioridad y se insertó en la mitad del medio de cultivo sólido (Cama de cáscara de papa), asegurándose que quedara en una zona con una considerable cantidad de almidón como se muestra en la figura 15, posterior a ello, se tapó la caja Petri, se selló con papel Parafilm para evitar contaminaciones que afectaran el crecimiento del hongo, se envolvieron en papel vinipel y se marcaron con el nombre del hongo y fecha de activación para finalmente incubarlos por 8 días a una temperatura de 30°C [81]. Cabe resaltar que se realizaron 12 cultivos, 5 réplicas sobre papa sabanera y 7 sobre papa pastusa.

Figura 15.

Cultivo de A. niger sobre cáscara de papa.



Nota. En la imagen se muestra la inserción del disco del hongo *A. niger* en la mitad de la superficie de la cáscara de papa anteriormente esterilizada y cada una de las cajas Petri selladas para ser incubadas por 8 días.

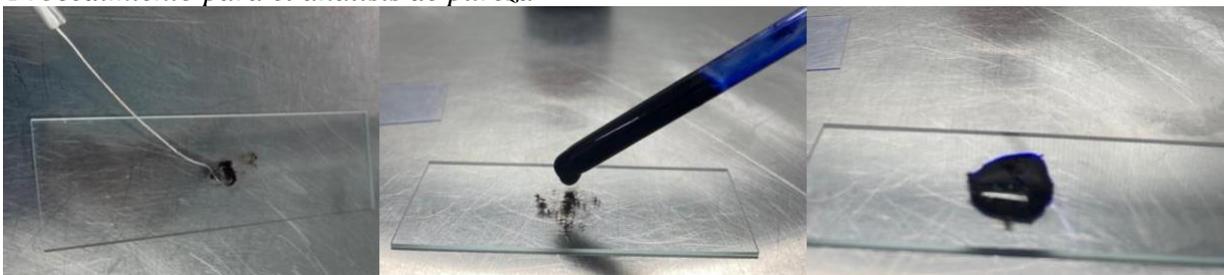
Durante el periodo de incubación se llevó a cabo una caracterización micro y macroscópica de los hongos cultivados, teniendo en cuenta aspecto, coloración, textura y forma, así mismo se realizó una caracterización con la ayuda del microscopio para identificar su estructura.

2.2.4. *Análisis de pureza*

Este procedimiento se realizó con el fin de identificar y realizar el reconocimiento del hongo *Aspergillus niger*, para ello se esterilizaron las asas redondas en el autoclave hasta llegar a una presión de 15 Psi, donde se dejaron reposar por 15 minutos y se abrió la válvula de presión hasta que llegase a 0 Psi [78]. Una vez esterilizada la cabina con luz UV por un tiempo de 15 minutos, se ingresaron los materiales a utilizar y el procedimiento de análisis de pureza fue el siguiente: Inicialmente se limpiaron las láminas portaobjetos y cubreobjetos con alcohol al 70%, luego se tomó muestra del micelio del hongo cultivado con la ayuda de un asa redonda y se esparcieron los “Filamentos” en el portaobjetos, posterior a ello, se adicionaron 2 gotas de azul de lactofenol sobre la lámina; la cual es una solución de tinción y finalmente se sobrepuso el cubreobjetos. Una vez realizado esto, se acomodó en el microscopio para visualizar su estructura, identificando las principales partes del hongo *A. niger* [82].

Figura 16.

Procedimiento para el análisis de pureza

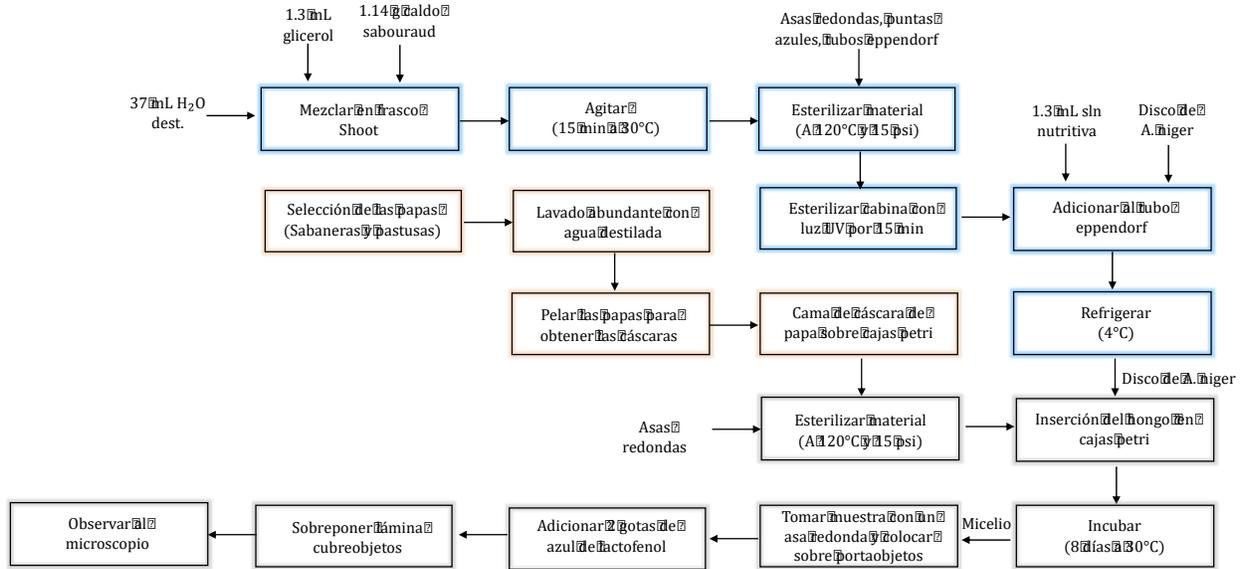


Nota. En la primera imagen, se observa la adición de trazas del hongo sobre el portaláminas y en las imágenes 2 y 3, se muestra la adición de la solución de tinción (Azul de lactofenol) sobre el hongo para posteriormente ser cubierta con la lámina cubreobjetos.

En la figura 17, se muestran los procedimientos del banco de trabajo (Actividad 1), tratamiento y caracterización de la cáscara de papa (Actividad 2), cultivo del hongo y análisis de pureza (Actividad 3) referentes a la metodología implementada para cumplir con el objetivo específico 1.

Figura 17.

Diagrama de bloques objetivo específico 1 (actividad 1, 2 y 3).



Nota. La figura muestra el diseño metodológico de las 3 primeras actividades del objetivo específico 1. Actividad 1 (Color azul), actividad 2 (Color naranja), actividad 3 (Color gris).

2.2.5. Obtención del extracto

El procedimiento para obtener el extracto tuvo como punto de partida, la adición de 20 mL de agua destilada a cada una de las cajas Petri (12) cultivadas con el hongo *Aspergillus niger*, las cuales se sellaron con papel Parafilm y se sometieron a agitación mecánica en el shaker a 120 rpm y una temperatura de 30°C por 3 días [79].

Figura 18.

Proceso inicial de obtención del extracto



Nota. En la imagen izquierda se muestra la adición de los 20 mL de agua destilada sobre cada una de cajas Petri que contienen los cultivos de *A. niger* y la imagen derecha muestra cada uno de los cultivos en el shaker a 120 rpm.

Una vez finalizada la agitación se efectuaron 2 procesos de separación líquido – sólido como se muestra en la figura 19, el primero consistió en transferir la cantidad de líquido de cada caja Petri a un tubo falcón (Uno por cada muestra) con la ayuda de embudos de vidrio y centrifugar a 3600 rpm por 20 minutos en una centrífuga para que los residuos sólidos (Trazas de hongo y cáscara de papa) se sedimentaran [83], quedando en la parte superior el extracto líquido. Posterior a ello, se realizó una filtración al vacío mediante el montaje Buchner para cada extracto usando papel filtro Munktell AHLSTROM cuyo diámetro fue de 70 mm. Una vez filtradas las muestras se transfirieron a tubos falcón por separado.

Figura 19.
Proceso de separación sólido – Líquido



Nota. En la imagen se muestran los 2 procesos de separación sólido-Líquido implementados para obtener el extracto, la imagen izquierda muestra el proceso de centrifugación en tubos falcón, mientras que la derecha el montaje de filtración al vacío Buchner.

2.2.6. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó con el fin de determinar la cantidad de enzimas presentes en una muestra; en este caso, el extracto enzimático crudo proveniente del hongo *A. niger*. Para llevar a cabo este proceso se implementó el método Biuret, cuya reacción de las proteínas con una solución alcalina de sulfato de cobre (II), genera una coloración azul- violeta medible a una longitud de onda de 545 nm en el espectrofotómetro [68]. Este reactivo se preparó disolviendo 1.9 g de Sulfato de cobre (II) pentahidratado y 3.35 g de EDTA disódico en 300 mL de agua destilada, asegurando la dilución de ambos sólidos mediante agitación, posteriormente se añadieron 50 g de hidróxido de sodio, agitando hasta disolver completamente. Por último, se aforó con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL.

- a. Curva de calibración: Esta curva hace referencia a una representación gráfica de las absorbancias frente a las concentraciones de una muestra problema, donde matemáticamente se calcularon las concentraciones de las muestras analizadas partiendo de los patrones preparados. La curva de calibración para este caso se realizó implementando como referencia o patrón la proteína albúmina. Esta última denominada “Solución madre”, fue el punto más alto de la curva de calibración y se preparó disolviendo 1 g de albúmina y aforando en un balón

de 100 mL con agua destilada, posteriormente se agitó hasta que las trazas de solido desaparecieran; es decir que la solución poseía una concentración de 10000 partes por millón (ppm), según la siguiente ecuación.

$$ppm = \frac{mg \text{ soluto}}{kg \text{ de solución}} = \frac{1000 \text{ mg}_{\text{Albúmina}}}{0,1 \text{ L}_{\text{Agua destilada}}} = 10000 \frac{mg}{L} = 10000 \text{ ppm}$$

Para la elaboración de la curva se calculó el volumen inicial de los diferentes puntos de concentración partiendo de la ecuación de dilución:

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad \text{Ec. 1}$$

Donde:

C_1 = Concentración de la solución madre (Parte concentrada; en ppm)

V_1 = Volumen inicial (mL)

C_2 = Concentración de los puntos que conforman la curva (Parte diluida; en ppm)

V_2 =Volumen final (Este volumen va a corresponder en todos los casos a 5 mL)

En la tabla 3 se muestran las diferentes cantidades necesarias para preparar las soluciones con 5 concentraciones diferentes que formarán la curva de calibración. Estas preparaciones se realizaron hasta que la gráfica de la curva de calibración arrojara un valor de R^2 cercano a 1.

Tabla 3.

Preparación de la curva de calibración

Concentración final (ppm)	Cantidad de Albúmina (mL)	Cantidad de Biuret (mL)	Cantidad de agua (mL)
500	0.25	0.5	4.25
1000	0.5	0.5	4
2000	1	0.5	3.5
3000	1.5	0.5	3
8000	4	0.5	0.5

Nota. En la tabla se encuentran las cantidades de los reactivos necesarios para preparar las soluciones a las concentraciones establecidas para la curva de calibración con albúmina.

El procedimiento para calcular el volumen inicial (Volumen de proteína albúmina) necesario para preparar las soluciones con las concentraciones registradas en la tabla 3 de cada punto de la curva

fue el siguiente. Se realizó un ejemplo con el punto 1 y el procedimiento se llevó a cabo de igual manera para las demás concentraciones.

Para el punto 1, se requirió una concentración de 500 ppm en un volumen total de 5 mL, partiendo de una concentración de la solución madre equivalente a 10000 ppm; es decir, que fue necesario determinar cuál era el volumen inicial de la solución madre (Cantidad de albúmina) necesario para llegar a dicha concentración diluida partiendo de la ecuación 1.

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$
$$V_1 = \frac{500 \text{ ppm} * 5 \text{ mL}}{10000 \text{ ppm}}$$
$$V_1 = 0,25 \text{ mL}$$

Para la preparación de las soluciones, se transfirieron las cantidades de proteína calculadas a tubos de ensayo individuales, utilizando la ecuación de dilución. Según la proporción establecida para el reactivo Biuret, se utilizó 1 mL de reactivo por cada 10 mL de solución final [68]. Por lo tanto, para preparar una solución de 5 mL, se añaden 0.5 mL de reactivo Biuret al tubo de ensayo, completando el volumen restante con agua desionizada. Esto asegura que cada tubo de ensayo contiene la proporción correcta de reactivo Biuret y proteína en la solución final.

Una vez preparadas las soluciones, se midió la absorbancia de las muestras mediante la técnica de espectrofotometría UV-VIS con el espectrofotómetro, inicialmente se configuró el equipo para realizar las mediciones a una longitud de onda de 545 nm y unidades de concentración correspondientes a partes por millón (ppm), acto seguido se presentó el blanco el cual fue una dilución contenida por 0.5 mL de reactivo Biuret y 4.5 mL de agua destilada. Posterior a ello, se realizó la lectura de la absorbancia de las 5 muestras que conformaron la curva de calibración, donde se graficó Absorbancia VS concentración verificando que el R^2 esté lo mas cercano posible a 1 y asegurar de esta manera que no se presentara variación en la tendencia de los datos, con estoos resultados, se realizó una regresión lineal [84].

Figura 20.
Espectrofotómetro de luz UV-VIS



Nota. La figura muestra el equipo implementado para llevar a cabo la técnica colorimétrica de cuantificación de proteínas por el método Biuret.

- b. Cuantificación del extracto: Para la cuantificación del extracto, se tomaron 3 alícuotas distintas dependiendo del tipo de extracto, una de ellas fue con una cantidad de 0.25 mL de extracto o muestra, otra con 0,1 mL de extracto, la otra con 0.5 mL de extracto quedando las cantidades de los reactivos como se muestra en la tabla 4, cabe resaltar que la cantidad de Biuret correspondió a 1 mL en 10, partiendo de esto, se realizaron las proporciones para 5 mL. Estas alícuotas fueron tomadas con el fin que las absorbancias estuviesen dentro de la curva de calibración elaborada anteriormente; es decir que para cada uno de los extractos se prepararon las soluciones con cada una de las proporciones referentes a cantidad de muestra (0.1 mL, 0.25 mL y 0.5 mL) escogiendo la alícuota que se encontrara mejor dentro de la curva de calibración [84].

Tabla 4.
Cuantificación del extracto

Reactivos	Con 0,1 de muestra	Con 0,25 de muestra	Con 0,5 de muestra
Reactivo Biuret	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
Agua desionizada	4.4 mL	4.25 mL	4 mL
Muestra (Extracto)	0.1 mL	0.25 mL	0.5 mL
TOTAL	5 mL	5 mL	5 mL

Nota. La tabla muestra la cantidad de cada uno de los reactivos necesarios para elaborar las soluciones con una cantidad específica de extracto enzimático.

El blanco, por su parte, se preparó sin la concentración del extracto; es decir, para un volumen de 5 mL, se mezclaron 0.5 mL de reactivo Biuret y 4.5 mL de agua destilada.

Una vez realizadas las soluciones de cada uno de los extractos por separado, se midió la absorbancia de los mismos, eligiendo la concentración con la cual estas diluciones se encontrarán dentro de la curva de calibración de la proteína albúmina, acto seguido se mezclaron los extractos con el fin de volver a preparar diluciones, esta vez con 0.5 y 0.1 de la mezcla para medir la absorbancia y de esta manera determinar con que concentración se encuentran dentro de la curva.

Posterior a ello, con la ecuación de la gráfica de la curva de calibración, se calcularon las concentraciones de los extractos obtenidos partiendo de la ecuación de la recta.

$$y = mx \pm b$$

Donde, “**Y**” representa la absorbancia, “**x**” corresponde a la concentración de la muestra, “**m**” es la pendiente de la recta y “**b**”, hace referencia al punto de intercepto con el eje Y. Al calcular la concentración de las diluciones, esta se multiplicó por el factor de dilución para obtener la concentración real del extracto la cual correspondió a la concentración inicial (C_1) y el volumen total de la mezcla de los extractos correspondió al volumen inicial (V_1), una vez realizado esto, se determinó la concentración a la cual se quería llevar el extracto, denominado (C_2) y con estas variables se despejó el volumen final (V_2) de acuerdo con la ecuación de dilución (*Ec. 1*). Este volumen corresponde al volumen final de la muestra el cual estuvo constituido por la cantidad de extracto que se obtuvo más el volumen que hacía falta para que la solución quedase a la concentración deseada; es decir que el volumen restante fue equivalente a la solución buffer de citratos.

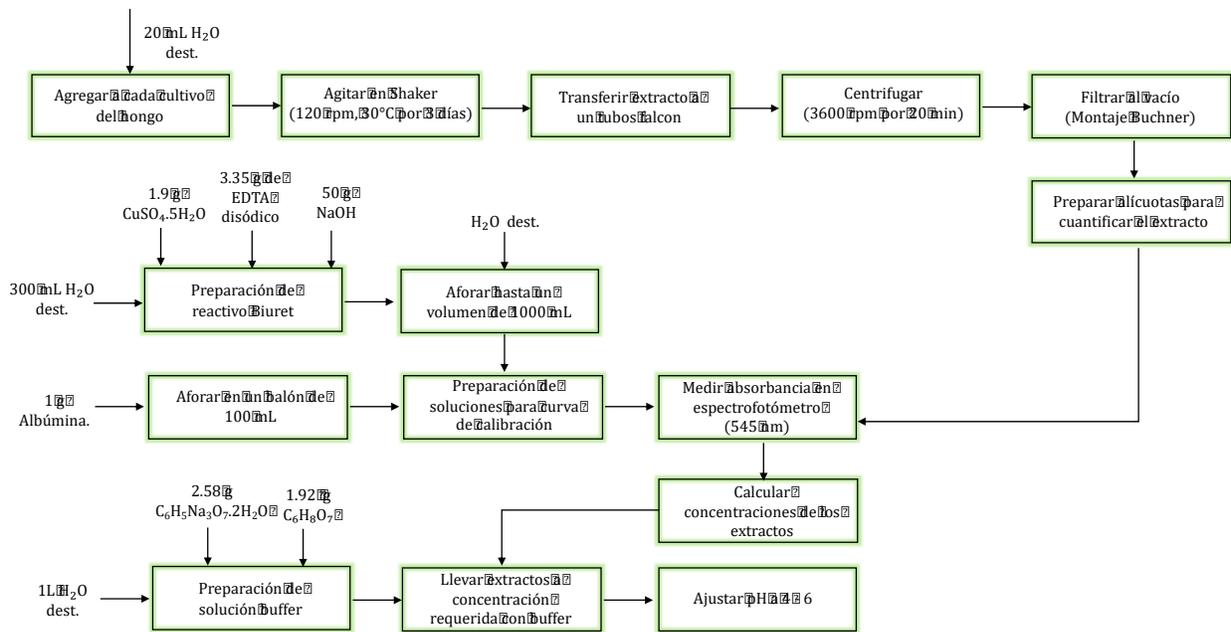
- c. Preparación de la solución Buffer de citratos: Esta solución se elaboró con el fin de diluir la concentración del extracto aumentando su volumen y llevándola a una menor concentración sin afectar sus propiedades y composición, de igual forma para que el pH de la solución se ajustara entre 4 y 6; esto en razón a que las enzimas que producen los hongos son funcionales para degradar los polímeros en dicho rango de pH.

El buffer de citratos se preparó con ácido cítrico y citrato de sodio dihidratado en unas cantidades de 2.58 g de citrato de sodio y 1.92 g de ácido cítrico disueltos en 1L de agua destilada [84], es decir a 1M.

En la figura 21, se muestra la secuencia de la metodología implementada en el numeral 2.2.5 y 2.2.6, referente a la actividad 4 del objetivo específico 1 (obtención del extracto y cuantificación de proteínas).

Figura 21.

Diagrama de bloques objetivo específico 1 (Actividad 4)



Nota. La figura muestra el diseño metodológico de la actividad 4 correspondiente al objetivo específico 1, donde en este paso final se obtiene el extracto enzimático crudo de *A. niger* y se realiza la cuantificación de proteínas mediante el método Biuret.

2.3. Métodos de análisis documental o experimental para cumplir con objetivo esp. 2.

(Definir cuáles son las enzimas extracelulares producidas por el hongo *Aspergillus niger* asociadas con la degradación de PVC)

Inicialmente se realizó la determinación de la actividad enzimática con el fin de asegurarse que las enzimas contenidas en los extractos estuviesen activas y fuesen funcionales.

2.3.1. Actividad enzimática

Este procedimiento se realizó con el fin de medir la velocidad de una reacción catalizada por la mezcla, para que a condiciones de temperatura constante y con una solución buffer de pH 5, se generara una combinación de soluciones sustrato-enzima para posteriormente realizar la cuantificación de los azúcares mediante el método DNS (Técnica de Miller), este método permite la hidrólisis de polisacáridos presentes en el extracto enzimático mediante la acción del ácido 3,5 dinitrosalicílico [67].

Para llevar a cabo este método, se debe realizar una curva de calibración parecida a lo efectuado en el numeral 2.2.7 a. Pero en este caso la solución patrón o “Solución madre” a utilizar fue glucosa, la cual se preparó a una concentración 5000 ppm; es decir que se diluyeron 0,5 g de glucosa en un balón aforado de 100 mL y se aforó con agua destilada. Partiendo de la solución madre se prepararon 2 soluciones intermedias calculadas de acuerdo con la ecuación 1, donde tanto la concentración (C_1), como el volumen (V_1) iniciales correspondieron a la solución madre y los valores de (C_2) y (V_2) a la solución intermedia.

- a. Solución intermedia 1: Esta solución se preparó a una concentración de 500 ppm en un volumen de 100 mL, despejando (V_1), el cual hace referencia a la cantidad de solución madre que se debe agregar a la solución intermedia para que quede en la concentración deseada.

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$
$$V_1 = \frac{500 \text{ ppm} * 100 \text{ mL}}{5000 \text{ ppm}}$$
$$V_1 = 10 \text{ mL}$$

- b. Solución intermedia 2: Esta solución se preparó a una concentración de 100 ppm en un volumen total de 100 mL, despejando (V_1); que hace referencia a la cantidad de solución madre que se debe agregar a la solución intermedia para que quede en la concentración deseada, se obtiene el volumen requerido.

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{100 \text{ ppm} * 100 \text{ mL}}{5000 \text{ ppm}}$$
$$V_1 = 2 \text{ mL}$$

Para ambos casos, se prepararon las soluciones intermedias en un balón aforado de 100 mL, agregando 10 mL y 2 mL de la solución madre para las soluciones intermedias 1 y 2, respectivamente, y cada una se aforó con agua destilada.

Posterior a la preparación de las soluciones intermedias, se preparó la solución DNS, la cual consistió en una disolución de 30 g de tartrato de sodio y potasio (Sal de Rochelle), 1.6 g de hidróxido de sodio (NaOH) y 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico en agua destilada hasta llegar a un volumen de 100 mL.

Figura 22.
Solución DNS



Nota. La imagen evidencia la preparación de la solución DNS

Una vez preparada esta solución, se procedió a realizar las disoluciones compuestas por glucosa y DNS. Para ello, se prepararon 4 muestras con la solución intermedia 1 y 4 muestras con la solución intermedia 2, cuyas cantidades se encuentran registradas en las tablas 5 y 6, respectivamente, para un volumen de 10 mL. Estas disoluciones fueron preparadas en tubos de ensayo individuales en todos los casos, realizando replicas hasta que la curva de calibración arrojara un coeficiente de correlación cercano a 1.

Tabla 5.*Alícuotas con solución intermedia 1*

Concentración (ppm)	Sln intermedia 1 (mL)	DNS (mL)	Agua destilada (mL)
50	1	5	4
100	2	5	3
150	3	5	2
250	5	5	-

Nota. En la tabla se especifican las cantidades para preparar las disoluciones con solución intermedia 1.

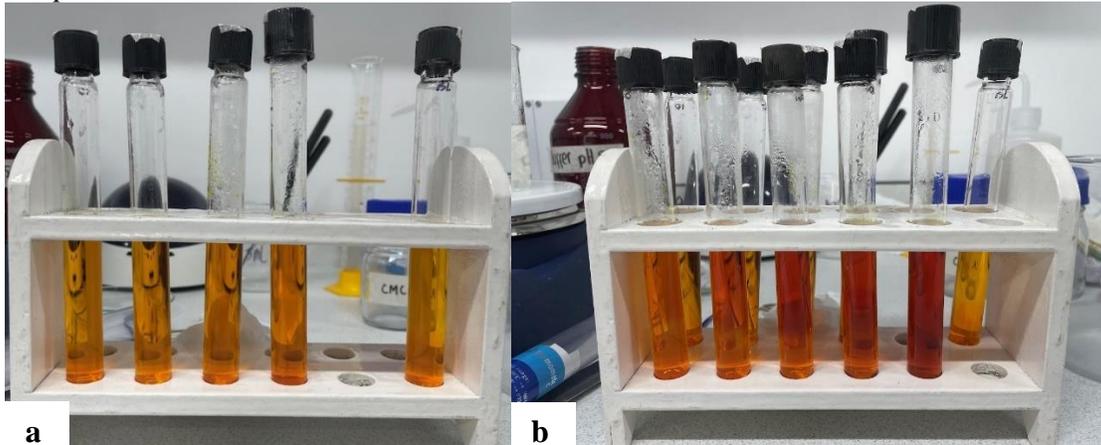
Tabla 6.*Alícuotas con solución intermedia 2*

Concentración (ppm)	Sln intermedia 2 (mL)	DNS (mL)	Agua destilada (mL)
10	1	5	4
20	2	5	3
30	3	5	2
40	4	5	1

Nota. En la tabla se especifican las cantidades para preparar las disoluciones con la solución intermedia 2.

De igual forma, se realizó una solución denominada “Blanco”, la cual se compuso de 5 mL de DNS y 5 mL de agua destilada para un volumen total de 10 mL. Una vez obtenidas todas las soluciones, se sometieron a calentamiento a una temperatura de 95°C por 5 minutos mediante el uso de un termostato. Cumplido el tiempo, se dejaron enfriar las muestras y se procedió a medir las absorbancias de cada una en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm, presentando primero el blanco y luego las muestras de la menos concentrada a la más concentrada. Al obtener estos resultados, se elaboró la curva de calibración de absorbancia vs. concentración, verificando que el R^2 estuviera lo más cercano a 1 posible, y se realizó una regresión lineal que arrojó la ecuación de la recta.

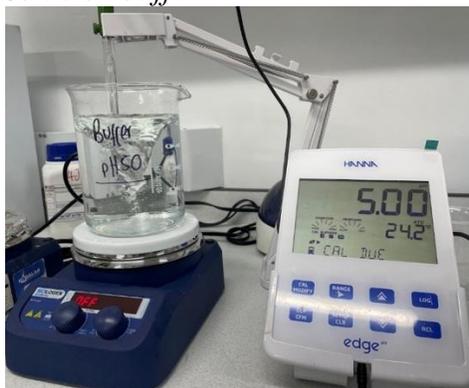
Figura 23.
Preparación de soluciones con DNS



Nota. En la imagen a se puede evidenciar que la coloración de las soluciones preparadas antes de someterlas a calentamiento es amarilla, mientras que la imagen b, muestra un cambio de coloración a naranja una vez ocurrida la reacción por la acción del calor, cabe resaltar que la intensidad de coloración esta directamente relacionada con la cantidad de azúcar reductor (Glucosa); por ende, entre mayor sea esta cantidad la coloración será más oscura.

La segunda parte del proceso de actividad enzimática inició con la preparación de la solución buffer, donde se mezcló citrato de sodio y ácido cítrico en unas cantidades de 12,903 g y 9.606 g respectivamente, las cuales se disolvieron en 1 litro de agua destilada, posterior a ello, se midió el pH de la solución asegurándose que esta estuviese en un pH de 5, de lo contrario, se ajusta bien sea con hidróxido de sodio si está por debajo o ácido clorhídrico si se encuentra por encima de 5.

Figura 24.
Solución buffer



Nota. En la imagen se muestra la solución buffer de citrato de sodio y ácido cítrico en el pH de 5, requerido por el método.

Acto seguido, se preparó la solución de CMC (carboximetilcelulosa), diluyendo 2 g de esta en 100 mL de la solución buffer previamente preparada, utilizando agitación magnética. Una vez obtenida la solución de CMC al 2%, se realizaron las diluciones de la enzima a analizar por duplicado, tomando 1.6 mL de extracto, 0.83 mL de CMC y 0.83 mL de agua desionizada para el extracto obtenido de *A. niger* en papa sabanera y, para el extracto del hongo cultivado sobre pastusa, se tomaron 10 mL de enzima, 5 mL de CMC y 5 mL de agua destilada. El blanco, por su parte, se preparó con 0.83 mL de CMC y 2.43 mL de agua destilada.

Posteriormente, se realizó la lectura de los azúcares reductores mediante el método DNS descrito anteriormente, pero en este caso, en lugar de la solución de glucosa, se utilizaron las diluciones de enzima preparadas en este apartado. Las alícuotas tomadas fueron 2.5 mL de DNS, 0.1 mL de la dilución de extracto y 2.4 mL de agua destilada para cada una de las muestras. Una vez leídas las absorbancias en el espectrofotómetro, las diluciones de enzimas se calentaron a una temperatura constante de 50-55°C durante 60 minutos mientras ocurría la reacción. Una vez transcurrido el tiempo, se dejaron enfriar y se realizó nuevamente la lectura de los azúcares reductores mediante el método DNS, utilizando las mismas proporciones que se tomaron antes del calentamiento.

Figura 25.
Calentamiento de las diluciones de enzima



Nota. En la figura se muestra la preparación por duplicado de las diluciones de enzima para los 2 extractos evaluados y el blanco, las cuales se llevan a calentamiento por 60 min a 55°C.

Finalmente, con estos datos se calcularon los azúcares reductores mediante la ecuación del gráfico de la curva de calibración realizada con la solución de glucosa obteniendo la concentración diluida, la cual se multiplica por el factor de dilución para obtener la concentración real en ppm de las muestras analizadas.

Para el cálculo de la actividad enzimática, se utilizó la ecuación 2, según lo descrito en los estudios que evalúan la actividad de celulasas [85], donde se analiza el comportamiento y la producción de enzimas, determinando que una unidad enzimática corresponde a la cantidad de enzima que libera un micro mol (μmol) de azúcares reductores (glucosa) por minuto [86].

$$\frac{UA}{L} = \frac{(C_{g,m} - C_{g,b}) * 10^6}{MMA * t_r} * FD \quad \text{Ec. 2}$$

Donde:

$C_{g,m}$: Concentración azúcar en la muestra (g/L)

$C_{g,b}$: Concentración de azúcar en el blanco (g/L)

MMA : Masa molecular carbohidrato patrón (g/mol)

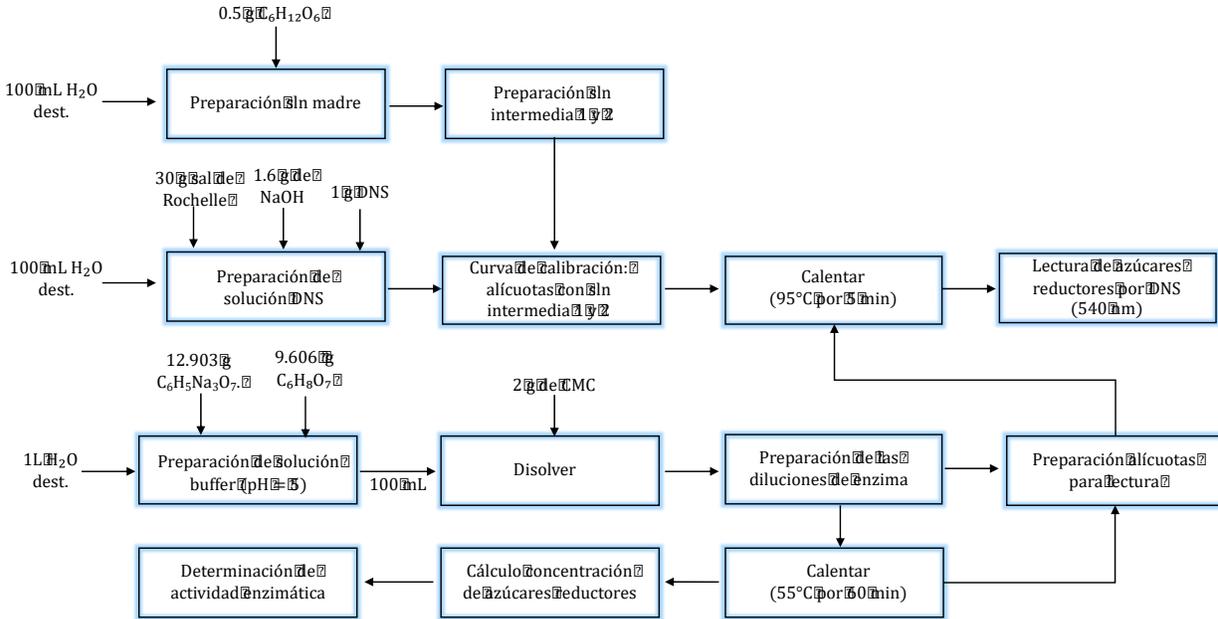
t_r : Tiempo de reacción (min)

FD : Factor de dilución de la muestra

En la figura 26, se muestra el diseño metodológico de la actividad 1 del objetivo específico 2 mediante un diagrama de bloques.

Figura 26.

Diagrama de bloques objetivo específico 2 (Actividad 1)



Nota. La figura muestra el diseño metodológico de la actividad 1 correspondiente al objetivo específico 2, donde determina la actividad enzimática de los extractos.

2.3.2. Técnica de Electroforesis

La técnica de electroforesis implementada fue en geles de poliacrilamida y se realizó con el fin de determinar el tipo de proteínas presentes en el extracto enzimático de acuerdo con su carga y su peso molecular.

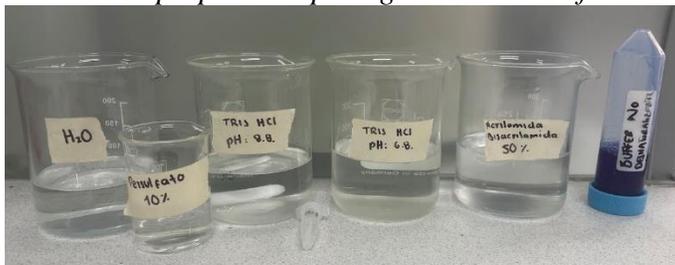
Para la preparación de los geles se partió en primera instancia de la elaboración de las soluciones necesarias para dicho fin. Inicialmente se preparó una solución de Acrilamida/Bisacrilamida al 50% la cual estuvo compuesta por 48.75 g de Acrilamida y 1.25 g de Bisacrilamida y se aforó a 100 mL con agua destilada. Posterior a ello, se tomó 1 g de SDS y se disolvió en 10 mL de agua destilada para que quedase a una concentración del 10%. El persulfato de amonio, también se preparó al 10% agregando 0.1 g de este reactivo en 10 mL de agua destilada.

Acto seguido se prepararon 2 soluciones buffer de pH 6.8 (TRIS HCl 0.5M) y pH 8.8 (TRIS HCl 1M); para la primera (pH de 6.8), se tomaron 6.057 g de trizma base y se disolvieron en 80 mL de agua destilada, el pH se ajustó con HCl 6N para posteriormente aforar a 100 mL. Para el caso de

la segunda solución buffer, se tomaron 12.114 g de trizma base y se disolvieron en 90 mL de agua desionizada, ajustando el pH de igual forma con HCl 6N hasta que quedase en 8.8 y finalmente se aforó a 100 mL con agua destilada. [87]

Figura 27.

Soluciones preparadas para geles de electroforesis



Nota. En la imagen se muestran las soluciones tampón (pH de 6.8 y 8.8), la solución de acrilamida y bisacrilamida 50%, persulfato al 10%, SDS al 10% necesarias para realizar los geles de poliacrilamida para electroforesis.

Posterior a esto, para la ejecución del método, se preparó una solución buffer de corrido compuesta por 14.4 g de glicina, 3.03 g de trizma base, 0.5 g de SDS y se aforó con agua destilada hasta completar 1 L. El pH de esta solución se ajustó a 8.63 utilizando hidróxido de sodio (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl) según el caso.

El buffer muestra se preparó añadiendo 70.4 μ L del buffer de 6.8 (Tris HCl 1M), 141 μ L de SDS al 10%, 225.5 μ L de glicerol, 0.01 g de azul de bromofenol y 563.5 μ L de agua destilada.

Finalmente, la solución de tinción se preparó con dos soluciones: A y B. La solución A, que es el fijador, consistió en 0.5 g de azul de Coomassie R 250 y 33 mL de metanol. La solución B se compuso de 4.5 g de ácido 5-sulfosalicílico y ácido tricloroacético (15 g + 10 mL de agua destilada). Las soluciones A y B se mezclaron para conformar la solución de tinción.

Para la preparación de los geles de electroforesis, se utilizaron las soluciones preparadas anteriormente. En primera instancia, se elaboró el gel de separación a una concentración del 10% con las cantidades registradas en la tabla 7, siguiendo el orden descrito. Se tuvo en cuenta que el

TEMED se añadió una vez la solución se vertiera en los moldes para evitar su gelificación antes de ser envasada en las láminas.

Tabla 7.

Preparación gel de separación

REACTIVOS	Volumen para 1 gel (10%)
Agua desionizada	4.125 mL
Tris HCL 1M (pH=8.8)	3.75 mL
Solución acrilamida/Bisacrilamida (50%)	2 mL
Persulfato de amonio (10%)	140 µL
SDS (10%)	0.1 mL
TEMED	8 µL

Nota. En la tabla se muestran las cantidades de reactivos necesarios para preparar el primer gel denominado “De separación” [87].

Una vez preparado el gel, se adicionó rápidamente la solución en el molde con la ayuda de una pipeta Pasteur hasta llegar a 2 cm antes del borde superior de la lámina frontal, dejando espacio para el segundo gel y evitando la formación de burbujas. En caso de que se formaran burbujas, se agregó una ligera capa de butanol para retirarlas y evitar el contacto con el oxígeno, que inhibe la reacción de polimerización. El tiempo de gelificación estuvo en un promedio de 10 a 20 minutos. Una vez gelificado, se retiró el exceso de etanol con la ayuda de un papel filtro.

El gel de concentración, por su parte, se preparó al 5%, como se muestra en la tabla 8. El TEMED, por su parte, se añadió una vez que la solución iba a ser vertida en el interior de los moldes, ya que se corría el riesgo de gelificación antes de incorporarlos.

Tabla 8.

Preparación gel de concentración

REACTIVOS	Volumen para 1 gel (5%)
Agua desionizada	3.65 mL
Tris HCL 1M (pH=6.8)	0.625 mL
Solución acrilamida/Bisacrilamida (50%)	0.5 mL
Persulfato de amonio (10%)	140 µL
SDS (10%)	50 µL
TEMED	8 µL

Nota: En la tabla se muestran las cantidades de reactivos necesarios para preparar el segundo gel denominado “De concentración” [87].

Una vez preparado el segundo gel y retirado el exceso de etanol del primero, se incorporó la solución de concentración mediante una pipeta Pasteur en los moldes de los geles de electroforesis

rápidamente y se colocó el peine con cuidado dejando polimerizar por un tiempo aproximado de 5 minutos.

Figura 28.

Geles de separación y concentración



Nota. En la imagen izquierda se muestra el gel de separación el cual está aproximadamente 2 cm por debajo del borde superior blanco, la imagen de la derecha muestra el peine amarillo colocado una vez se haya agregado el gel de concentración sobre el gel de separación para generar los pozos.

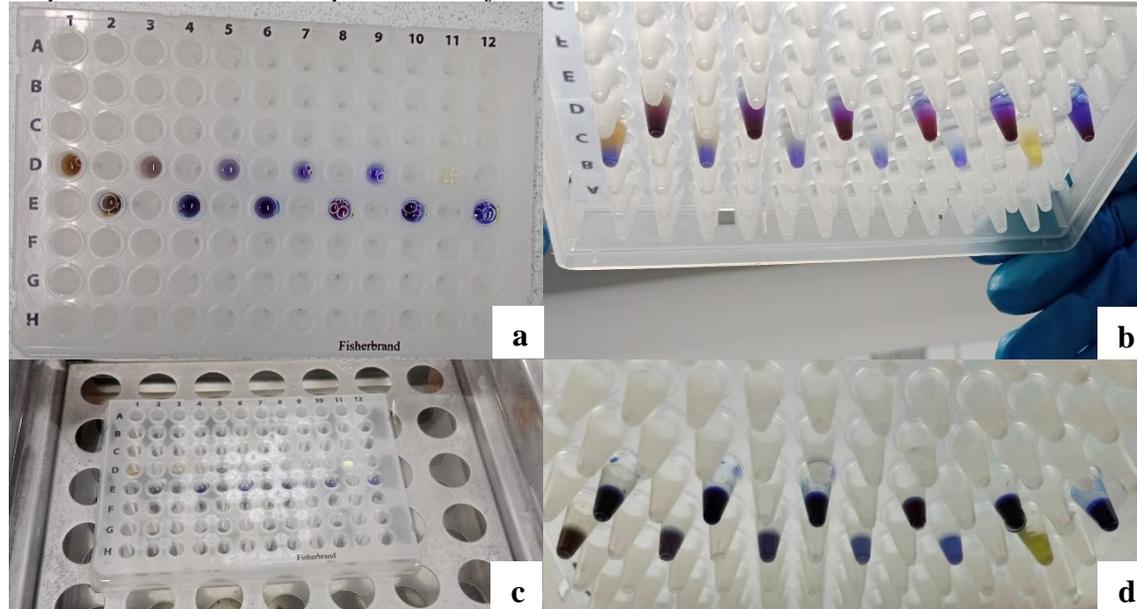
Una vez gelificados ambos geles, se procedió a introducir los moldes en la cámara de electroforesis y se añadió agua destilada, dejándolos en remojo por un tiempo de 30 minutos para luego retirarla.

La preparación de muestras a correr se realizó tomando 250 μ L de extracto y 20 μ L de solución buffer de carga, los cuales se adicionaron en la celda de electroforesis. La celda se llevó a calentamiento en un termostato a una temperatura de 95°C por un tiempo de 20 minutos, verificando que el volumen se redujera a la mitad con el fin de generar la reacción.

Una vez transcurrido el tiempo de calentamiento, se retiró la celda de electroforesis y se procedió a servir las muestras en el gel. Inicialmente, se vertió la solución de corrido en la cámara hasta que cubriera en su totalidad los geles; acto seguido, se retiró cuidadosamente el peine sin dañar las celdas formadas por el mismo.

Figura 29.

Preparación de muestras para electroforesis

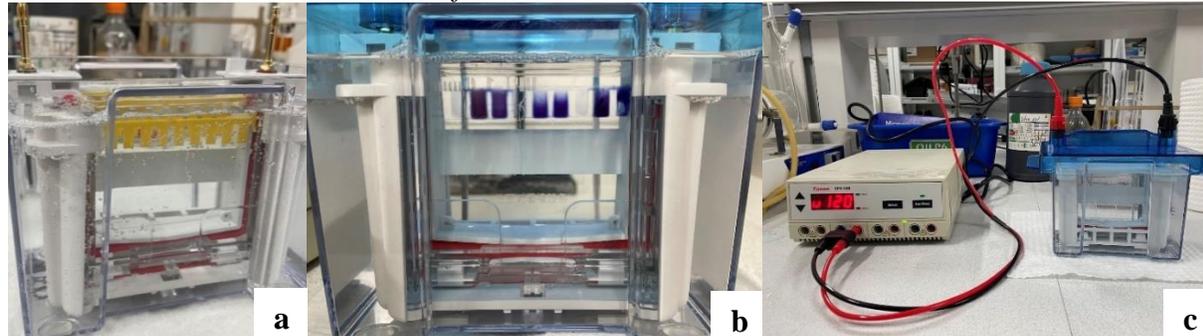


Nota. En la figura se muestra la preparación de las muestras a analizar para electroforesis en la celda electroforética (Imágenes a y b) y su respectivo calentamiento en el termostato a 95°C (Imagen c), evidenciando en la imagen (d) una disminución del volumen de las muestras con respecto al volumen inicial agregado (Imagen b).

Posteriormente, se añadió a la primera celda el marcador de peso molecular, el cual constaba de 9 proteínas recombinantes de tamaño preciso (10-225 kDa) en una cantidad de 3 μ L. En las siguientes celdas, se añadieron 30 μ L de cada una de las muestras a analizar, previamente calentadas en el termostato. Se aseguró que la muestra cayera dentro del pozo sin contaminar las siguientes. Una vez añadidas las muestras a cada una de las celdas del gel, se conectaron los electrodos a la cámara de electroforesis y a la fuente de alimentación, aplicando una corriente de 120 voltios durante un tiempo aproximado de 100 minutos.

Figura 30.

Funcionamiento cámara de electroforesis



Nota. En la imagen a, se evidencia la adición de la solución de corrido en la cámara, en la imagen b, se observa la debida incorporación de las muestras en su respectivo pozo y en la imagen c, el funcionamiento con corriente de 120 V en la cámara.

Transcurrido el tiempo y una vez que el frente de corrido con azul de bromofenol alcanzó la parte inferior del gel, se desconectó la fuente de alimentación y se retiraron los geles cuidadosamente de los moldes con la ayuda de agua desionizada y una espátula. Posteriormente, se añadió la solución de tinción sobre los geles y se dejaron en el Shaker oscilante por un período de aproximadamente 10 horas. Luego, se realizaron enjuagues con agua destilada caliente cada 20 minutos, con el fin de retirar la mayor parte de la solución de tinción, cambiando la misma hasta que la coloración del gel fue translúcida y se resaltaron las bandas de proteína.

Figura 31.

Agitación de los geles con solución de tinción

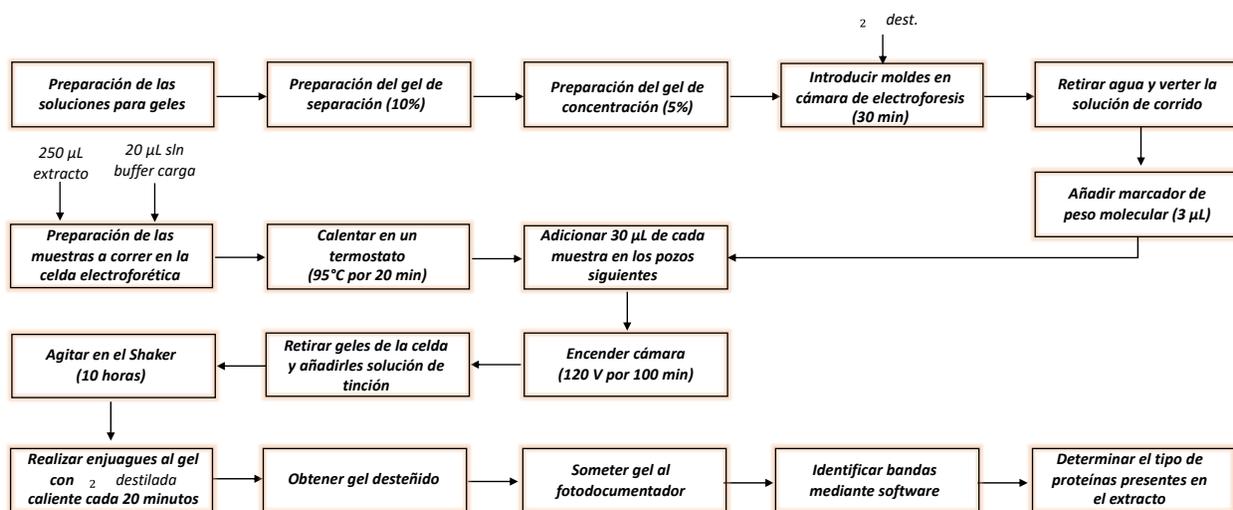


Nota. La figura muestra los geles en agitación con la solución azul de Comassie.

Una vez obtenido el gel desteñado, se llevó a un fotodocumentador con el fin de mostrar en el software las bandas de proteína obtenidas. Con base en estos resultados, se revisaron mediante bibliografía el peso de las bandas con respecto al marcador de peso molecular para determinar el tipo de proteína presente en el extracto.

Figura 32.

Diagrama de bloques objetivo específico 2 (Actividad 2)



Nota. La figura muestra el diseño metodológico de la actividad 2 correspondiente al objetivo específico 2, donde determina el tipo de enzimas presentes en el extracto gracias a la técnica de electroforesis.

2.4. Métodos de análisis documental o experimental para cumplir con objetivo esp. 3

(Determinar la capacidad que tiene el extracto enzimático crudo de *Aspergillus niger* para la degradación de probetas de PVC).

2.4.1. Obtención y pretratamiento de las probetas de PVC

Para la obtención de las probetas, se partió del tubo más delgado de PVC, cuyo espesor aproximado era de 1 mm. Posteriormente, se procedió a cortar el tubo en forma de placas con dimensiones de 2,5 cm x 2,5 cm (aproximadamente una pulgada cuadrada) [88], acción realizada con la ayuda de una pistola de calor, obteniendo un total de 20 muestras. Acto seguido, se limpiaron las probetas con alcohol para someter 15 de ellas, debidamente numeradas, a un pretratamiento que consistió en exponerlas a la luz ultravioleta por un período de 1 mes. Este pretratamiento tuvo como objetivo modificar la superficie del polímero, haciéndolo más susceptible para que la degradación fuera

más rápida al poner la lámina en contacto con las enzimas. Estas muestras fueron pesadas antes, durante y al final de la exposición, verificando que la pérdida de peso no fuese significativa y garantizar así que la degradación no se generara por la luz UV. Por otro lado, cada 8 días se alternó la cara expuesta de la probeta para lograr la degradación superficial y no estructural por ambos lados.

De igual forma, se colocó al microscopio una probeta de PVC, con el fin de reconocer su estructura y hacer la caracterización de las mismas, finalmente también se miró al microscopio una de las probetas pasados 30 días de exposición, con el fin de revisar la variación de la probeta expuesta con respecto a la probeta en su estado original.

2.4.2. Degradación de probetas de PVC

La degradación se llevó a cabo teniendo en cuenta la norma ISO 846: 2019, donde se evalúa la acción de microorganismos y sus enzimas sobre plásticos [89]. Para someter las probetas de PVC a degradación mediante el extracto enzimático, se inició con el pesaje de cada una de las probetas en una balanza analítica de 5 decimales. Se registró dicho peso y se procedió a preparar 3 blancos y un control, los cuales fueron:

- a.** Blanco 1: Probeta de PVC sola
- b.** Blanco 2: Probeta de PVC + Luz UV
- c.** Blanco 3: Probeta con UV + Agua destilada
- d.** Probeta control: Probeta sin luz UV + extracto

Estos blancos y el control se prepararon con el fin de comparar sus resultados junto con las muestras (todas las denominadas “muestras” tuvieron pretratamiento de luz UV), al final del proceso y de esta manera identificar los factores que interfieren en el proceso de biodegradación y variabilidad de unas condiciones respecto a otras. Los blancos no contienen extracto, mientras que el control si tiene extracto, pero no pretratamiento, de esta manera sirve para contrarrestar su resultado final con las muestras expuestas a extracto enzimático y pretratamiento. Teniendo esto presente, estos se colocaron en cajas Petri pequeñas de 60 mm de diámetro. A las que contenían líquido (ya sea extracto o agua destilada), se les añadió un volumen de 10 mL por probeta para

cubrir la superficie del sólido. Una vez realizado esto, se sellaron con papel Parafilm y se marcaron con su respectiva identificación.

El volumen de extracto restante se colocó sobre las demás probetas de PVC de la misma manera que se colocaron los blancos (tomando alícuotas de 10 mL de extracto por probeta). Cada caja Petri se selló con papel Parafilm. Tanto los blancos y el control, como las demás muestras expuestas se dejaron por un periodo de 1 mes a temperatura ambiente para que se llevara a cabo la degradación.

Pasado el tiempo de exposición de las láminas, se sacaron y se procedió a limpiarlas y secarlas con el fin de registrar su peso constante después de ser sometidas al extracto enzimático. El proceso de peso constante consistió en exponer las probetas de PVC a secado en un horno a 60-65°C por un periodo de 2 horas y posteriormente, llevarlas a un desecador por 30 minutos para que al momento de registrar el peso, este se mantuviera constante sin oscilaciones.

Figura 33.
Proceso de secado probetas de PVC



Nota. En la imagen se muestra el proceso de secado de las láminas en el horno a 62°C (Imagen izquierda) y el sometimiento de las láminas al desecador durante 30 minutos (Imagen derecha).

La degradación de las probetas se evaluó de 2 formas: Mediante la técnica de pérdida de peso según la ecuación 3 [90] y de forma cualitativa, observando su estructura al microscopio de sólidos para compararla con la probeta antes de ser expuesta a degradación.

$$\% \text{ Degradación} = \left(\frac{W_i - W_f}{W_i} \right) * 100 \quad \text{Ec. 3}$$

Donde:

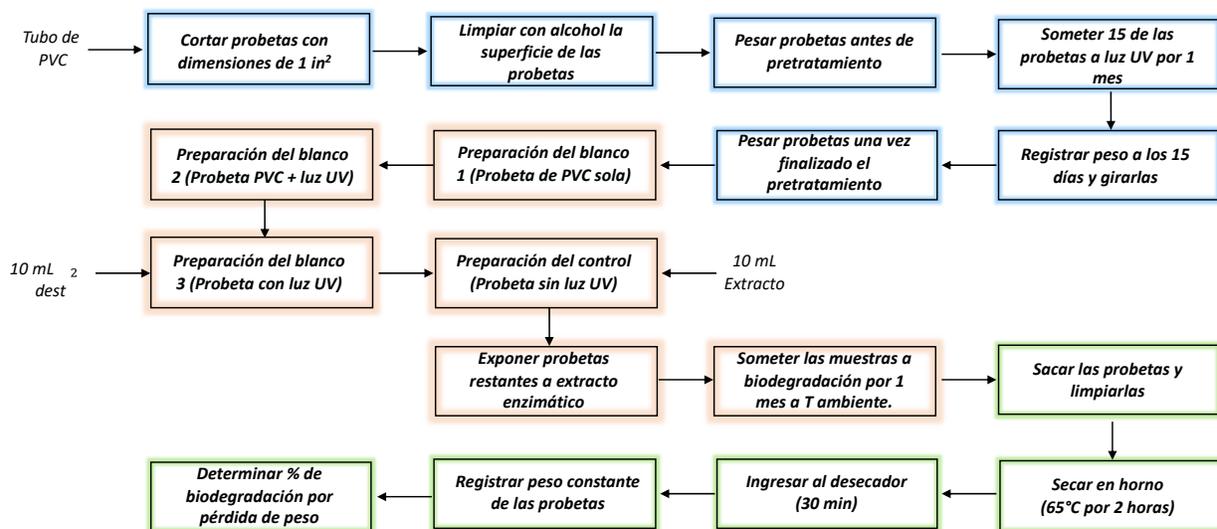
W_i : Peso inicial de la probeta antes de someterla a degradación (g)

W_f : Peso final de la probeta después de someterla a degradación (g)

En la figura 34, se muestra el diagrama de bloques de la metodología implementada para las 3 primeras actividades que se consideraron correspondientes al objetivo específico 3; la obtención y pretratamiento de las probetas de PVC (Actividad 1), exposición de las probetas al extracto (Actividad 2) y la evaluación de la biodegradación por pérdida de peso (Actividad 3).

Figura 34.

Diagrama de bloques objetivo específico 3 (Actividades 1, 2 y 3)



Nota. La figura muestra el diseño metodológico de las actividades correspondiente al objetivo específico 3. La actividad 1 (Color azul), actividad 2 (Color naranja) y actividad 3 (Color verde).

2.4.3. Caracterización de las probetas mediante SEM

Para realizar la prueba de microscopía electrónica de barrido (SEM), en las probetas de PVC, primero se preparó la muestra cortando una pequeña sección representativa. Posterior a ello, se metalizó con una fina capa de metal conductor (oro), con el fin de mejorar su conductividad

eléctrica. La muestra metalizada se montó en un porta muestras y se colocó en la cámara de vacío del SEM.

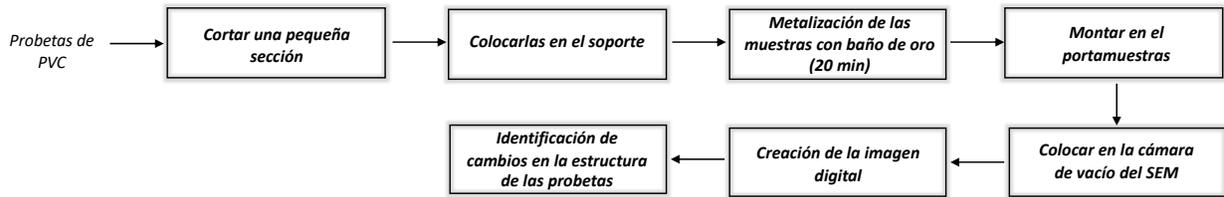
Cabe resaltar que, durante el análisis, se crea un vacío alto en la cámara para eliminar moléculas de aire, donde un haz de electrones enfocados impacta la superficie de la muestra, interactuando de esta manera con sus átomos y generando señales secundarias, estas señales son capturadas y procesadas por los detectores del microscopio electrónico, creando una imagen digital que muestra la morfología, topografía y composición química de la muestra a nivel nanométrico [74].

Las imágenes revelan características como forma, tamaño, textura, altura y profundidad de las estructuras en la superficie. El análisis SEM en PVC se realizó con el fin de evaluar la calidad del material antes y después de la biodegradación, identificar defectos y analizar algún tipo de fracturas. Las probetas de PVC que se sometieron a microscopía electrónica de barrido fueron los blancos y las probetas que registraron mayor pérdida de peso, ya que con esto se pudo entender mejor la susceptibilidad del material a la biodegradación e identificar las características microestructurales que contribuyeron a esta susceptibilidad, relacionando este resultado con el valor de porcentaje de pérdida de peso.

En la figura 35, se muestra el respectivo diagrama de bloques de la metodología implementada para la actividad 4 del objetivo específico 3 referente a la caracterización de las probetas mediante microscopía electrónica de barrido.

Figura 35.

Diagrama de bloques objetivo específico 3 (Actividad 4)



Nota. La figura muestra el diseño metodológico de la actividad 4 (Técnica de SEM), con la cual se finaliza el cumplimiento del objetivo específico 3.

3. RESULTADOS

3.1. Resultados del objetivo específico 1 “Obtener un extracto enzimático crudo proveniente del cultivo de *A. niger* en cáscaras de papa como sustrato”

3.1.1. Tratamiento y caracterización de la cáscara de papa

La papa que se utilizó como sustrato para cultivar el hongo fue papa sabanera y pastusa a las cuales se les realizó una caracterización nutricional mediante búsqueda bibliográfica con el fin de identificarlas y compararlas nutricionalmente, los resultados se encuentran registrados en la tabla 9.

Tabla 9.
Aporte nutricional del tipo de papa

Contenido Nutricional	Papa sabanera	Papa pastusa
Calorías (cal)	83	89
Agua (%)	75,50	75,4
Proteína (g)	1,5	1,9
Carbohidratos (g)	18,30	20,3
Calcio (g)	5	3
Fosforo (g)	26	26
Hierro (mg)	0,6	0,7
Vit. C (mg)	20	20
pH teórico	5-7	5-6
Almidon (%)	18-20	22-24

Nota. En la tabla se realiza una comparación nutricional de los 2 tipos de papa que fueron utilizados para obtener las cáscaras en el presente experimento.

3.1.2. Cultivo del hongo, activación de la cepa y análisis de pureza

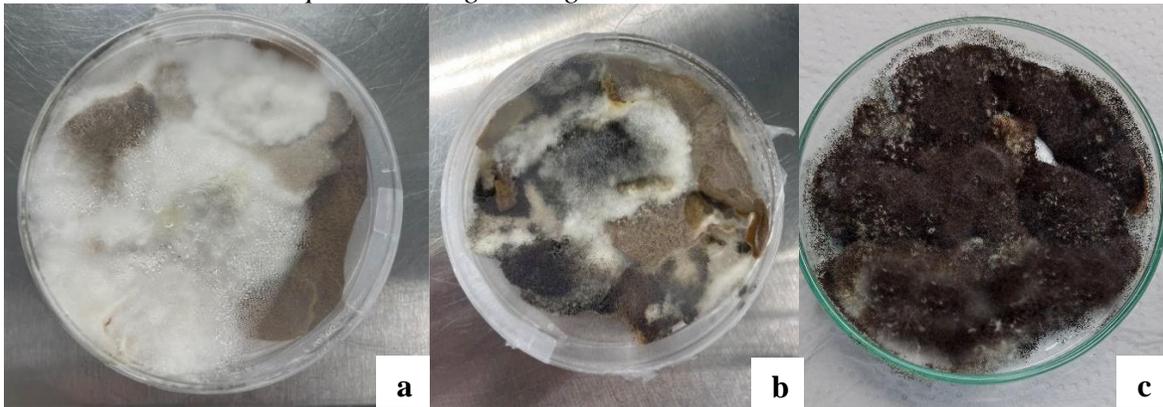
Una vez cultivados los hongos en cada una de cajas Petri, se realizó el seguimiento del crecimiento.

- a. Caracterización macroscópica: Pasados 4 días de incubación, se evidenció que el hongo estaba creciendo; es decir que sus colonias son de rápido crecimiento, donde inicialmente era de color blanquizco con una textura algodonosa, y cuyos bordes o al respaldo de la caja Petri se veía una coloración amarillenta pálida, lo anterior indica que el micelio es joven aún y no ha terminado de germinar. A los 8 días el micelio adquirió una coloración negra o café oscura mostrando

que su desarrollo se genera de forma interna hacia la parte externa o bordes del micelio, pues a medida que aumentaba el tiempo los bordes eran los últimos en adquirir coloración oscura, esto es gracias a la producción de los conidios y formación de sus esporas; es decir que lo anterior nos indica que el micelio ya estaba más desarrollado evidenciando su aspecto polvoriento como muestra la figura 32.

Figura 36.

Caracterización macroscópica del hongo A. niger

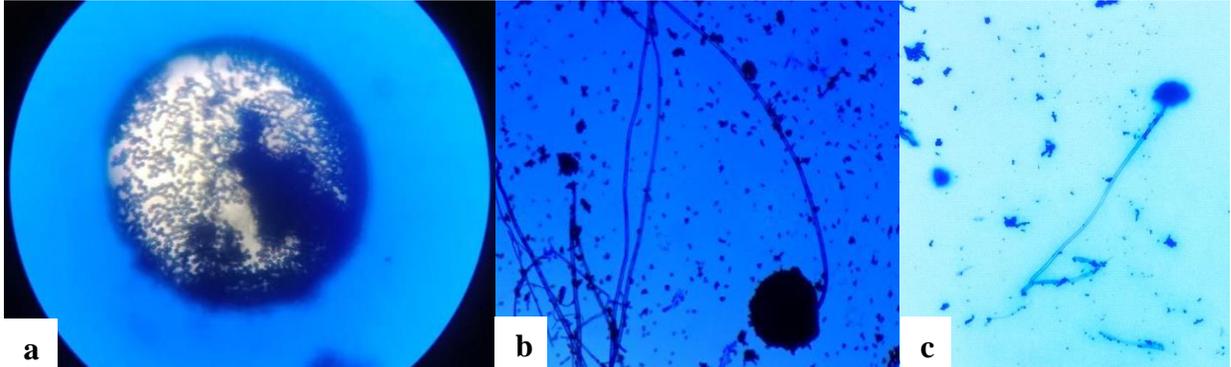


Nota. La figura muestra macroscópicamente la estructura del hongo *A. niger* y su evolución durante su crecimiento, en la imagen a, pasados 4 días de haberlo cultivado, se muestra el micelio joven de coloración blanco cremoso, en la imagen b (Pasados 8 días), ya se torna de una coloración oscura en varias secciones del micelio y finalmente pasados 12 días (Imagen c) el hongo ha proliferado sobre toda la cama de cáscara de papa y esporuló hasta quedar en una coloración negra.

- b.** Caracterización microscópica: Con el análisis de pureza mediante la tinción de azul de lactofenol se puede visualizar la estructura microscópica del hongo *Aspergillus niger* donde se identificaron, las hifas, esporas, conidióforos, conidios, cabeza aspergilar, vesículas, métulas y fiálides.

Figura 37.

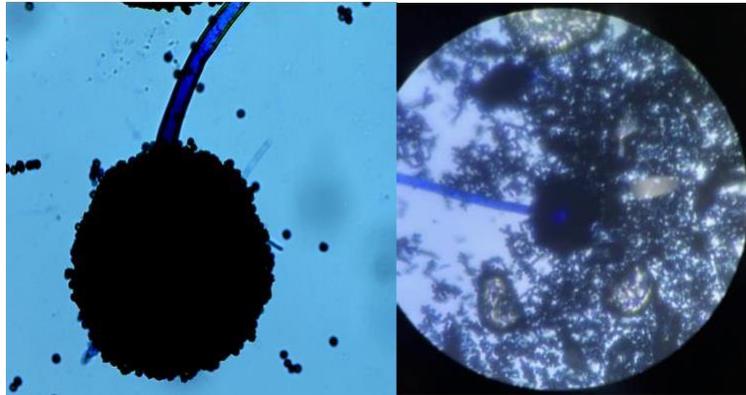
Estructura de A. niger con objetivo 4



Nota. En la imagen a se puede observar una aglomeración de conidios, en la b se evidencia la cabeza aspergilar y el conidióforo, finalmente en la imagen c la hifa del hongo debajo del conidióforo de *A. niger*.

Figura 38.

Estructura de A. niger con objetivo 10



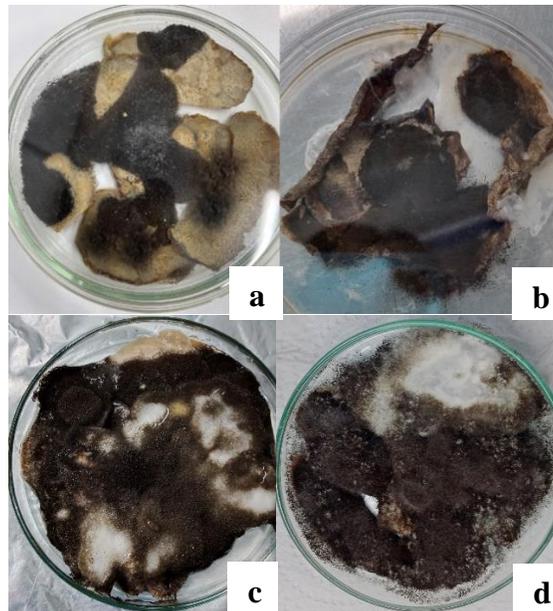
Nota. En la imagen de la izquierda se puede observar de manera más ampliada la cabeza aspergilar con su respectivo conidióforo, mientras que en la derecha se observa la métula del hongo al interior de la cabeza aspergilar.

En las figuras 37 y 38, se identificaron las partes del hongo como conidios, conidióforos e hifas, con ayuda del microscopio. Este análisis fue esencial para asegurar la correcta identificación y pureza del hongo antes de someterlo a la obtención del extracto y posterior biodegradación del PVC. Las figuras proporcionaron una base sólida para la identificación morfológica de *A. niger*, lo cual es crucial para garantizar la validez y proceder con el proceso de la biodegradación enzimática.

Una vez los micelios se encontraban desarrollados, se pudo observar que los cultivos realizados sobre papa sabanera proliferaron menos que los que se cultivaron en papa pastusa como se observa en la figura 39, pues estos últimos abarcaron casi en su totalidad la superficie de la cama de cáscara de papa, mientras que los primeros crecieron en una parte de la misma; esto puede deberse a que la cantidad de nutrientes que posee la cáscara de papa pastusa, tiene mayor cantidad de almidón y carbohidratos fermentables que la sabanera, lo anterior lo comprueba la caracterización de ambos tipos de papa registrados en el numeral 3.1.1.

Figura 39.

Crecimiento de A niger en ambos tipos de papa



Nota. En la imagen a y b se muestra el hongo sobre papa sabanera, donde se ve que en una no prolifera completamente (a) y en otra consume la totalidad de la cáscara, pero no crece más (b). Mientras que las imágenes c y d muestran el crecimiento de *A. niger* sobre papa pastusa donde se evidencia una proliferación total sobre la superficie de la misma.

3.1.3. Obtención del extracto

Figura 40.

Extracto enzimático después de 3 días en el shaker

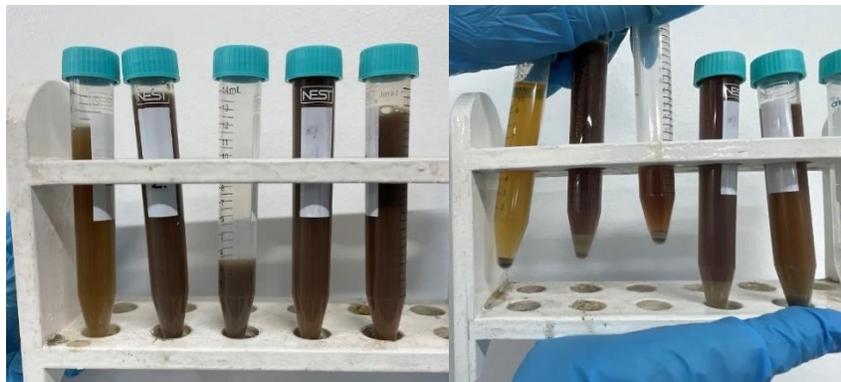


Nota. En la figura se observa la obtención del extracto enzimático, el cual fue añadido a un tubo falcón con la ayuda de un embudo de vidrio para evitar el paso de trazas de papa u hongo.

En la figura 40, se puede evidenciar como después de los 3 días de agitación en el Shaker, se obtuvo el extracto enzimático, en este proceso, el agua disuelve las enzimas producidas por *Aspergillus niger*, liberándolas del sustrato sólido, pues se evidencia una coloración oscura, distinta a la tonalidad translúcida del agua agregada inicialmente. Por otro lado, al realizar la medición de la cantidad de extracto obtenido respecto al agua agregada se evidenció que la cáscara de papa alcanza a absorber una pequeña cantidad de la misma, pues se obtiene una menor cantidad de lo que se le adicionó a cada una de las cajas Petri contenidas con el hongo.

Figura 41.

Extractos obtenidos



Nota. En la imagen izquierda se muestran los extractos obtenidos directamente de las cajas Petri, mientras que, en la imagen de la derecha, se evidencian los extractos después de ser sometidos a centrifugación por 20 minutos.

3.1.4. Cuantificación de proteínas

a. Curva de calibración con albúmina mediante el método Biuret: Los resultados de la curva de calibración con el patrón de proteína albúmina se muestran en la tabla 10.

Tabla 10.

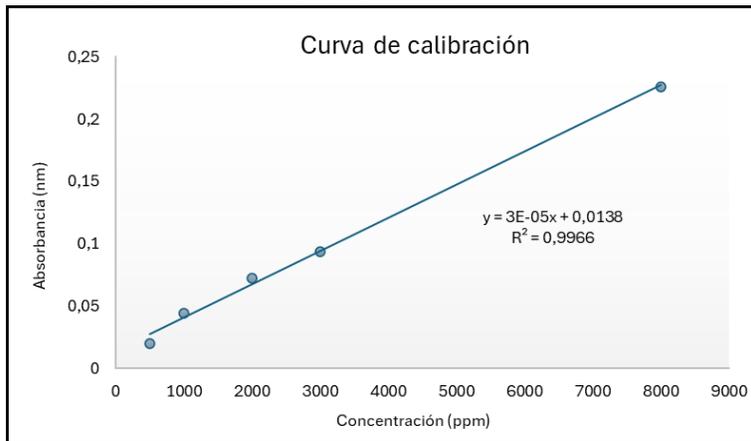
Resultados de la curva de calibración

Concentración (ppm)	Absorbancia
500	0,02
1000	0,044
2000	0,072
3000	0,094
8000	0,226

Nota. La tabla muestra los valores de la absorbancia obtenidos en el espectrofotómetro según la concentración.

Figura 42.

Curva de calibración con albúmina



Nota. La gráfica arroja los resultados de la curva de calibración realizada con la proteína albúmina, donde se muestra la ecuación del gráfico y el R^2 .

Como se puede observar en la figura 42, se obtuvo un coeficiente de correlación lineal muy cercano a 1, siendo de 0.9966. Por otro lado, se puede evidenciar que, a mayor concentración de proteína, hay una mayor intensidad de color (Figura 43), pues para una concentración de 8000 ppm, se evidencia una coloración violeta más intensa con relación a las concentraciones más bajas. Esta curva de calibración nos ayuda a cuantificar la concentración de proteínas en los extractos enzimáticos provenientes del hongo *A. niger*, debido a que se basa en la comparación de la

absorbancia de las muestras que contienen albúmina frente a la absorbancia del extracto que contiene enzimas.

Figura 43.
Soluciones de la curva de calibración con albúmina



Nota. En la figura se muestran la coloración de las diferentes soluciones preparadas a medida que aumenta la concentración de albúmina con respecto al reactivo Biuret.

3.1.5. Cuantificación del extracto

Para los extractos provenientes de *A. niger* cultivados en papa sabanera se realizaron diluciones con 0.5 y 0.2 de muestra para 10 mL. Pero en este caso se realizaron a 5 mL, por ende, cada alícuota se tomó a la mitad para lograr un volumen total de 5 mL. Los resultados de la absorbancia con cada una de estas proporciones, se leyeron el espectrofotómetro y se escogió la alícuota donde el valor de la absorbancia estuviese dentro de la curva de calibración como se muestra en la tabla 11.

Tabla 11.
Cuantificación del extracto 1 (Sustrato de papa sabanera)

Muestras	Alícuota del extracto (mL)	Absorbancia	Concentración diluida (ppm)	Concentración real (ppm)
M1	0.25	0.150	4540	90800
M2	0.1	0.114	3340	167000
M3	0.25	0.217	6773.33	135466.7
M4	0.25	0.108	3140	62800

Nota. La tabla especifica los resultados de absorbancia y concentraciones de cada uno de los extractos obtenidos en crecimiento sobre cáscara de papa sabanera.

Para hallar la concentración diluida, se parte de la ecuación de la regresión lineal que arroja la gráfica de la curva de calibración (**Ec. 4**) y se despeja el valor de x, el cual hace referencia a esta variable, mientras que y es la absorbancia de la muestra; quedando de la siguiente manera.

$$y = 3x10^{-5}x + 0.0138 \quad \text{Ec. 4}$$

$$y = mx \pm b$$

$$x = \frac{y \pm b}{m}$$

Para el caso de la muestra 1 cuya absorbancia fue de 0.15, la concentración diluida es:

$$0.15 = 3x10^{-5}x + 0.0138$$
$$x_{dil} = \frac{0.15 - 0.0138}{3x10^{-5}} = 4540 \text{ mg/L}$$

Teniendo la concentración diluida, se procede a hallar la concentración real de la muestra multiplicándolo por el factor de dilución (FD), que para el caso de las muestras 1, 3 y 4 corresponde a 20, debido a que se tomó una alícuota de 0.25 mL de extracto en un volumen total de 5 mL, esto se realizó de la siguiente manera:

$$5 \text{ mL} = 0.25 \text{ mL} * FD$$

$$FD = \frac{5 \text{ mL}}{0.25 \text{ mL}}$$

$$FD = 20$$

Una vez hallado el factor de dilución se halla la concentración real a partir de la concentración diluida:

$$x_{real} = x_{dil} * FD$$

$$x_{real} = 4540 \text{ ppm} * 20$$

$$x_{real} = 90800 \text{ ppm}$$

El anterior procedimiento se realiza para cada una de las muestras obtenidas y los resultados se pueden evidenciar en la tabla 11, en donde se puede observar que las alícuotas utilizadas (0.25 mL para M1, M3, M4 y 0.1 mL para M2) mostraron variaciones en absorbancia y concentraciones. M3 tuvo la mayor absorbancia (0.217) y concentración diluida (6773.33 ppm), mientras que M2, a pesar de su menor absorbancia (0.114), presentó la concentración real más alta (167000 ppm), indicando una alta concentración inicial de proteínas. Las concentraciones reales más bajas se

observaron en M1 (90800 ppm) y M4 (62800 ppm). Este análisis confirmó la eficacia del método Biuret para detectar variaciones en proteínas.

Una vez calculada esta concentración, se mezclaron los extractos y se realizaron nuevamente lecturas de absorbancia a la mezcla con alícuota de 0.1 y 0.25, escogiendo el valor cuya absorbancia se encontrará dentro de la curva, el resultado óptimo fue con una concentración de extracto de 0.1. Con esta alícuota se realizan lecturas en el espectrofotómetro por triplicado y se procede a hallar la concentración diluida y real de igual manera como se les realizó a las muestras por separado. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 12.

Cuantificación de la mezcla de los extractos (Papa sabanera)

Mezcla	Alícuota del extracto (mL)	Absorbancia	Concentración diluida (ppm)	Concentración real (ppm)
1S	0.1	0.07	1873	93666.7
2S	0.1	0.075	2040	102000
3S	0.1	0.077	2106.67	105333
Promedio				100333

Nota. La tabla registra los resultados por triplicado de la absorbancia y concentración de la mezcla de extracto 1, la “S” hace referencia al ustrato de cáscara de papa sabanera.

El factor de dilución para hallar la concentración real de la mezcla fue 50; es decir que el volumen de la alícuota tomado (0.1) se debe multiplicar por 50 para que de un valor de 5 mL que corresponde al volumen tomado para la elaboración de las disoluciones.

La tabla 12 presenta la cuantificación de la mezcla de extractos de papa sabanera usando el método Biuret, con mediciones por triplicado. Todas las alícuotas fueron de 0.1 mL, gracias a que con este valor se encontraban dentro de la curva de calibración con la proteína albúmina. Las absorbancias variaron ligeramente: 0.07, 0.075 y 0.077, correspondiendo a concentraciones diluidas de 1873 ppm, 2040 ppm y 2106.67 ppm, con concentraciones reales de 93666.7 ppm, 102000 ppm y 105333 ppm para las mezclas 1, 2 y 3 respectivamente. El promedio de la concentración real fue de 100333 ppm. Este análisis mostró consistencia en las mediciones y validó la precisión del método Biuret para cuantificar proteínas.

El valor de la concentración real es el promedio de las 3 diluciones preparadas con la mezcla de extractos, con este valor y la ecuación de dilución se procede a hallar el volumen de solución buffer

de citratos necesario para que el extracto quede a la concentración deseada partiendo de la ecuación de dilución.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$
$$V_2 = \frac{C_1V_1}{C_2}$$

El volumen total de la mezcla de enzimas medido con una probeta fue de 49 mL y se quiere llevar a una concentración final de 75.000 ppm; es decir que:

$$V_2 = \frac{100333 \text{ ppm} * 49 \text{ mL}}{75000 \text{ ppm}}$$
$$V_2 = 65.55 \text{ mL}$$

De ese volumen total (V_2), se tienen 49 mL correspondientes a extracto; es decir que el restante corresponde a la cantidad de buffer de citratos a adicionar.

$$V_2 = 65.55 \text{ mL} - 49 \text{ mL}$$
$$V_2 = 16.55 \text{ mL}$$

Al adicionar el volumen de solución Buffer calculado con anterioridad a la mezcla de los extractos, se midió el pH asegurándose que este estuviera en un rango de 4 a 6, el cual se encontraba en 4.93, lo que indica que es óptimo para que las enzimas presentes en el extracto sean funcionales para degradar el PVC.

Para los extractos provenientes de *A. niger* cultivados en papa pastusa, las diluciones se realizaron con alícuotas de 0.1 y 0.5 de extracto en un volumen de 5 mL, los resultados de la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro que se situaban dentro de la curva de calibración se muestran a continuación.

Tabla 13.

Cuantificación del extracto 2 (Sustrato de papa pastusa)

Muestras	Alícuota del extracto (mL)	Absorbancia	Concentración diluida (ppm)	Concentración real (ppm)
M1	0.5	0.044	1006.67	10066.67
M2	0.1	0.033	640	32000
M3	0.1	0.048	1140	57000
M4	0.1	0.066	1740	87000
M5	0.5	0.156	4740	47400
M6	0.5	0.058	1473.33	14733

Nota. La tabla especifica los resultados de absorbancia y concentraciones de cada uno de los extractos obtenidos en crecimiento sobre cáscara de papa pastusa de acuerdo a las alícuotas tomadas para cada muestra.

Para hallar la concentración diluida, se parte de la ecuación de la regresión lineal como se desarrolló con el extracto 1 y al hallar la concentración real; para las muestras con una concentración de 0.5 mL de extracto, el factor de dilución fue 10, mientras que para las de 0.1 mL de extracto fue de 50.

El anterior procedimiento se realiza para cada una de las muestras obtenidas y los resultados se registran en la tabla 13, donde se presentó la cuantificación del extracto 2 obtenido del sustrato de papa pastusa mediante el método Biuret, mostrando variabilidad en las alícuotas y concentraciones. Las muestras M1, M5 y M6 (con alícuotas de 0.5 mL), mostraron absorbancias de 0.044, 0.156 y 0.058 respectivamente y concentraciones diluidas de 1006.67 ppm, 4740 ppm y 1473.33 ppm. Las muestras M2, M3 y M4 (con alícuotas de 0.1 mL), tuvieron absorbancias de 0.033, 0.048 y 0.046 con concentraciones diluidas de 640 ppm, 1140 ppm y 1740 ppm. La concentración real más alta se observó en M4 (87000 ppm), mientras que las más bajas fueron en M1 (10066.67 ppm) y M6 (14733 ppm). Este análisis resaltó la consistencia entre la absorbancia y la concentración diluida, confirmando la eficacia del método Biuret para cuantificar proteínas. La variabilidad en los resultados subrayó la importancia de un control riguroso en las condiciones experimentales.

Una vez calculada esta concentración, se mezclaron los 6 extractos y se realizaron nuevamente lecturas de absorbancia a la mezcla con alícuota de 0.1 y 0.5, eligiendo el valor cuya absorbancia se encontrará dentro de la curva de calibración, el resultado óptimo fue con una concentración de

extracto de 0.1. Con esta alícuota se realizan lecturas en el espectrofotómetro por triplicado y se procede a hallar la concentración diluida y real de igual manera como se les realizó a las muestras por separado. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 14.

Cuantificación mezcla del extracto 2 (Sustrato de papa pastusa)

Mezcla	Alícuota del extracto (mL)	Absorbancia (nm)	Concentración diluida (ppm)	Concentración real (ppm)
1P	0.1	0.035	706.67	35333
2P	0.1	0.033	640	32000
3P	0.1	0.031	573.33	28667
			Promedio	32000

Nota. La tabla registra los resultados por triplicado de la absorbancia y concentración de la mezcla de extracto 2, la letra “P”, hace referencia al sustrato de cáscara de papa pastusa.

El factor de dilución para hallar la concentración real de la mezcla fue 50 y al promediar la concentración real de las 3 lecturas el valor fue de 32000 ppm, con este valor y la ecuación de dilución (Ec. 1), se procede a hallar el volumen de solución buffer de citratos necesario para que el extracto quede a la concentración deseada partiendo de la ecuación de dilución. El volumen total de la mezcla de enzimas fue de 50 mL y se quiere llevar a una concentración final de 30.000 ppm; es decir que:

$$V_2 = \frac{32000 \text{ ppm} * 50 \text{ mL}}{30000 \text{ ppm}}$$

$$V_2 = 53.3 \text{ mL}$$

De ese volumen total (V_2), se tienen 50 mL correspondientes a extracto; es decir que el restante corresponde a la cantidad de buffer de citratos a adicionar.

$$V_2 = 53.3 \text{ mL} - 50 \text{ mL}$$

$$V_2 = 3.3 \text{ mL}$$

Al adicionar el volumen de solución Buffer calculado con anterioridad a la mezcla de los extractos, se midió el pH asegurándose que este estuviera en un rango de 4 a 6 para que las enzimas sean activas al degradar el PVC. El resultado obtenido al medir el pH fue de 5.13.

La tabla 14 presentó la cuantificación de la mezcla del extracto 2 obtenido del sustrato de papa pastusa mediante el método Biuret, mostrando resultados por triplicado. Todas las alícuotas utilizadas fueron de 0.1 mL. Las absorbancias medidas de las mezclas 1, 2 y 3 variaron ligeramente: 0.035, 0.033 y 0.031, con concentraciones diluidas correspondientes de 706.67 ppm, 640 ppm y 573.33 ppm, mientras que las concentraciones reales fueron de 35333 ppm, 32000 ppm y 28667 ppm, con un promedio de 32000 ppm. Este análisis resaltó la consistencia en las mediciones y confirmó la eficacia del método Biuret para cuantificar proteínas, gracias a la pequeña variabilidad observada en las absorbancias y concentraciones.

Finalmente, se obtuvo un tercer extracto con el hongo cultivado sobre papa pastusa, cuyo procedimiento se realizó de la misma manera que los extractos 1 y 2 arrojando los resultados presentes en la tabla 15. En este caso, todas las alícuotas tomadas fueron de 0.5, donde las muestras M1 y M2 presentaron concentraciones reales de 19400 ppm y 53066.67 ppm, respectivamente. Al mezclar los extractos, se obtuvo un promedio de concentración real de 34066.7 ppm, con una absorbancia promedio de 0.116. Estos resultados reflejan la capacidad del hongo para generar enzimas en el sustrato de cáscara de papa, evidenciada por las altas concentraciones de los extractos. Este análisis preliminar es crucial para evaluar el potencial enzimático del hongo antes de su aplicación en la biodegradación de PVC.

Tabla 15.

Cuantificación mezcla del extracto 3 (Sustrato de papa pastusa)

Muestras	Alícuota del extracto (mL)	Absorbancia (nm)	Concentración diluida (ppm)	Concentración real (ppm)
M1	0.5	0.072	1940	19400
M2	0.5	0.173	5306.67	53066.67
Mezcla				
1	0.5	0.116	3406.67	34067
2	0.5	0.117	3440	34400
3	0,5	0.115	3373.33	33733
			Promedio	34066.7

Nota. La tabla registra los resultados de absorbancia y concentraciones de cada uno de los extractos obtenidos en crecimiento sobre cáscara de papa pastusa de acuerdo con la alícuota tomada para cada muestra y de igual forma los resultados de estas variables para la mezcla de los extractos.

El volumen total de la mezcla del extracto 3 fue de 22 mL y se quiere llevar a una concentración final de 30.000 ppm,

$$V_2 = \frac{34066.7 \text{ ppm} * 22 \text{ mL}}{30000 \text{ ppm}}$$

$$V_2 = 24.98 \text{ mL}$$

$$V_2 = 24.98 \text{ mL} - 22 \text{ mL}$$

$$V_2 = 2.98 \text{ mL}$$

El volumen total de buffer de citratos necesario para que la concentración del extracto quede a 30000 ppm fue de 2.98 mL, a esta dilución se le midió el pH arrojando un valor de 4.73.

En los resultados de las tablas 12, 14 y 15, se puede afirmar que la concentración del extracto de *A. niger* cultivado sobre cáscaras de papa sabanera (Tabla 12), fue superior a la concentración de los otros 2 extractos, siendo de 100333 ppm, 32000 ppm y 34066 ppm para los extractos 1, 2 y 3 respectivamente. La menor proliferación del hongo sobre los residuos de papa sabanera (Extracto 1) sugiere una mayor cantidad de minerales o compuestos nitrogenados presentes en dicho extracto, provenientes de la cáscara de papa, y que no corresponden a proteínas, pues el método Biuret se basa en la formación de un complejo coloreado entre el Cu^{2+} y los grupos NH de los enlaces peptídicos de proteínas [68]; sin embargo, los compuestos nitrogenados provenientes de la papa que estaban presentes en los extractos fueron quienes se hicieron presentes en esta reacción arrojando una alta concentración de “Proteínas”.

Por otro lado, para los extractos 2 y 3 (Tablas 14 y 15 respectivamente), donde el medio de cultivo fue la papa pastusa, el hongo consumió en mayor medida los nutrientes y carbohidratos de la cáscara de este tipo de papa ocasionando una mayor esporulación del hongo y por ende, una producción del extracto enzimático de una manera más efectiva sin que el extracto contuviese una cantidad considerable de compuestos provenientes de la papa y no del hongo, por ende la concentración de estos 2 últimos extractos fue menor aproximadamente en una tercera parte que la concentración del primer extracto.

3.2. Resultados del objetivo específico 2 “Definir cuáles son las enzimas extracelulares producidas por el hongo *Aspergillus niger* asociadas con la degradación de PVC”.

3.2.1. Actividad enzimática

- a. Curva de calibración DNS: Los datos obtenidos de la absorbancia se graficaron para elaborar la curva de calibración y realizar la respectiva regresión lineal, cuyos datos de “m” y “b” son fundamentales para hallar la actividad enzimática presente en los extractos.

Tabla 16.

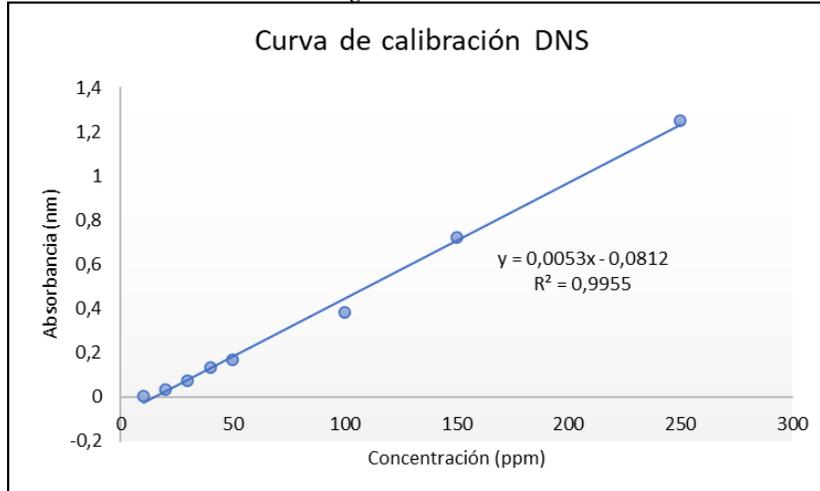
Resultados de la curva de calibración con glucosa

Concentración (ppm)	Absorbancia
10	0.004
20	0.035
30	0.072
40	0.135
50	0.17
100	0.38
150	0.719
250	1.25

Nota. La tabla muestra los valores de la absorbancia obtenidos en el espectrofotómetro según la concentración de las soluciones preparadas.

La figura 44 presenta la curva de calibración obtenida mediante el método DNS, utilizando glucosa como solución madre, donde se muestra la ecuación de regresión lineal, cuyo coeficiente de correlación fue de 0.9955, lo que indica una excelente correlación entre la absorbancia y la concentración de glucosa en el rango de 0 a 300 ppm. Este alto valor de R^2 , demuestra que el método DNS es altamente preciso y confiable para cuantificar glucosa. Por otro lado, la pendiente de la recta “m” (0.0053), muestra la sensibilidad del método, permitiendo convertir las lecturas de absorbancia en concentraciones precisas mediante interpolación en la gráfica de calibración.

Figura 44.
Curva de calibración con glucosa



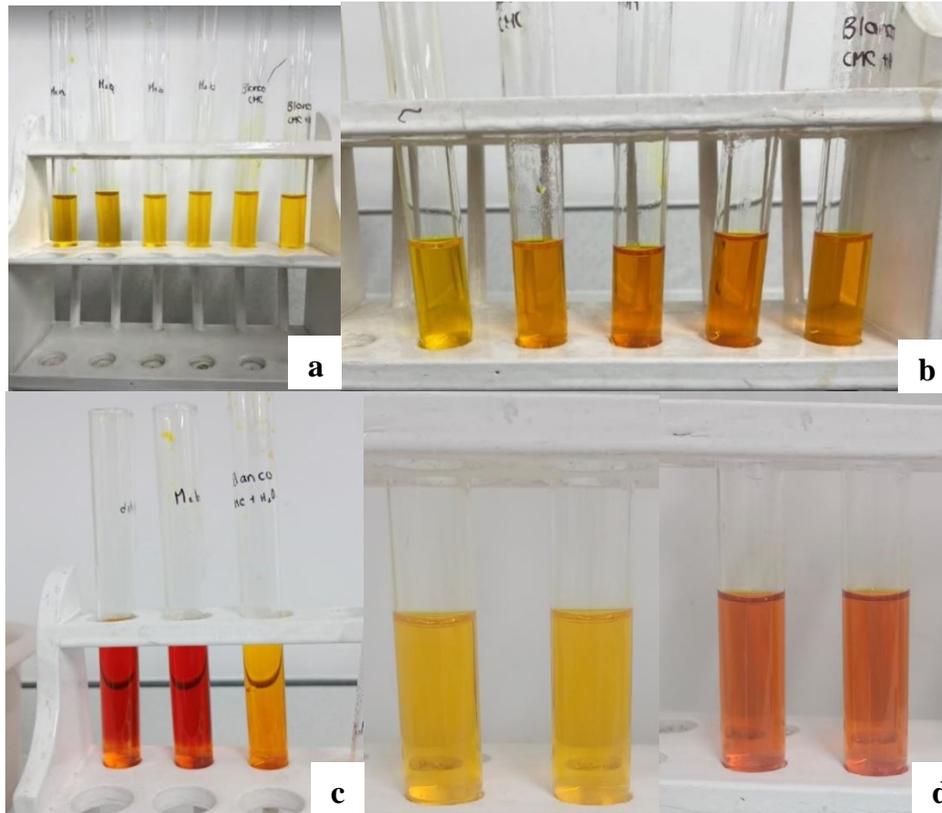
Nota. La gráfica muestra la curva de calibración por el método DNS con glucosa como solución madre, arrojando el R^2 y la ecuación de regresión lineal.

b. Lectura de los azúcares de las diluciones de extracto por DNS

En la figura 45, se puede observar la coloración amarilla de las diluciones antes de ser sometidas a calentamiento, mientras que, al inducirles calor, se comienza a generar la reacción que ocurre entre el DNS y los azúcares reductores presentes en la muestra, el cambio de coloración en la imagen “c” (Color rojo ladrillo) o “d” (Naranja oscuro), indica que el DNS se reduce al ácido 3-amino-5 nitosalicílico; es decir que los azúcares presentes en la muestra presentan buena actividad, entre mayor es la cantidad de carbohidratos, mayor es la intensidad de color.

De igual forma, se puede evidenciar que las diluciones de las muestras que contienen extracto si cambiaron de coloración después de ocurrida la reacción, mientras que el blanco no lo hizo en razón a que este solo contenía la solución de CMC sin extracto, por ende, se mantuvo en su coloración inicial y no hubo reacción redox como muestra la imagen c.

Figura 45.
Actividad enzimática con DNS



Nota. En la imagen se evidencia la reacción de oxido-reducción entre el DNS y los azúcares reductores de las muestras.

Los datos de las absorbancias antes y después de ocurrir la reacción se muestran en la tabla 17, donde las muestras 1a y 2a son con los extractos de papa sabanera, mientras que los denominados con la letra b son los extractos de *A niger* obtenidos con medio de cultivo de papa pastusa. Se puede evidenciar que antes de calentamiento la actividad enzimática es nula o baja, presentando absorbancias de 0.03 a 0.13, mientras que después del mismo la actividad enzimática mostró valores de absorbancia superiores a los datos iniciales (De 0.22 a 0.33 aproximadamente).

Finalmente, con los datos de la absorbancia se calcularon las concentraciones de los azúcares reductores obtenidos después de ocurrida la reacción (Después de calentamiento), a partir de la ecuación del gráfico de la curva de calibración de DNS (*Ec. 5*) obteniendo la concentración diluida, la cual se multiplica por 50 para obtener la concentración real en ppm de las muestras analizadas.

En la siguiente tabla, se muestran los resultados de la lectura de los azúcares reductores en las muestras antes y después de calentar, donde las absorbancias aumentaron significativamente después del calentamiento, indicando una mayor detección de azúcares reductores. Las concentraciones reales de las muestras M1a, M2a, M1b y M2b fueron 2945.283 ppm, 2850.943 ppm, 3671.698 ppm y 3869.811 ppm, respectivamente, mientras que el blanco tuvo una concentración mucho menor (850.943 ppm).

Tabla 17.

Resultados de la lectura de los azúcares reductores

Muestras	Absorbancia antes de calentar	Absorbancia después de calentar	Concentración diluida (ppm)	Concentración real (ppm)
M1a	0.034	0.231	58.906	2945.283
M2a	0.033	0.221	57.019	2850.943
M1b	0.111	0.308	73.434	3671.698
M2b	0.132	0.329	77.396	3869.811
Blanco	0.002	0.009	17.019	850.943

Nota. La tabla registra los valores obtenidos con el espectrofotómetro de las absorbancias y resultados de las concentraciones de las muestras por duplicado y su respectivo blanco.

$$y = 0,0053x - 0,0812 \quad \text{Ec. 5}$$

$$x = \frac{y + b}{m}$$

Para el caso de la muestra 1 correspondiente al extracto de cáscara de papa sabanera, cuya absorbancia fue de 0.231, la concentración diluida es:

$$0.231 = 0,0053x - 0,0812$$

$$x_{dil} = \frac{0.231 + 0,0812}{0,0053} = 58.906 \text{ mg/mL}$$

Una vez obtenida la concentración diluida, se multiplica por 50 (Factor de dilución) y de esta manera se obtiene la concentración real.

$$x_{real} = x_{dil} * FD$$

$$x_{real} = 58.906 \text{ ppm} * 50$$

$$x_{real} = 2945.283 \text{ ppm}$$

Este procedimiento se realiza para cada una de las muestras analizadas y registradas en la tabla 17, donde se puede evidenciar que la concentración de azúcares reductores presentes en la muestra de extracto del hongo sobre cáscara de papa pastusa (Extracto 2) fue mayor que la de papa sabanera (Extracto 1) en un porcentaje aproximado del 24%. Asumiendo que la cantidad de azúcares totales corresponden a celulasas, puesto que son el tipo de enzimas que más sintetiza *Aspergillus niger* [84], se puede afirmar que el extracto 2, contiene una mayor cantidad de estas enzimas gracias a que *A. niger* pudo sintetizarlas de manera más efectiva sobre los residuos de cáscara de papa pastusa.

- c. Determinación de la actividad enzimática: Para el cálculo de la actividad enzimática, se utiliza la ecuación 2, partiendo de la concentración real obtenida de las muestras medidas en g/L ($C_{g,m}$), se toma la masa molecular del azúcar patrón el de la glucosa (MMa) en g/mol, el tiempo de reacción (t_r) en minutos el cual fue de 60 y finalmente $C_{g,b}$, corresponde a la concentración de glucosa en el blanco.

Para el caso de la muestra 1, la actividad enzimática queda de la siguiente manera:

$$\frac{UA}{L} = \frac{(C_{g,m} - C_{g,b}) * 10^6}{MMa * t_r} * FD$$

$$\frac{UA}{L} = \frac{(2.945 \text{ g/L} - 0.851 \text{ g/L}) * 10^6}{180.156 \text{ g/mol} * 60 \text{ min}} * 50$$

$$\frac{UA}{L} = 9686.049 \frac{\text{mol}}{\text{L} * \text{min}}$$

Este procedimiento se realizó para las 3 muestras restantes (Tabla 18), evidenciando que la actividad enzimática para los extractos provenientes del crecimiento de *Aspergillus niger* sobre papa pastusa fueron mayores que los obtenidos para el extracto con papa sabanera. Cabe resaltar

que para ambos casos se presenta una buena actividad [84], [91], debido a que se generan de 9200 a 13960 moles de enzimas por cada L de solución.

Tabla 18.

Resultados de la actividad enzimática

Muestras	Concentración real (g/L)	$\frac{UA}{L}$
M1a	2.945	9686.049
M2a	2.851	9251.242
M1b	3.672	13048.876
M2b	3.869	13960.123

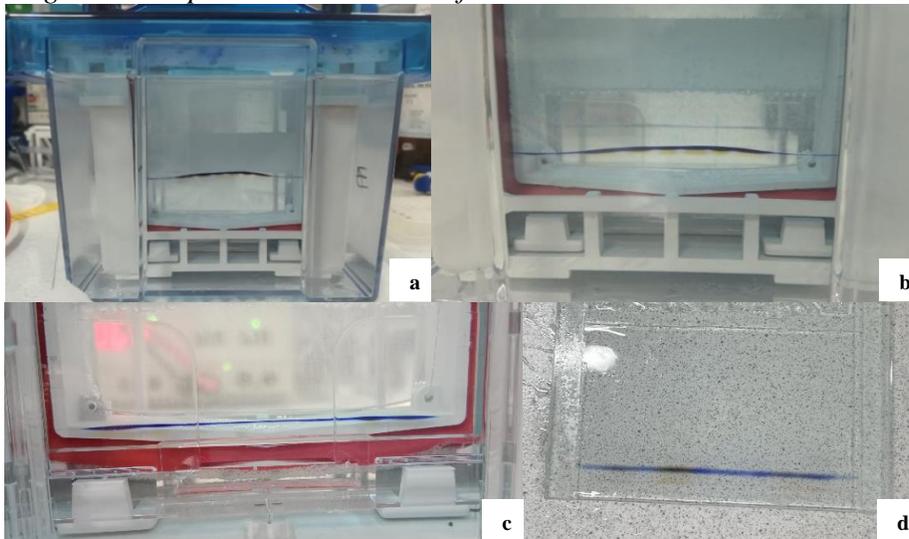
Nota. En la tabla se encuentran registrados los valores de concentración y actividad enzimática de cada una de las muestras problema.

3.2.2. Electroforesis

En la figura 46 se puede evidenciar la migración de las proteínas (Las cuales se encuentran cargadas negativamente) y van desde el polo negativo hacia el polo positivo de la cámara de electroforesis, después de transcurrido el tiempo de corrida de la electroforesis, se refleja la banda de proteínas en la parte inferior del gel (d).

Figura 46.

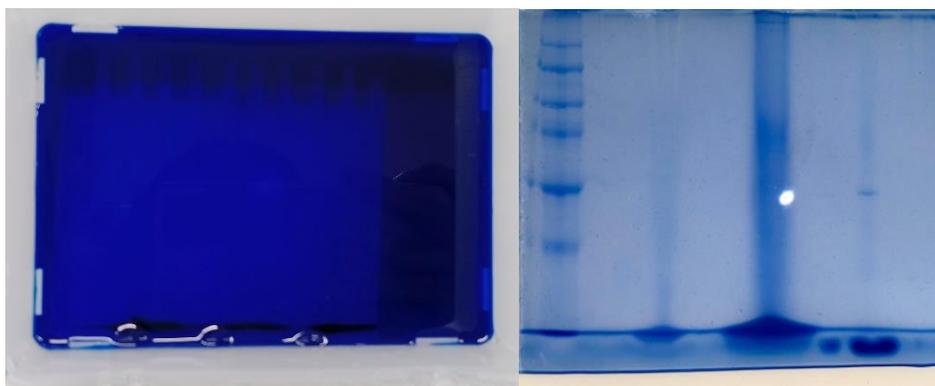
Migración de proteínas con electroforesis



Nota. La figura muestra la secuencia de migración de las proteínas con respecto al tiempo hasta llegar a la parte inferior del gel.

Una vez corrida la electroforesis, se añadió la solución de azul de Comassie sobre el gel de poliacrilamida dejando actuar por 10 horas, posteriormente se realizaron aproximadamente 8 cambios de agua destilada caliente, en la figura 47 se evidencia el gel antes y después de retirar la solución de tinción.

Figura 47.
Gel de poliacrilamida



Nota. La imagen de la izquierda muestra el gel con la solución de tinción y la derecha el gel después de ser desteñido.

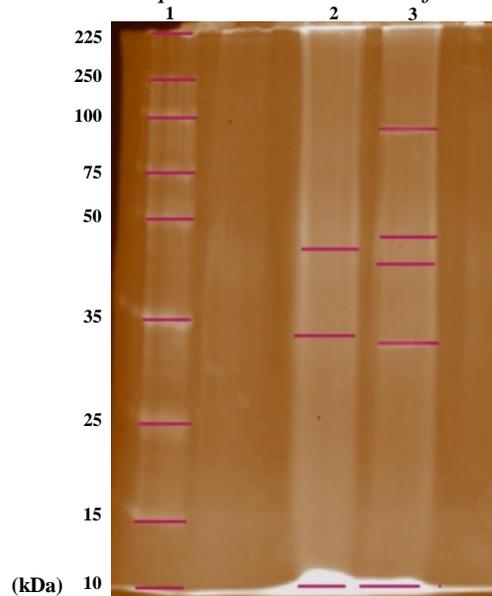
De igual forma, en la figura 48, se muestra la imagen del gel en el foto documentador, donde mediante el programa “Image lab software” [92] se ajustó la imagen a tinción silver con una sensibilidad del 90% con el fin de identificar de manera clara las bandas. En esta, se muestran los pesos de las bandas proteicas correspondientes al marcador de peso molecular en el carril 1 donde se identifican 9 pesos moleculares de proteínas en kDa y en los carriles siguientes se encuentran los extractos enzimáticos: Carril 2 para el extracto de *A. niger* sobre papa sabanera y carril 3 para el extracto de *A. niger* sobre papa pastusa. En ellos se puede evidenciar que en el carril 2 las bandas son menos visibles con respecto al carril 3, puesto que el extracto del hongo sobre sustrato de papa sabanera contenía una menor cantidad de proteínas sintetizadas por *A. niger* y mayor cantidad de compuestos provenientes de la cáscara de papa que debilitan la intensidad de coloración de las bandas proteicas.

Para identificar el tipo de proteínas presentes en los extractos, se realizó una búsqueda bibliográfica en bases de datos encontrando entre los artículos revisados que en el carril 3, se evidencia una banda por debajo de los 100 kDa, se sugiere que pertenece al grupo de las catalasas, debido a que, en un artículo realizado en la universidad de Oxford, se determinó que esta enzima sintetizada por

A. niger tuvo un peso de 97 kDa, [93]. En los carriles 2 y 3 se evidencia unas bandas cercanas al marcador de peso molecular de 50 kDa (Una banda en cada carril), estas pueden corresponder a la enzima oxidoreductasa, puesto que en un estudio que evalúa la degradación de polímeros sintéticos por extractos enzimáticos, se registra un peso molecular de oxidoreductasas sintetizadas por *A. niger* en un rango de 45 a 50 kDa [94], mientras que la banda del carril 2 que está más alejada de 50 kDa, puede pertenecer al grupo de las peroxidases en razón a que en una fermentación en estado sólido usando *A. niger*, se evidenció un peso molecular de 35 a 45 kDa para esta enzima [95]. Por otro lado, las bandas inferiores a la banda del marcador de peso molecular que registra un valor de 25 kDa, se estima que corresponden al grupo de enzimas proteasas, en razón a que en un estudio realizado con diferentes sustratos agroindustriales para el cultivo de *A. niger* y la purificación de proteasa se determinó que el peso molecular de estas se encontraba en un rango de 30 a 33 kDa [96].

Figura 48.

Gel de poliacrilamida en el foto-documentador



Nota. La figura muestra las bandas de proteínas del marcador de peso molecular en el carril 1 y de las muestras de los extractos en los carriles restantes.

Con base en lo anterior, los mecanismos de reacción que las enzimas utilizan para biodegradar el PVC pueden ser directos o indirectos. En el caso de las catalasas, estas descomponen el peróxido de hidrógeno, eliminando especies reactivas que podrían dañar otras enzimas. [97] Las

oxidorreductasas oxidan los grupos funcionales en la cadena del PVC, creando nuevos sitios reactivos para la acción de enzimas hidrolíticas [98]. Las proteasas hidrolizan las proteínas asociadas al PVC, facilitando así la acción de otros microorganismos o enzimas [99]. Por último, las peroxidases oxidan diversos sustratos, generando radicales libres que atacan la estructura del PVC y crean sitios de degradación [100].

3.3. Resultados del objetivo específico 3 “Determinar la capacidad que tiene el extracto enzimático crudo de *A. niger* para la degradación de probetas de PVC”.

3.3.1. Obtención y pretratamiento de las probetas de PVC

Después de someter 15 de las probetas al pretratamiento con luz UV, los resultados obtenidos del pesaje en balanza analítica se encuentran registrados a continuación, se debe tener en cuenta que este valor de pesaje se registró hasta que fuese constante; es decir que no se presentara una oscilación de los resultados en la balanza analítica.

Tabla 19.

Pretratamiento de las probetas de PVC con luz UV

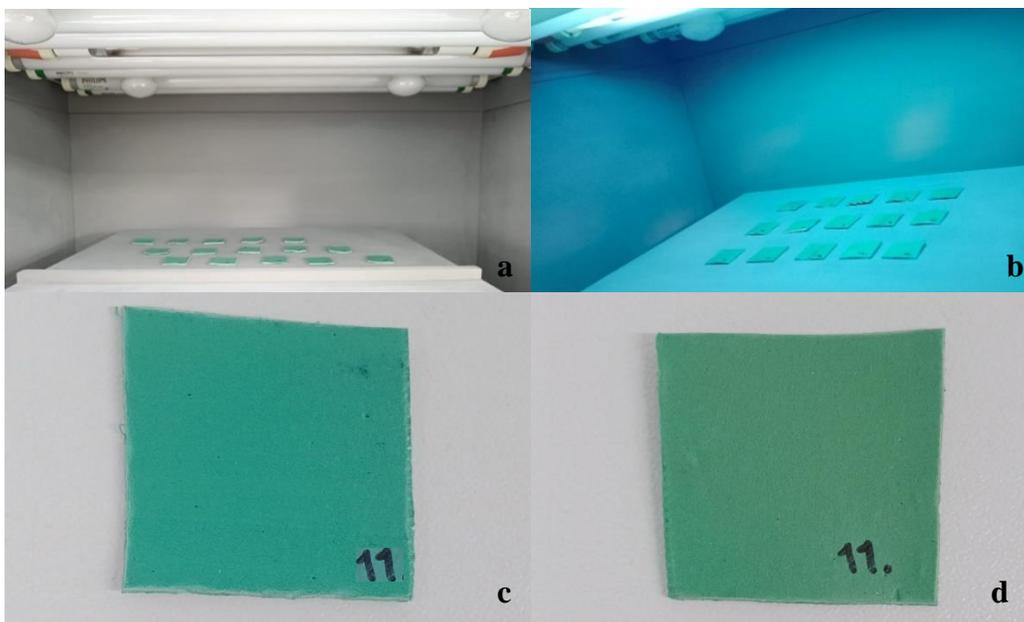
Probeta	Peso inicial de la muestra (g)	Peso de la muestra pasados 15 días (g)	Peso final de la muestra (g)
1	1,1558	1,1558	1,1558
2	1,0674	1,0674	1,0673
3	1,1529	1,1528	1,1527
4	1,2857	1,2856	1,2856
5	1,0951	1,0951	1,0950
6	1,1437	1,1436	1,1436
7	1,1321	1,1321	1,1320
8	1,1510	1,1509	1,1509
9	1,0869	1,0868	1,0868
10	1,2327	1,2326	1,2326
11	1,1125	1,1125	1,1124
12	1,1675	1,1674	1,1674
13	1,1021	1,1019	1,1017
14	1,1321	1,1321	1,1319
15	1,1812	1,1812	1,1811

Nota. En la tabla se registran los pesajes de las probetas de PVC en 3 instancias, antes de ser expuestas a luz UV, pasados 15 días y al finalizar pretratamiento.

Como se puede evidenciar en la tabla 19, los pesos correspondientes a las muestras antes de ser ingresados a la luz UV, pasados 15 días y al finalizar el tiempo de exposición para cada una de las muestras no presentan variación significativa, pues las alteraciones se presentan únicamente en el último decimal; esto quiere decir que si bien, la luz UV degrada la superficie del material, no afecta la degradación del polímero por pérdida de peso en el tiempo que se estipuló para el pretratamiento, pues este únicamente modifica el polímero en la superficie para que la degradación enzimática sea más rápida. Según lo expuesto en la tabla, la variación más alta corresponde a la probeta 13, pues su peso disminuyó en 0.0004 g con respecto al peso inicial sin exposición. Como se puede observar en la figura 49, visualmente las probetas adquirieron una coloración verde amarillenta, como un aspecto “Quemado”, lo cual indica que la radiación UV deterioró la superficie de las probetas.

Figura 49.

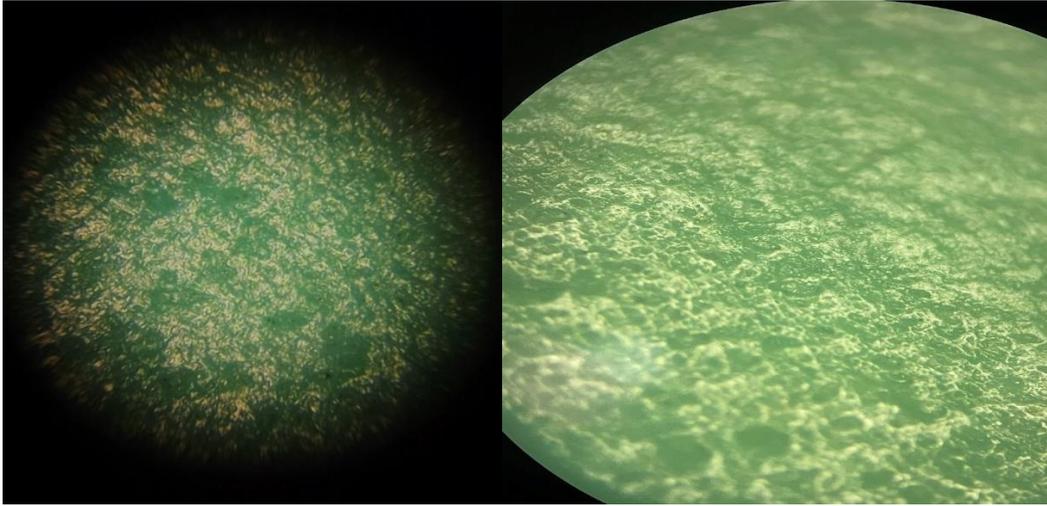
Pretratamiento con luz UV.



Nota. La figura evidencia las 15 probetas de PVC expuestas a la luz ultravioleta, en el caso de la imagen c y d, se evidencia como estaba la superficie antes de ser expuesta y como quedó después de la exposición pasados 30 días respectivamente.

Figura 50.

Estructura de las probetas al microscopio metalográfico.



Nota. La figura evidencia la estructura del PVC antes de ser expuestas al pretratamiento con luz UV y después de ser sometidas por un periodo de 1 mes.

En la figura 50 se evidenció una textura superficial uniforme y lisa, indicando un material en buen estado sin daños ni alteraciones. La estructura homogénea sugirió la ausencia de irregularidades y contaminantes. La apariencia general de la superficie fue suave y continua, sin fracturas ni irregularidades significativas, reflejando la integridad estructural del material. Estas observaciones establecieron un estándar de calidad para evaluar los diferentes cambios del PVC en aplicaciones como el pretratamiento con luz UV, pues en la imagen de la derecha las únicas diferencias relevantes fueron relacionadas con la tonalidad de las probetas pues las expuestas a la luz UV mostraron una coloración amarillenta en comparación con la probeta original la cual era de un color verde uniforme (Imagen izquierda).

3.3.2. Degradación de las probetas de PVC

Después de someter las probetas de PVC al extracto enzimático por un periodo de 1 mes, se sacaron de las cajas Petri, se limpiaron y se introdujeron al horno para su respectivo secado, una vez cumplido el tiempo se registraron los pesos finales como se muestra en la tabla 20 y 21 para los extractos de *A. niger* obtenidos de papa sabanera y pastusa respectivamente y se procedió a determinar el porcentaje de degradación según la ecuación 3.

$$\% \text{ Degradación} = \left(\frac{W_i - W_f}{W_i} \right) * 100$$

Tabla 20.

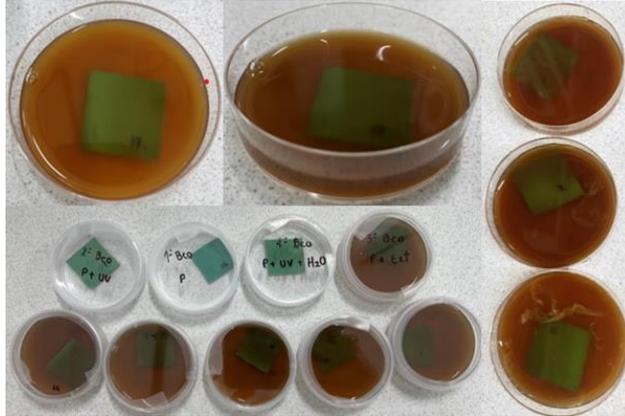
Biodegradación de PVC con extracto 1 (Cascara de papa sabanera)

Probeta	Peso inicial de la muestra W_i (g)	Peso final de la muestra W_f (g)	Porcentaje de degradación
1 (Blanco 2S)	1.15582	1.15446	0.12%
2 (Blanco 3S)	1.06734	1.06523	0.19%
4S	1.28560	1.28044	0.39%
5S	1.09502	1.09277	0.20%
6S	1.14361	1.13810	0.48%
7S	1.13201	1.12698	0.44%
8S	1.15087	1.14634	0.39%
16 (Blanco 1S)	0.90935	0.90878	0.06%
17 (Control 1)	1.17693	1.17642	0.03%

Nota. En la tabla se muestra los respectivos valores correspondientes al peso inicial y final de cada una de las muestras y el porcentaje de degradación de estas. La letra “S” hace referencia al sustrato de papa sabanera.

Los resultados mostrados en la tabla 20, evidencian que el porcentaje de degradación de las láminas de PVC se encuentran en un rango del 0.06 al 0.48%, las probetas que no corresponden a blancos tienen una media del 0.38% y una desviación estándar de 0.107%. Los porcentajes más pequeños corresponden a los blancos, las probetas sin luz UV (blanco 1 y control 1) degradaron en un porcentaje menor al 0.1%, siendo el del control el más pequeño (0.03%). La probeta con solo luz UV (blanco 2) degradó en 0.12%. Por el contrario, las probetas que poseían pretratamiento con luz Ultravioleta y se sometieron a degradación enzimática obtuvieron un porcentaje de degradación superior al 0.20%, siendo la más representativa la probeta #6, cuyo porcentaje de degradación fue del 0.48%, esto indica que el pretratamiento con luz UV ayuda a acelerar el proceso de biodegradación.

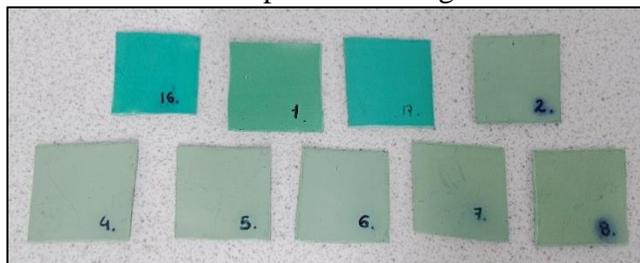
Figura 51.
Probetas de PVC con extracto enzimático 1



Nota. En la figura se muestran los respectivos blancos y las probetas de PVC expuestas a degradación con 10 mL de extracto por cada caja Petri.

De igual forma, visualmente se puede evidenciar un cambio en la coloración de las láminas como se muestra en la figura 52, las cuales perdieron intensidad de color, las probetas 16 y 17 no se sometieron a luz UV, la probeta 1 solo tiene pretratamiento con luz UV y por ende solo se ve una disminución de la fuerza de color, mientras que las probetas 4, 5, 6, 7, 8 fueron expuestas tanto a luz UV como a degradación con extracto y por tal razón se evidencia una gran disminución de color, adquiriendo una tonalidad pálida, la 2 (Luz UV + H_2O), por su parte también presenta disminución en su tonalidad pero en menor medida que las probetas expuestas tanto a luz UV como a extracto. De igual forma, se observa como la superficie de las probetas expuestas a biodegradación enzimática con previo pretratamiento con luz UV, presenta deterioro, cuyo aspecto ya no es liso, sino se generó un aspecto poroso en la superficie de las probetas.

Figura 52.
Probetas de PVC después de biodegradación enzimática 1



Nota. La figura muestra el cambio de coloración de las probetas, siendo más notorio el cambio en las probetas con luz UV y extracto enzimático.

Para el caso de las probetas expuestas a biodegradación con el extracto enzimático de *A. niger* obtenido sobre sustrato de papa pastusa (Tabla 21), se puede evidenciar que el porcentaje de biodegradación oscila entre el 0.5 y 0.6%, obteniendo mejores resultados que el extracto 1 (Con medio de cultivo de papa sabanera). De las 4 muestras expuestas a biodegradación, se obtuvo una media de 0.57% y una desviación estándar de 0.031%, lo que indica que los datos de biodegradación no se encuentran tan dispersos y tienden a estar cercanos a la media. En cuanto a la relación con los blancos y el control 1, se puede corroborar que sin pretratamiento con luz UV, el porcentaje de degradación es mínimo siendo de 0.12 y 0.08% para la probeta sin luz UV que contenía extracto (control 2) y la probeta sin pretratamiento ni solución enzimática (blanco 1) respectivamente. Lo anterior corrobora que el pretratamiento con luz ultravioleta permite que la biodegradación enzimática sea más efectiva, pues el extracto que se sometió a la probeta sin pretratamiento degradó en un porcentaje menor al 0.1%, mientras que las muestras con pretratamiento fueron mayores al 0.5%.

Tabla 21.

Biodegradación de PVC con extracto 2 (Cascara de papa pastusa)

Probeta	Peso inicial de la muestra W_i (g)	Peso final de la muestra W_f (g)	Porcentaje de degradación
3P	1.15271	1.14734	0.54%
9P	1.08681	1.08135	0.55%
11P	1.11247	1.10637	0.61%
12P	1.16741	1.16179	0.56%
13 (Blanco 3P)	1.10174	1.09979	0.20%
14 (Blanco 2P)	1.13194	1.13028	0.17%
18 (Blanco 1P)	1.08368	1.08292	0.08%
19 (control 2)	1.23575	1.23572	0.12%

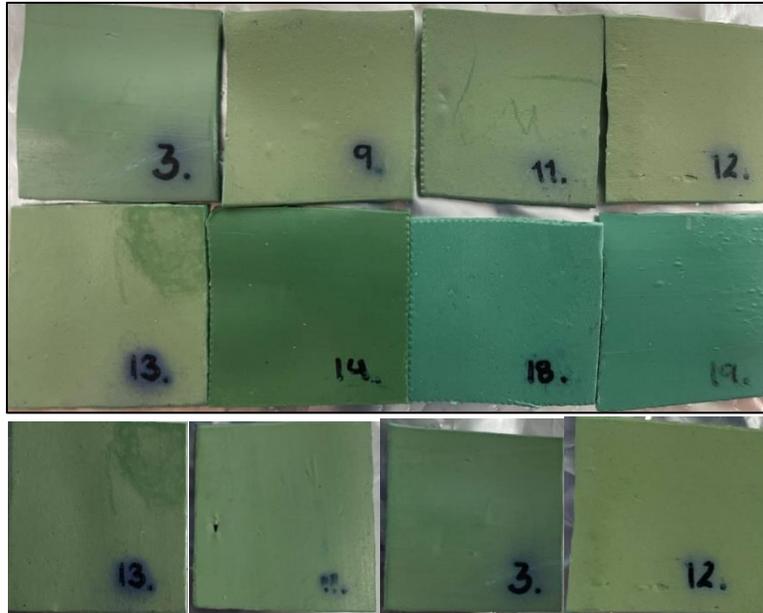
Nota. En la tabla se muestra los respectivos valores correspondientes al peso inicial y final de cada una de las muestras y el porcentaje de degradación de las mismas. La letra “P” hace referencia al sustrato de papa pastusa.

De igual forma, en la figura 53, se ven claramente las alteraciones en la coloración y aspecto físico de las probetas, donde las probetas 3, 9, 11 y 12 fueron las expuestas al extracto presentando una disminución del color más representativa, así como también desgaste en la superficie del material. Las probetas 18 y 19 no presentaron mayor alteración, pues no fueron sometidas a pretratamiento a diferencia de la 14 que aunque tenía luz UV, no se sometió a

extracto enzimático. La 13, por su parte (Probeta con luz UV y agua) evidencia una variación de color muy parecida a las probetas con extracto, pero no hubo mayor pérdida de peso.

Figura 53.

Probetas de PVC después de biodegradación enzimática 2



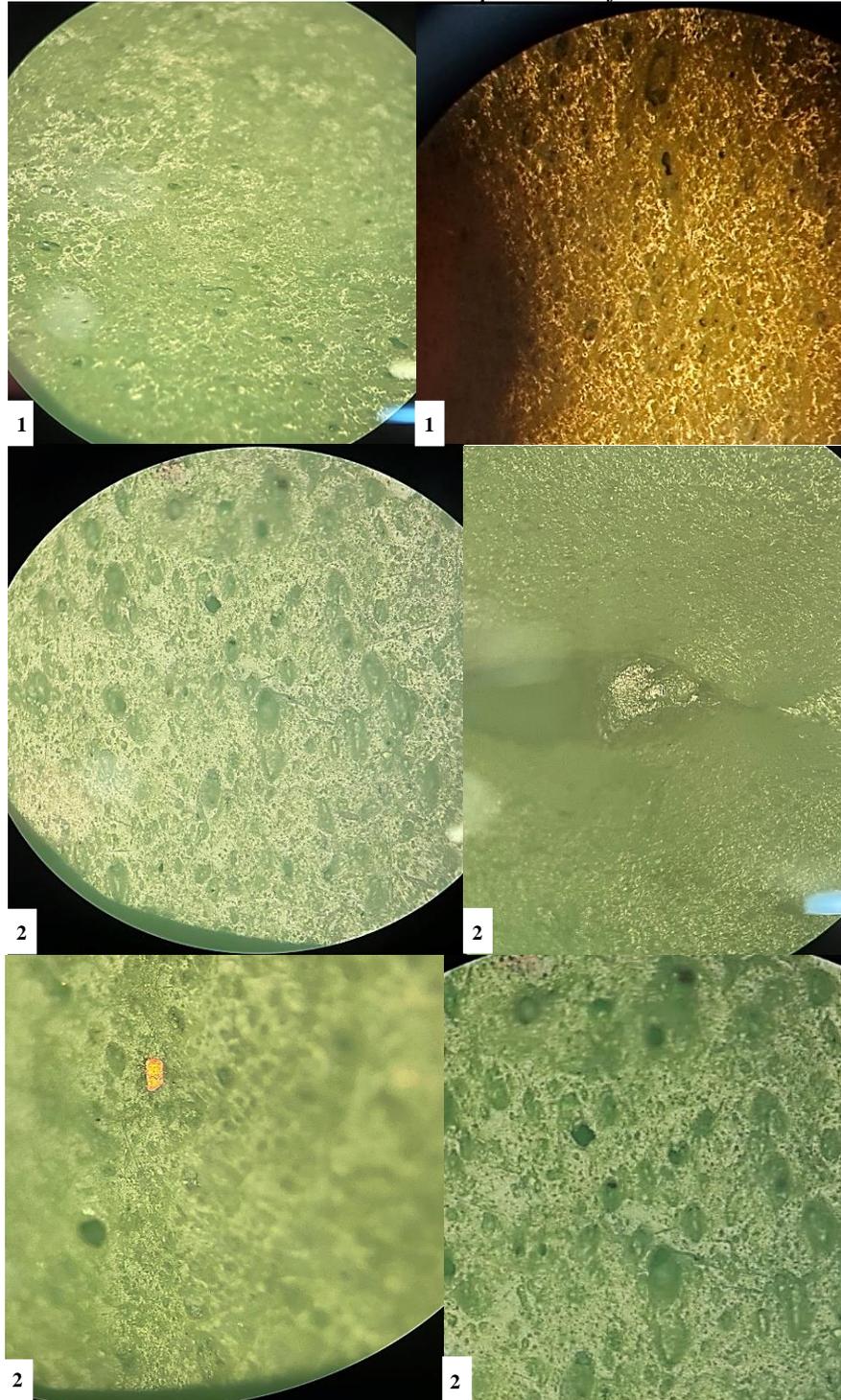
Nota. En la imagen se muestra el cambio de coloración de las probetas que fueron expuestas al extracto enzimático 2.

Las probetas fueron observadas al microscopio metalográfico con el fin de identificar cambios en la estructura del material. En la Figura 54 se muestran las alteraciones halladas: se observaron grietas y picaduras en las láminas que conforman la estructura completa de la probeta de PVC. Estas observaciones corroboran la degradación causada por el extracto enzimático, ya que las láminas expuestas presentan una cantidad significativa de alteraciones y deformaciones, a diferencia de los blancos que no contenían extracto. Las láminas que fueron expuestas al extracto 2 (utilizando medio de cultivo de papa pastusa para el crecimiento de *Aspergillus niger*) muestran una mayor cantidad de depresiones y picaduras en la superficie en comparación con las expuestas al extracto 1 (con sustrato de papa sabanera). En detalle, las imágenes numeradas como "1" presentan grietas y picaduras menos profundas y en menor proporción, mientras que las numeradas como "2" muestran grietas más pronunciadas y una mayor cantidad de picaduras. Esto sugiere que el medio de cultivo de papa pastusa potencia la actividad enzimática del hongo, resultando en una degradación más intensa del PVC. Las diferencias en la severidad de las deformaciones entre ambos extractos indican la variabilidad en la eficacia de los medios de cultivo utilizados para la

producción enzimática, destacando la importancia de optimizar las condiciones de cultivo para maximizar la degradación del PVC.

Figura 54.

Estructura de las láminas al microscopio con objetivo 20



Nota: La figura evidencia las deformaciones que se presentaron en la estructura del PVC al ser expuestas 1 mes al extracto enzimático. Las imágenes con el número “1”, corresponden a las láminas degradadas con el primer extracto y las que tienen el número “2” las que se biodegradaron con el segundo.

Se determinó la actividad enzimática como en el numeral (3.2.1) del extracto, pero después de haber sometido las probetas al mismo, reconociendo que hubo una pérdida de actividad como lo muestra la tabla 22 relacionada con la actividad antes de ser puesto en contacto con el polímero, pues disminuyeron en un 25% aproximadamente con respecto a los resultados de la tabla 18, cuya actividad oscilaba entre 9251.242 y 13960.123 unidades de actividad por litro de solución, para las enzimas del tipo celulasas, mientras que después de haber estado en contacto con el polímero esta actividad disminuyó manteniéndose en un rango de 2312.81 y 3446 UA/L.

De igual forma se midió el pH de los extractos y se encontró que habían aumentado, siendo de 7.68 y 7.22 para los extractos 1 y 2 respectivamente, esto puede ser el resultado de la liberación de iones procedentes del PVC mientras ocurre la degradación, lo que se traduce en un aumento del pH del medio, que a su vez puede llegar a alterar la actividad enzimática del extracto o la estabilidad del complejo enzima-sustrato.

Tabla 22.

Actividad enzimática después de biodegradación

Muestras	Concentración real (g/L)	$\frac{UA}{L}$
M1a	1.351	2312.810
M2a	1.379	2442.328
M1b	1.596	3446.087
M2b	1.577	3358.201

Nota. En la tabla se encuentran registrados los valores de concentración y actividad enzimática de cada una de las muestras problema.

Cabe resaltar que lo esperado de esta actividad es que se mantenga constante o no disminuya drásticamente, pues de esta manera se asegura que las enzimas sigan siendo funcionales para degradar el polímero, lo anterior está relacionado a su vez con el pH, pues un aumento de este, ocasiona la pérdida de estructura de las enzimas o su desnaturalización, reduciendo su actividad.

Finalmente, con el fin de determinar cambios en las propiedades mecánicas del polímero como características de biodegradación expuestas en el numeral 1.7.3, se realizó prueba de dureza Shore 'D', la cual implementa con el fin de medir la dureza de los plásticos rígidos o semirrígidos.

Figura 55.
Dureza Shore 'D



Nota: La figura muestra la medición de la propiedad de dureza mediante el durómetro Shore.

En la tabla 23, se registra la propiedad de dureza para los blancos, controles y las dos muestras más representativas biodegradadas con cada extracto; es decir, (las que perdieron más masa) las cuales se sometieron previamente a pretratamiento con luz UV. Los resultados evidencian una disminución de esta propiedad una vez las probetas se sometieron a biodegradación, mostrando una mayor reducción en las probetas que fueron sometidas a los extractos siendo mayor con el extracto 2, pues su disminución fue aproximadamente del 30 al 42%, mientras que para el primer extracto estuvo en un rango del 12 al 23%. Los blancos y controles, por su parte presentaron disminución, pero en menor proporción que las muestras siendo menor al 10%.

Tabla 23.

Prueba de dureza

Muestras	Dureza antes de biodegradación (shore 'D)	Dureza después de biodegradación (shore 'D)
6S	76	58
7S	73	64
11P	78	45
12P	80	53
Blanco 1	79	77
Blanco 2	77	72
Blanco 3	74	68
Control 1	78	77
Control 2	76	71

Nota. En la tabla se encuentran registrados los valores de dureza realizados en las probetas con mayor degradación. La "S" representa la probeta expuesta al extracto enzimático obtenido con sustrato de cascara sabanera y "P" con sustrato de papa pastusa.

3.4. Caracterización de las probetas de PVC mediante SEM

Las probetas que se sometieron a microscopía electrónica de barrido fueron:

- a. Blanco 1: Probeta de PVC sola
- b. Blanco 2: Probeta de PVC + Luz UV
- c. Blanco 3: Probeta con UV + Agua destilada
- d. Control 1: Probeta sin luz UV + extracto 1
- e. Control 2: Probeta sin luz UV + extracto 2
- f. Probeta con mayor % de biodegradación con primer extracto
- g. Probeta con mayor % de biodegradación con segundo extracto

En la figura 56 se muestra la adecuación realizada de las probetas que involucran el corte en trozos pequeños y su posterior metalización con baño de oro.

Figura 56.

Tratamiento de las probetas para SEM



Nota. La imagen (a) muestra como se organizaron y fueron colocadas las probetas, mientras que en la (b) se evidencia una fina capa de oro en la superficie.

Una vez realizada la prueba, la cual tuvo una duración de 40 minutos, se obtuvieron las imágenes representadas en la figura 57, donde se observa que la estructura del blanco 1 (Imágenes a) no presenta ninguna alteración morfológica, puesto que no contenían luz UV ni extracto. En cuanto al blanco 2 (Imágenes b) que fue sometida al pretratamiento UV, se evidencia en una pequeña proporción la formación de cavidades. Con respecto al blanco 3 (Imagen c), el cual se expuso a

luz ultravioleta y agua destilada, también se reflejan pequeñas deformaciones en su estructura siendo más visibles en relación con los controles. Los controles 1 y 2, (Imágenes d y e) respectivamente, los cuales contenían extracto, pero no fueron sometidas a luz UV, se observan picaduras sobre la superficie del material siendo más notorias para el extracto 2 que se obtuvo del *A.niger* sobre la cascara de papa pastusa (Imagen e).

Finalmente, las muestras que fueron expuestas a extracto enzimático (Imagen f), presentaron una mayor cantidad de grietas o fisuras en donde se detallan la longitud aproximada de las mismas, siendo de $2.6\mu\text{m}$. En contraste las muestras biodegradadas con extracto enzimático 2 (Imagen g), mostraron en mayor medida la formación de cavidades lo cual es el resultado de la deshidrocoloración (pérdida de átomos de cloro), la cual genera este tipo de irregularidades; estos poros revelaron una distancia mucho mayor que las muestras que fueron expuestas al extracto enzimático 1, cuya longitud fue de 12.89 micras aproximadamente; es decir el doble con relación al extracto de *A.niger* sobre sustrato de papa sabanera.

Figura 57.
Resultados SEM para las probetas

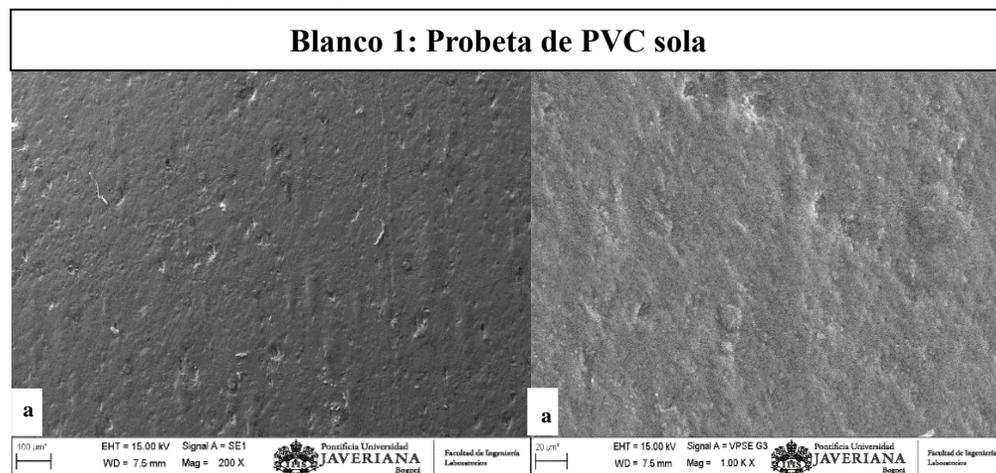


Figura 57. Continuación

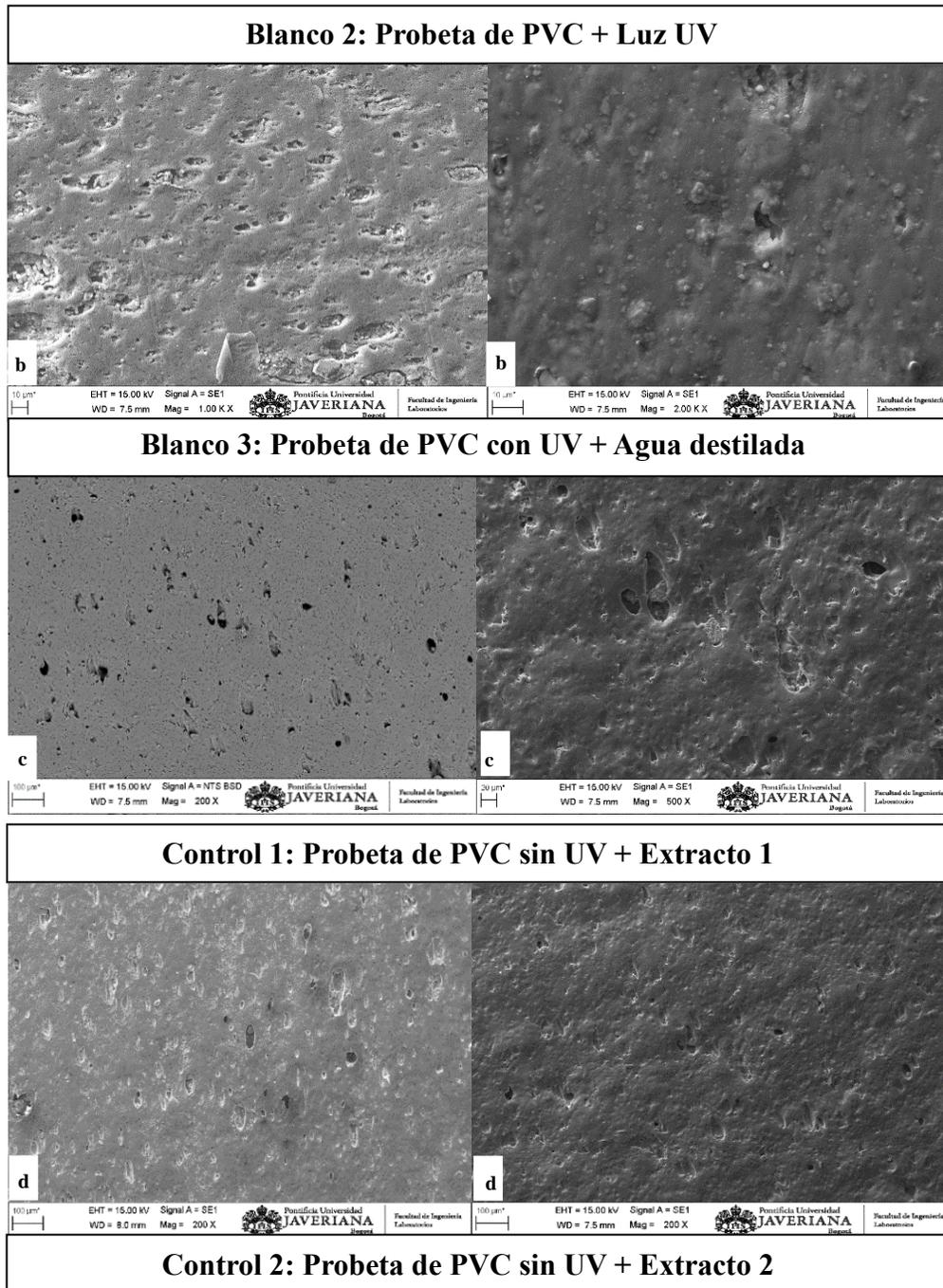
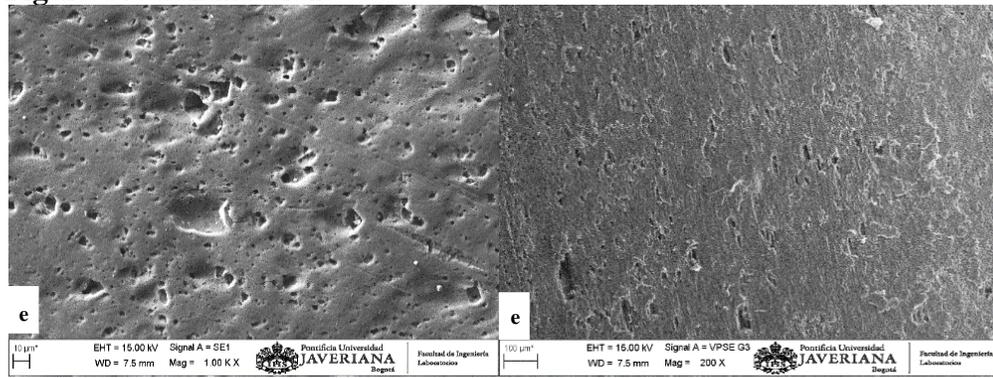


Figura 57. Continuación



Probeta con mayor % de biodegradación (Extracto 1)

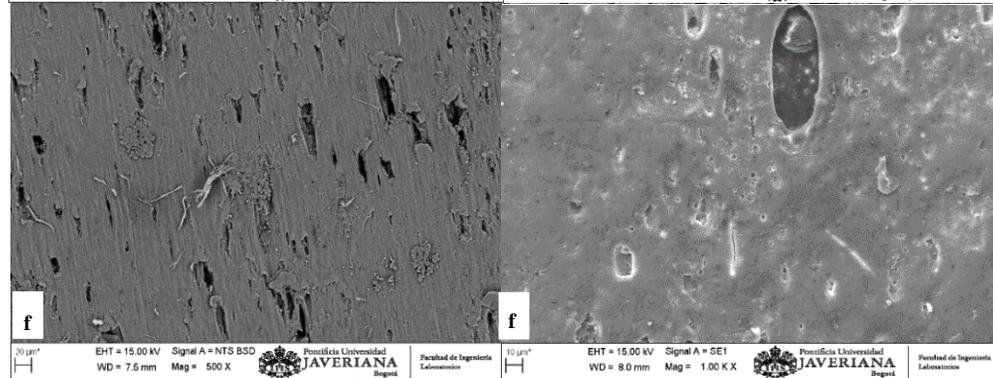
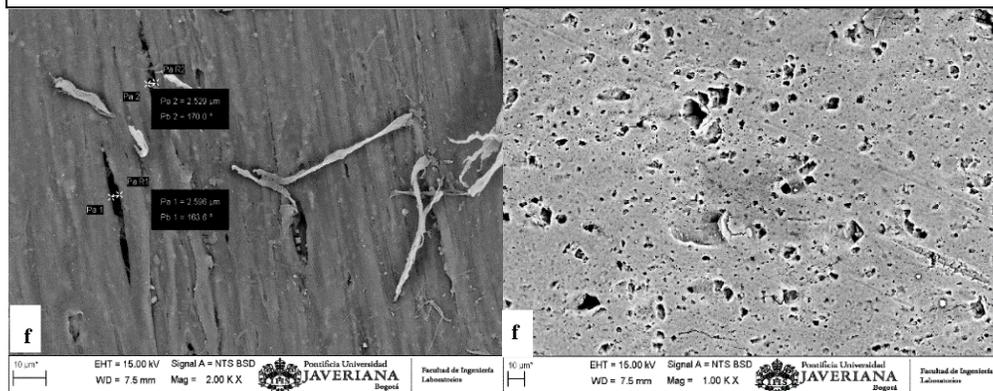
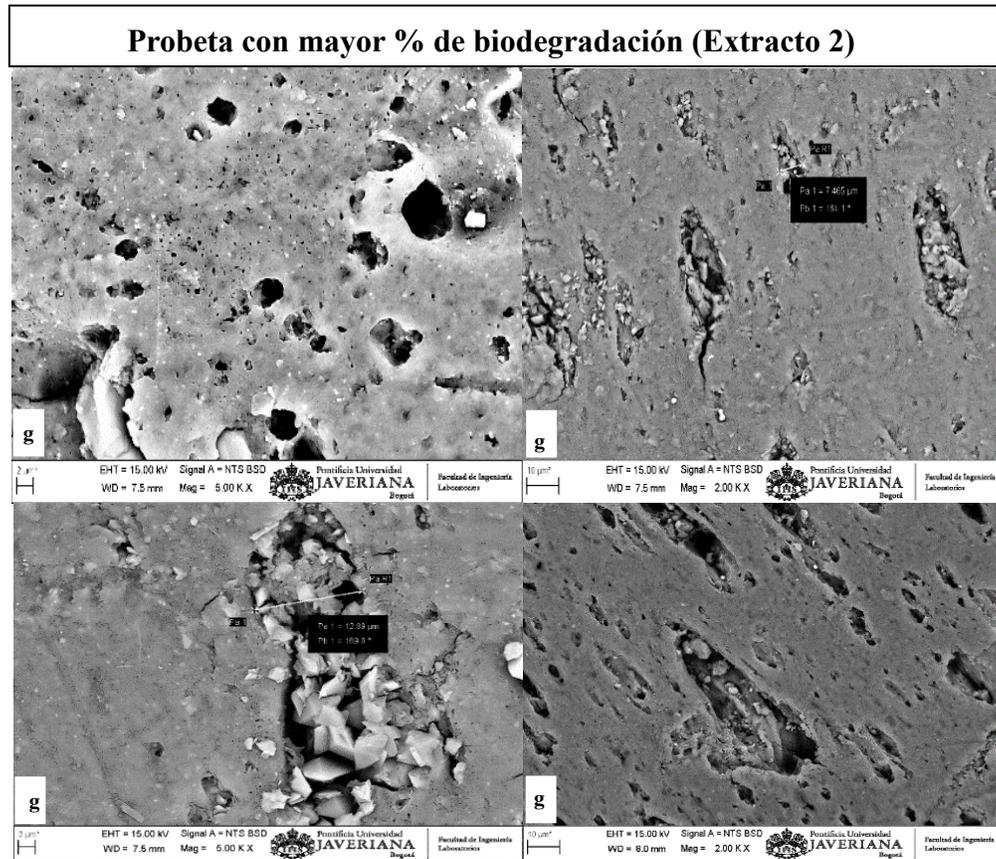


Figura 57. Continuación

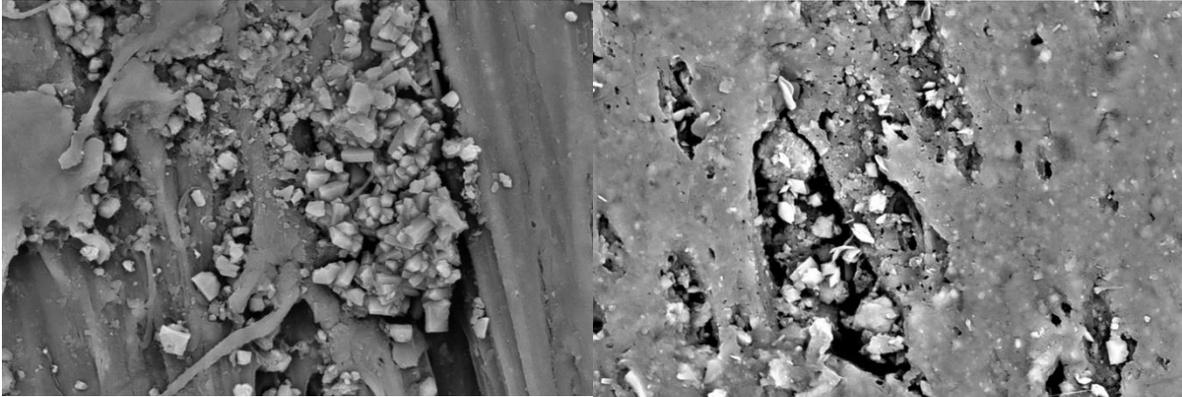


Nota. Representación de las muestras mediante SEM.

Por otro lado, como se muestra en la figura 58, en el interior de las perforaciones, se evidencian una serie de aglomeración de cristales, los cuales hacen referencia a sales provenientes del mismo polímero o procedentes de la solución Buffer de citratos con la cual se diluyó el extracto. Estos cristales se observaron con mayor proporción en las probetas que fueron expuestas al segundo extracto enzimático, lo anterior corrobora que el porcentaje de biodegradación del extracto 2 fue mayor gracias a la cantidad de deformaciones presentadas en su estructura y al porcentaje de pérdida de peso.

Figura 58.

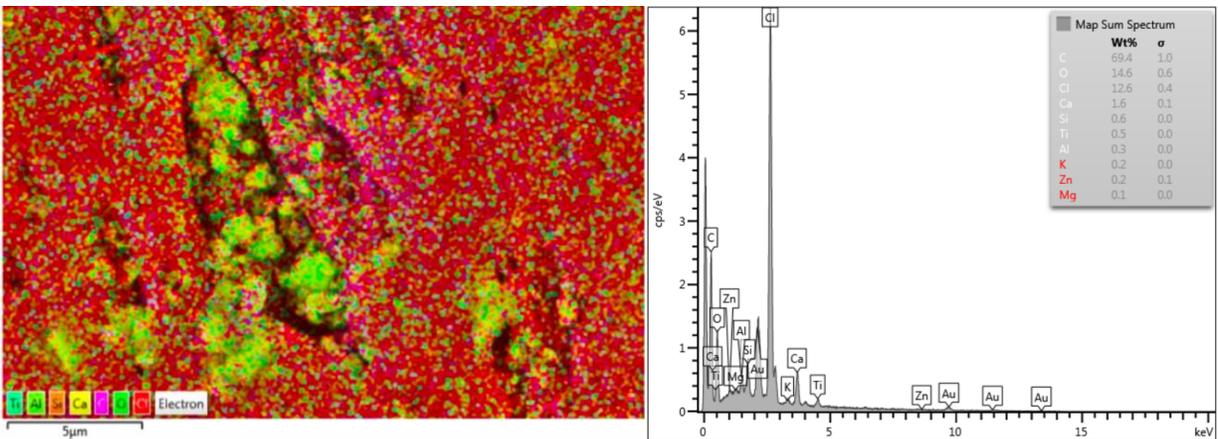
Sales presentes en las perforaciones de las probetas



Nota. La figura evidencia la formación de sales presentes en el interior de los poros del PVC

Figura 59.

Composición elemental de las probetas



Nota. La figura evidencia un análisis elemental de los compuestos más relevantes en la superficie del PVC, así como en el interior de las perforaciones.

En la figura 59, se muestra la composición de la superficie del polímero de PVC en la imagen izquierda, donde se evidencian la cantidad de elementos seccionados por colores, los cuales pertenecen en mayor proporción a átomos de cloro (Regiones rojas), siendo atribuible a la composición del material, las regiones de color verde, siendo más notorias en el interior de las cavidades, pueden deberse a la formación de nuevos grupos funcionales debidos a la oxidación, cuando se genera la degradación. Las regiones con color amarillo corresponden a sales de calcio (Ca), que puede ser el resultado de aditivos del PVC los cuales mejoran sus propiedades como es el caso del carbonato de calcio ($CaCO_3$) que se añade como carga y relleno [101]. La presencia de

elementos como silicio, titanio, aluminio, potasio, zinc y magnesio en menores cantidades pueden pertenecer a aditivos que se le añaden al PVC, los cuales tienen la función de mejorar propiedades específicas, sugieren también la formación de sales, por ejemplo, provenientes de la solución buffer con la que se diluyó el extracto o en otros casos, pueden ser el resultado de compuestos específicos debido a la biodegradación.

La gráfica del análisis elemental mediante microscopía electrónica de barrido de las probetas de PVC expuestas durante un mes a un extracto enzimático de *Aspergillus niger* cultivado en cáscara de papa (Imagen derecha), muestra una alta presencia de carbono (69.4%) y oxígeno (14.6%), indicando la estructura polimérica del PVC y productos de la oxidación. La disminución relativa de cloro (12.6%) sugiere la acción enzimática sobre el material. Estos resultados confirman la eficacia del hongo en la modificación química de la superficie del PVC, evidenciada por la formación de diversas sales y compuestos oxigenados en su mayoría.

4. CONCLUSIONES

Se determinó que el hongo *Aspergillus niger* tiene la capacidad de crecer sobre residuos de cáscara de papa (*Solanum tuberosum L.*) como sustrato de cultivo, gracias a que esta posee los nutrientes necesarios para que *A. niger* se desarrolle; la cual le aporta fuentes de carbono como el almidón (glucosa), fuentes de nitrógeno como péptidos y aminoácidos, vitaminas y minerales. De los 2 tipos de cáscara analizada, se evidenció que la cáscara de papa pastusa posee mayor cantidad de almidón y un pH óptimo, lo cual favorece el crecimiento del hongo mediante el proceso fermentativo de los residuos, puesto que la proliferación del hongo sobre esta clase de papa fue mejor con respecto al crecimiento del mismo sobre residuos de cáscara de papa sabanera, presentando una esporulación en menos tiempo y más rápida sobre el sustrato.

Por otro lado, se obtuvo un extracto enzimático crudo sintetizado por el hongo *A. niger* mediante agitación mecánica obteniendo concentraciones de 100333 ppm para el extracto del hongo sobre residuos de cáscara de papa sabanera que se llevó a 75000 ppm y 33000 ppm aproximadamente para el extracto del hongo sobre residuos de cáscara de papa pastusa, el cual se llevó a 30000 ppm. A pesar que la cuantificación de proteínas de extracto 1 (Medio de cultivo de papa sabanera) arrojara valores tan elevados debido a compuestos nitrogenados o sales provenientes de la papa, ambos extractos demostraron tener una buena actividad enzimática y ser óptimos para alterar la matriz polimérica del PVC, pues relacionando estos resultados con estudios como “*Comparación de la capacidad de degradación de cloruro de polivinilo de 8 hongos aislados de un suelo contaminado con resina de PVC*” y “*Biodegradation of polyvinyl chloride by Mucor s.p. and Penicillium s.p. isolated from soil*”, se corroboró que los hongos filamentosos están asociados a la degradación de plásticos. En el caso de este proyecto, se destaca *A. niger* por su variedad en la síntesis de enzimas degradadoras, mecanismos de reacción y capacidad de adaptación a sustratos, como lo fue la cáscara de papa.

Gracias a la técnica de electroforesis se identificó que las enzimas extracelulares producidas por *A. niger* asociadas a la degradación del polímero PVC fueron, catalasas, oxidorreductasas, peroxidasas y proteasas, donde el extracto 2, el cual contenía mayor cantidad de enzimas degradadoras de PVC, logró una mayor biodegradación. Sin embargo, se estima que el

debilitamiento de la visibilidad de las bandas en el gel de electroforesis fue debido a la presencia de otros compuestos diferentes a proteínas contenidos en los extractos, en su mayoría compuestos nitrogenados provenientes de la cáscara de papa los cuales, en la cuantificación de proteínas, reaccionaron con el sulfato de cobre II, generando el cambio de coloración y arrojando valores de concentración de proteínas altos.

La exposición por un mes de las probetas de PVC al extracto enzimático obtenido de *A. niger*, arrojó valores de degradación del 0.03% al 0.6% mediante la técnica de pérdida de peso, mostrando mejores resultados con el extracto obtenido del hongo sobre sustrato de cáscara de papa pastusa, el cual tuvo una media de 0.57%, pues la aparición de picaduras, alteraciones y deformaciones en el material fue más notoria con respecto al otro extracto. Se destaca la importancia del tiempo en el proceso de biodegradación, siendo comparable con el estudio denominado “*Isolation and molecular characterization of polyvinyl chloride (PVC) plastic degrading fungal isolates*”, pues la biodegradación se efectuó durante 10 meses consiguiendo una reducción de masa mucho mayor con un cambio significativo en el color y el deterioro de la superficie de las películas de PVC mediante SEM, pero en ese caso las cepas crecieron directamente sobre las láminas de PVC a diferencia de esta investigación, donde solo se expuso el extracto enzimático, optimizando de cierta manera el tiempo de crecimiento y asimilación del hongo sobre el sustrato.

Los resultados son preliminares, pero abren la puerta a una nueva forma de degradar el PVC, teniendo en cuenta que es un polímero que se considera no biodegradable y que su estancia en la tierra puede llegar a los 300 años; sin embargo, gracias a este estudio, se comprobó una vez más que las enzimas producidas por microorganismos, en este caso (*A. niger*), son capaces de biodegradar el PVC rompiendo algunos de sus enlaces y causando alteración en su estructura. De igual forma, el pretratamiento de las probetas es un factor importante, pues someter las muestras a luz ultravioleta ayuda a acelerar el proceso de degradación enzimática haciéndolo más susceptible a la degradación.

Gracias a la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM), se pudo corroborar e identificar el cambio en la estructura de las probetas que fueron expuestas a los extractos enzimáticos con respecto a los blancos, pues los resultados demostraron las alteraciones presentadas en el material

traducidas en la formación de cavidades, grietas, fisuras y aumento en la porosidad de la superficie, lo que arrojó una textura granular ocasionando a su vez, el debilitamiento de la matriz del polímero donde las pruebas de dureza demostraron una disminución en los valores iniciales de la misma.

Finalmente, con la realización del proyecto se reconoció que se puede mitigar el impacto ambiental generado por dos tipos de residuos sólidos urbanos; en primera instancia, los plásticos como lo es el PVC, mediante biodegradación enzimática y en segunda medida los residuos agroindustriales como lo es la cascara de papa la cual adquiere un valor agregado.

RECOMENDACIONES

Con el fin de lograr una mayor degradación se puede ampliar el tiempo de exposición al extracto enzimático, gracias a que se proporciona más tiempo para que las enzimas lleven a cabo sus procesos de descomposición, permitiendo una interacción más prolongada entre las enzimas y los sustratos, lo que facilita una degradación más completa y eficiente. Además, esta estrategia puede mejorar la tasa de conversión de los componentes degradables, optimizando el rendimiento del proceso enzimático. Es importante considerar que la extensión del tiempo de exposición debe ser evaluada cuidadosamente para evitar posibles efectos adversos como la saturación enzimática o el aumento de peso de las probetas. Esto último, puede ser el resultado de varios factores como una acumulación de intermediarios parcialmente degradados producto de una biodegradación incompleta, la formación de biofilms por acumulación de biomasa o la presencia de contaminantes externos.

De igual forma para generar una cinética de actividad que se mantenga hasta su comportamiento constante, se sugiere hacer determinación de actividad enzimática de forma periódica en intervalos semanales por al menos 6 meses, de esta manera se puede asegurar que las enzimas se encuentren activas y regular el pH para evitar su pérdida de estructura o desnaturalización y por ende, baja funcionalidad para degradar polímeros.

Finalmente, debido a la alta concentración de proteínas que arrojaron los resultados, se plantea una purificación del extracto crudo con el fin de mitigar el contenido de compuestos nitrogenados o minerales provenientes de la papa los cuales debilitaron la intensidad de las bandas proteicas en el gel de electroforesis.

REFERENCIAS

- [1] B. Posada Bustamante, “La degradación de los plásticos”, Rev. U. EAFIT, vol. 30, n.º 94, pp. 67–86, ago. 2012. DOI: <https://publicaciones.eafit.edu.co/index.php/revista-universidad-eafit/article/view/1408>
- [2] Carrillo Amezcua J. C, Leal Lozano L, Buenrostro Delgado O, Cendejas Huerta S, Sánchez Yáñez J. M. “El reciclaje de los residuos sólidos plásticos como alternativa para mejorar la calidad ambiental en el municipio de Morelia, Michoacán, México”. (2005).
- [3] DKV instituto de la vida saludable, ECODES. “Contaminación por plásticos: Uno de los mayores desafíos ambientales del S.XIX”. Observatorio de salud y medio ambiente. (noviembre 2019)
- [4] UNEP. “From Pollution to Solution: A global assessment of marine litter and plastic pollution”. (2021). Pages 148. [PDF]
- [5] Gómez Ortiz M. J. “Degradación del polietileno por actinobacterias”. Tesis pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. (2011).
- [6] Soriano Ortega B. “Biodegradación de plásticos en ambientes naturales”. Tesis pre. Facultad de ingenierías. Universidad de Alcalá. (2020).
- [7] M. J. R Nout. “*Food technologies: Fermentation 2*”. Encyclopedia of Food Safety, 3-Pages 168-177. (2014).
- [8] L. A. Calcetero Moreno y J. C. Mancera Hernández, "Evaluación del proceso de colonización y degradación de polietileno de baja densidad por inóculo de *Aspergillus niger* en humus y compostaje doméstico," Fundación Universidad De América, 2021.
- [9] J. Gómez Soto A., Sánchez Toro O. J, Matallana Torres L. G. “Residuos urbanos, agrícolas y pecuarios en el contexto de las biorrefinerías”. Tesis pre. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Vol. 28, núm. 53, pp. 7-32. (2019). Available: <https://www.redalyc.org/journal/4139/413961282001/html/>
- [10] “Kaza, Silpa; Yao, Lisa C.; Bhada-Tata, Perinaz; Van Woerden, Frank. 2018. What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050. Urban Development;. Washington, DC: World Bank. <http://hdl.handle.net/10986/30317> License: CC BY 3.0 IGO.
- [11] Chávez Porras, A. Rodríguez González, A. “Aprovechamiento de residuos orgánicos agrícolas y forestales en Iberoamérica”. Revista Academia y Virtualidad 9, (2), p-p. (2016).
- [12] Unidad Administrativa especial de servicios públicos. “Avances del acuerdo 344 de 2008. Por el cual se dispone, diseña y ejecuta un programa para la gestión de los residuos sólidos orgánicos y se dictan otras disposiciones”. (2017)

- [13] Apunte Benalcázar D. I. “Obtención de un medio enriquecido en proteínas a partir de residuos de papa (*Solanum tuberosum*) por fermentación microbiana”. Universidad Técnica de Ambato. (2019).
- [14] Prada Ospina R. “Alternativa de aprovechamiento eficiente de residuos biodegradables: El caso del almidón residual derivado de la industrialización de la papa”. (2012)
- [15] Quiroz F, Cadena F, Sinche L, Chango I y Aldás M. “Estudio de la degradación en polímeros oxo-biodegradables”. Revista politécnica. Vol. 30(1): 179–191. (2009)
- [16] Arandes J. M, Bilbao J, López Valerio D. “Reciclado de residuos plásticos”. Revista Iberoamericana de polímeros. Arandes et al. Vol 5(1). (Mar 2004).
- [17] Muñoz Inostroza S. C. “Degradación de polímeros de interés industrial utilizando una mezcla de *pseudomonas aeruginosa*, *Cladosporium sp* y *Alternaria sp*”. Universidad Santo Tomas. (Jun 2014).
- [18] L.M. Hernández., N.D. Martin H., *Determinación de la capacidad de degradación del policloruro de vinilo (PVC) por bacterias aisladas de un suelo expuesto a resina de este material*, tesis pre. Facultad de ingenierías, Universidad libre, Bogotá, Colombia, 2021
- [19] Pardo-Rodríguez, M. L., Zorro-Mateus, P. J. P., Pardo-Rodríguez, M. L., & Zorro-Mateus, P. J. P. “*Biodegradation of polyvinyl chloride by mucor s.p. and penicillium s.p. isolated from soil*” Revista De Investigación, Desarrollo E Innovación, 11(2), 387-399. (2021). Available: <https://doi.org/10.19053/20278306.v11.n2.2021.12763>
- [20] Rojas Avendaño M. C. “Aprovechamiento de los residuos sólidos orgánicos para la generación de energía en Bogotá”. Fundación Universidad de América. (2022).
- [21] Callo Arela M, Sacaca Masco F, Callata Churac R. A, Vigo Rivera J. E y Calla Calla J. “*Biodegradation of plastic polymers by Pseudomonas*”. Revista de investigación ciencia, tecnología y desarrollo. (Dic de 2020)
- [22] Herrera y Adrián Alfredo BT “Efectividad del hongo *Aspergillus niger* en la biodegradación de polietileno de baja densidad”. Escuela académico profesional de ingeniería ambiental. (2020). Available: https://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/50246/torres_haa%20-%20SD.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- [23] Fernández D, Apunte D, Hechavarría R. “*Growth Kinetics of Aspergillus niger in Solanum tuberosum*”. Revista alimentos, ciencia e ingeniería. Vol 29-2. (2022).
- [24] R. Young, P. Lovell, (2011). Introduction to polymers. [En línea]. Available: https://books.google.com.co/books?id=ImQg2MK8NtkC&printsec=frontcover&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

- [25] F. López. E. Mendizábal. "Introducción a la ciencia de los polímeros". México, 2015 [PDF]. Disponible <https://eucei.files.wordpress.com/2016/01/introduccion-a-la-ciencia-de-los-polimeros1.pdf>
- [26] ZSCHIMMER Y SCHWARZ. (2019). "¿Qué son los polímeros y cómo se clasifican?" [En línea]. <https://www.zschimmer-schwarz.es/noticias/que-son-los-polimeros-y-como-se-clasifican/#:~:text=Los%20pol%C3%ADmeros%20son%20macromol%C3%A9culas%20computas,que%20se%20conoce%20como%20pol%C3%ADmero.>
- [27] O. Avendaño Pezo, J. Bardales Arévalo, D. Guerrero Alva, y V. Torres Gómez, "Propiedades físicas de los polímeros," Universidad Nacional de la Amazonia Peruana.
- [28] Ali, M. I., Ahmed, S., Robson, G., Javed, I., Ali, N., Atiq, N., & Hameed, A. (2014). Isolation and molecular characterization of polyvinyl chloride (PVC) plastic degrading fungal isolates. *Journal of basic microbiology*, 54(1), 18–27. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200496>
- [29] Pardo Rodríguez M. L. *Estudio de la degradación de policloruro de vinilo sin plastificante a partir de hongos aislados de una muestra de suelo contaminado con resina de dicho material*. Universidad Libre. (2021)
- [30] CEHJ. "Our Health, PVC, and Critical Infrastructure". (Oct 2018). [PDF]. Disponible: <https://ceh.org/wp-content/uploads/2020/03/CEH-Our-Health-PVC-and-Critical-Infrastructure-Report-FINAL.pdf>
- [31] PLASTIVIDA. "Degradación de los materiales plásticos". Entidad técnica profesional especializada en plásticos y medio ambiente. (Sep, 2007).
- [32] I. K. Díaz., I. J. Romero., *Comparación de la capacidad de degradación de cloruro de polivinilo de 8 hongos aislados de un suelo contaminado con resina de PVC*, tesis pre. Facultad de Ingeniería, Universidad Libre, Bogotá, Colombia, 2021
- [33] Chemistry LibreTexts, "3.7: Bond Energies and Enthalpies," Chemistry LibreTexts, 2023. [Online]. Available: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Physical_Chemistry_for_the_Biosciences_\(Chang\)/03%3A_The_First_Law_of_Thermodynamics/3.07%3A_Bond_Energies_and_Enthalpies](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Physical_Chemistry_for_the_Biosciences_(Chang)/03%3A_The_First_Law_of_Thermodynamics/3.07%3A_Bond_Energies_and_Enthalpies)
- [34] M. Campos., *Biodegradación de plásticos convencionales: Estrategias y perspectivas*, tesis pre. Facultad de ciencias experimentales, Universidad de Almería, España, 2021.
- [35] M. E. E. Temporiti, "Fungal Enzymes Involved in Plastics Biodegradation," 2022. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35744698/>.
- [36] Acuña Molina N. R. "Revisión bibliográfica sobre microorganismos biodegradadores de polietileno de baja densidad y sus efectos en el material". *Revista de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas*. (2017)

- [37] R. Resende., C. Suprani., T. Rodriguez., S. Cooco., T. Velasco. “*Biodegradation of Polymers: Stages, Measurement, Standards and Prospects*”. Brazil. 2023. [PDF]. Disponible <https://www.mdpi.com/2673-6209/3/2/23#:~:text=The%20aerobic%20biodegradation%20of%20polymers,2%20by%20the%20microorganisms%20involved>.
- [38] “Degradación de las materias plásticas”. [PDF]. Disponible <http://ecoplas.org.ar/pdf/21.pdf>
- [39] Castellón C, Tejada L. “Evaluación de la degradación ambiental de bolsas plásticas biodegradables”
- [40] N. Mohanan., Z. Montazer., P. Sharma., D. Levin., “Degradación microbiana y enzimática de plásticos sintéticos”. 2020. [PDF]. Disponible. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7726165/>
- [41] M. Patricia, J. William, y O. Marino, "Género *Aspergillus*: fuente potencial de péptidos bioactivos," Revista Facultad de Ciencias Básicas, 2021. DOI: 10.18359/rfcb.5610. [Online]. Available: https://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rfcb/article/view/5610/4915#content/figure_reference_1.
- [42] Mostajo Zavaleta M. N, “*Effectiveness of Aspergillus in the degradation of polyethylene*”. South Florida Journal of Environmental and Animal Science, Miami, v.2, n.3, p. 234-253, 2022.
- [43] “*Aspergillus spp*”. 2021. [En línea]. <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/hongos/aspergillus-spp>
- [44] C. Lina., A. Leon., “Características morfológicas microscópicas de especies de *Aspergillus* asociadas a infecciones en humanos”. Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 2012. p.p 93-96.
- [45] L. Abarca. “Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial”. Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona), Spain. [PDF]. Disponible <http://www.reviberoammicol.com/2000-17/S79S84.pdf>
- [46] *Aspergillus*: Características, morfología, ciclo de vida, hábitat. (2019). Liferder. Retrieved Apr 5, 2023, Available: <https://www.liferder.com/aspergillus/>
- [47] López C, Zuluaga A, Herrera S, Ruiz A, Medina V. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO CON *Aspergillus niger* (2006)
- [48] S. Aryal. 2022. “Czapek’s Agar (CZA)- Composition, Principle, Preparation, Results, Uses”. [En Línea] <https://microbenotes.com/czapeks-agar-cza/>

- [49] “Agar extracto de malta”. [PDF]. Disponible https://amyd.quimica.unam.mx/pluginfile.php/9878/mod_folder/content/0/Agar%20Extracto%20de%20Malta.pdf?forcedownload=1
- [50] “Agar papa dextrosa”. [PDF]. Disponible https://www.insumolab.cl/descargas/industria/placas_90mm/ficha_tecnica/02.pdf
- [51] S. Alzate., J. Cuartas., G.Herrera., V. Hugo., A. Alvarez. “Residuos agroindustriales como sustratos para la producción de biomasa fúngica: enfoque en bagazo de caña”. Revista Universidad Libre. Vol 10. p.p 198- 214.
- [52] Crespo, C. Morfología de la planta de papa (solanum tuberosum L.). 2023. <https://www.portalfruticola.com/noticias/2023/03/02/morfologia-de-la-planta-de-papa-solanum-tuberosum-l/>
- [53] P. Sandaña., C. Martinez. Capítulo II: Morfología y Fisiología de la Planta. Boletín INIA No 396-15 [En línea]. Disponible: [https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/6761/NR41521.pdf?sequence=4&isAllowed=y#:~:text=La%20planta%20de%20papa%20es,y%20tub%C3%A9rculos%20\(Figura%202\).](https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/6761/NR41521.pdf?sequence=4&isAllowed=y#:~:text=La%20planta%20de%20papa%20es,y%20tub%C3%A9rculos%20(Figura%202).)
- [54] L. B. Fonseca., *Caracterización del proceso fermentativo de Aspergillus niger P.E.L. Van Tieghem utilizando como sustrato cáscara de papa (Solanum tuberosum L.) para el enriquecimiento proteico*. Tesis pre. Facultad de ciencia y tecnología en alimentos y biotecnología. Universidad Técnica de Ambato, Ecuador, Ambato, 2019.
- [55] Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. [En línea]. Disponible: <https://www.tropicos.org/name/Search?name=Solanum%20Tuberosum%20L>
- [56] G. Serrano., L. F. Castro. *Caracterización fisicoquímica de cinco (5) variedades de papa nativa de la región del Pantano de Arce (Subachoque, Cundinamarca)*. Tesis pre. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional Abierta y a Distancia – UNAD, Escuela De Ciencias Básicas Tecnología E Ingeniería-ECBTI, Bogotá, Colombia, 2020.
- [57] Miniagricultura. “La papa”. SIOC: Sistema de información de gestión y desempeño de organizaciones de cadena. [En línea]. Disponible: <https://sioc.minagricultura.gov.co/Papa/Pages/default.aspx#:~:text=El%20Consejo%20Nacional%20de%20la,sostenibilidad%20y%20competitividad%20del%20subsector.>
- [58] Fedepapa. “XXII Congreso nacional 2024 para productores de papa”. Revista Papa. Editorial: Liderando la transformación del cultivo de papa. Ed -58. 2024.
- [59] : Santos Díaz, A., Gómez Arias, L., Pedraza Rute, R., Gómez Latorre, D. A., Bohórquez Caballero, G. L., Ureña Sosa, D. F., Gómez Rodríguez, K., Villagrán, E. A., Numa Vergel, S., & Gómez Vargas, Y. (2022). “Aspectos generales del cultivo de papa en Cundinamarca”. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (agrosavia), Jun, 2022, DOI: <https://doi.org/10.21930/agrosavia.nbook.7405408>.

[60] Ministerio de agricultura y desarrollo rural. “Estrategia de ordenamiento de la producción 2019-2023, Cadena productiva de la papa y su industria”. Bogotá, Colombia, 2019. [En línea]. Disponible:

<https://sioc.minagricultura.gov.co/Papa/Normatividad/Plan%20de%20Ordenamiento%20papa%202019-2023.pdf>

[61] “Papa de nuestra tierra siachoquense”. 2017. [En línea] <https://papasiachoquense11.wixsite.com/lapapademiterrita/nuestras-variedades>

[62] Gobernación de Boyacá | Secretaría de Agricultura. “papa”. 2012. [En línea] <https://www.boyaca.gov.co/secretariaagricultura/papa/>

[63] “La rica variedad de la papa en Colombia”. 2021. [En línea] <https://www.agropinos.com/blog/variedades-de-la-papa-en-colombia>

[64] D. Castro., N. Suarez. Estudio de una alternativa para el aprovechamiento de la papa en el valle de Ubaté. Tesis pre. Facultad de ingeniería de alimentos. Universidad de la salle. 2004.

[65] W. Cortes. *Respuesta de papa “Solanum tuberosum” variedad Parada Pastusa en rendimiento y calidad a la aplicación de Ácido Glutámico*. tesis pre. Facultad de ciencias agropecuarias. Universidad de ciencias ambientales y aplicadas, Bogotá, Colombia, 2022

[66] I. Catellanos., J. Velandia., M. Gonzalez., D. Varela., E. Ramirez., “Aplicaciones y generalidades de un espectrofotometro UV-VIS UV-1800 de Shimadzu. 2018. [PDF]. Disponible https://r.search.yahoo.com/_ylt=AwrijTanRk1mYzwNhyCrcgx.;_ylu=Y29sbwNiZjEEcG9zAzMEdnRpZAMEc2VjA3Ny/RV=2/RE=1716369192/RO=10/RU=https%3a%2f%2feditorial.universidadean.edu.co%2fmedia%2faccesso-abierto%2faplicaciones-y-generalidades-de-un-espectrofotometro-uv-vis-uv-1800-ean.pdf/RK=2/RS=rWZl1FildARM0Jt2lvISdaU7hzw-

[67] Y. M. Díaz. *Determinación del contenido de azúcares, proteínas y Nitrógeno presentes en medios de cultivos modificados Para el crecimiento in vitro del hongo colletotrichum sp Fitopatógeno del ñame (dioscórea alata) en montería-córdoba*. tesis pre. Facultad de ciencias básicas. Universidad de Córdoba. Montería, Córdoba, 2020.

[68] E. Fernandez., A. Galvan., “Métodos para la cuantificación de proteínas”. Departamento de bioquímica y biología molecular. Córdoba. [PDF]. Disponible: <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/27%20METODOS%20PARA%20LA%20CUANTIFICACION%20DE%20PROTEINAS.pdf>

[69] “SDS-electroforesis en gel de poli(acrilamida)”. Clínica Universidad de Navarra. 2023. [En línea]. Disponible: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/sds-electroforesis-gel-poliacrilamida#:~:text=%C2%BFQu%C3%A9%20es%20SDS%2Delectroforesis%20en,prote%C3%ADnas%20seg%C3%BAAn%20su%20tama%C3%B1o%20molecular.>

[70] “Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida”. [PDF]. Disponible <https://bioquibi.webs.ull.es/practicass/4.pdf>

[71] A. M. Maldonado., J. V. Jorrín. “Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana*”. Departamento de bioquímica y biología molecular. Córdoba. [PDF]. Disponible: <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/27%20METODOS%20PARA%20LA%20CUANTIFICACION%20DE%20PROTEINAS.pdf>

[72] C. Urbina. “Preparación de Polímeros para su Observación a través de Microscopía Electrónica”. Acta Microscópica. Vol. 29, No. 2, pp. 132 – 153, 2020.

[73] J. M. M. Araújo, M. L. A. Gomes, and M. T. S. Correia, "Desenvolvimento de biossurfactantes por fungos filamentosos isolados de solo contaminado com petróleo," [Online]. Available: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/292615d0-6cb7-46b6-9689-028420583328/content>.

[74] A. G. Renehan, D. F. Roberts, and A. Howell, "Quantity and quality of evidence for tamoxifen in the prevention of human breast cancer," Journal of the National Cancer Institute, vol. 97, no. 24, pp. 1798-1807, 2005. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10607177/>.

[75] L. A. Álvarez. *Identificación, conservación y conformación de un banco de hongos filamentosos aislados previamente de los páramos de cruz verde y guasca*. Tesis pre. Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, 2011.

[76] Condalab. MIDC: Agar Dextrosa Sabouraud EP/USP/ISO Para el cultivo de hongos y levaduras. N° revisión 3. Feb, 2022. [PDF]

[77] O. E. Ladino Rey, J. D. Rubio, y C. A. Chacin Zambrano, “Evaluación de dos métodos de conservación de hongos filamentosos patógenos de palma de aceite,” Centro Agrícola, vol. 43, no. 2, pp. 36-41, 2016. Disponible: <http://cagricola.uclv.edu.cu>

[78] I. S. Chávez Ramos, J. L. López Núñez, and P. A. Estrada Monroy, "Material ecológico con fines de embalaje a partir del hongo *Pleurotus ostreatus* y residuos orgánicos agroindustriales," [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/328412004_Material_ecologico_con_fines_de_embalaje_a_partir_del_hongo_Pleurotus_ostreatus_y_residuos_organicos_agroindustriales.

[79] "Repositorio Institucional de Documentos," [Online]. Available: <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/3611521>.

[80] What are the indicators that determine the appropriate time to harvest potatoes?", ChefRadar, <https://chefradar.com/what-are-the-indicators-that-determine-the-appropriate-time-to-harvest-potatoes/>

[81] "Sabouraud Dextrose Agar (SDA): Principle, Composition, Uses, Colony Morphology," MicrobeOnline, <https://microbeonline.com/sabouraud-dextrose-agar-sda-principle-composition-uses-colony-morphology/>

[82] Lactophenol Cotton Blue (LPCB): Principle and Procedure for Fungal Staining," Laboratoryinfo.com, <https://laboratoryinfo.com/lactophenol-cotton-blue-lpcb/>

[83] J. Sambrook y D. W. Russell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, pp. 5.13-5.15.

[84] E. C. Garzón Rocha y M. C. Rodríguez Leitón, "Aprovechamiento de residuos generados en procesos agroindustriales en la industria mezcatera," Proyecto integral de grado para optar al título de Ingeniero Químico, Fundación Universidad de América, Bogotá, 2023.

[85] Ahamed y Vermet, (2010). Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor. Biochemical Engineering Journal, 49(3), 379–387

[86] E. Sanchez, J. Heredia, S. Buitrago, J. Medina. "Isolation and identification of potential amylolytic and cellulolytic microorganisms from soil of Bogota wetlands" Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XXII No. 1 enero - junio 2020, 36 - 44 DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.71278

[87] R. Palacios, "SOP Instrucciones," Preparación geles SDS PAGE, Código GRIP: POE 001/2014, ver 01, 23-Apr-2022. [Online]. Available: /mnt/data/Electroforesis SDS PAGE.pdf.

[88] J. Hernández, "Título del documento," Trabajo de grado, Universidad de Pamplona, 2019. [Online]. Available: http://repositoriodspace.unipamplona.edu.co/jspui/bitstream/20.500.12744/5923/1/Hern%C3%A1ndez_2019_TG.pdf.

[89] ISO, "Plastics - Evaluation of the action of microorganisms," ISO 846:2019, [Online]. Available: <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/74599/58c2c8781e594005bd2ea746d02f6e9e/ISO-846-2019.pdf>.

[90]A. A. Torres Herrera, "Efectividad del hongo *Aspergillus niger* en la biodegradación de polietileno de baja densidad," tesis, Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Escuela Académico Profesional de Ingeniería Ambiental, Universidad César Vallejo, Chiclayo, Perú, 2020. [Online]. Available: /mnt/data/torres_haa - SD.pdf.

[91] A. Suesca Díaz, "Producción de enzimas celulolíticas a partir de cultivos de trichoderma sp. con biomasa lignocelulósica," 2012.

[92] Bio-Rad, "Image Lab Software," [Online]. Available: <https://www.bio-rad.com/es-co/product/image-lab-software?ID=KRE6P5E8Z#fragment-3>.

- [93] "M. Sohail, M. Naseer, A. U. Haq, and A. Razzaq, 'Impact of Environmental Variables on Seasonal Abundance of Odonata in Some Selected Sites of Punjab, Pakistan,' Punjab Univ. J. Zool., vol. 37, no. 1, pp. 105-110, 2022. [Online]. Available: https://pu.edu.pk/images/journal/zology/PDF-FILES/10_37_1_22.pdf. (Actividad de enzimas lacasas con peso de 135 kDa), habla de centrifugación, pero por media hora y no dice las revoluciones
- [94] J. Van, Den. Brink, JF, Brons., CAMJJ. "Clonación y caracterización del gen NADPH citocromo P450 oxidoreductasa del hongo filamentoso *Aspergillus niger*" ADN y biología celular, 14(8):719-729. doi: 10.1089/ADN.1995.14.719
- [95] N. Khatoun. A. Jamal. "Isoenzima lignina peroxidasa: un enfoque novedoso para biodegradar los residuos tóxicos de polímeros sintéticos". Environmental Technology, 40(11):1366-1375. 2019. doi: 10.1080/09593330.2017.1422550
- [96] R. Janser, S. Castro. "Producción y propiedades bioquímicas de proteasas secretadas por *Aspergillus niger* bajo fermentación en estado sólido en respuesta a diferentes sustratos agroindustriales". Biocatálisis y Biotecnología Agrícola. Volumen 3, Número 4, Octubre 2014, Páginas 236-245. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.06.001>
- [97] D. K. Verma et al., "Biodegradation of polyvinyl chloride (PVC) by microorganisms: A mini-review," Journal of Polymers and the Environment, vol. 27, no. 3, pp. 540-548, 2019.
- [98] S. I. Awadh, "Biodegradation of polyvinyl chloride by *Aspergillus niger* and *Neosartorya fischeri*," Journal of Environmental and Public Health, vol. 2017, Article ID 7830567, 2017.
- [99] S. M. Alam et al., "Production and characterization of extracellular protease from *Aspergillus niger* grown on agricultural waste," International Journal of Advanced Research, vol. 3, no. 6, pp. 39-45, 2015.
- [100] G. Savitha et al., "Production of lignin peroxidase by *Aspergillus niger* and its application in decolorization of dyes," International Journal of Biotechnology and Biochemistry, vol. 6, no. 4, pp. 573-582, 2010.
- [101] A. Al-Malaika, "PVC additives - A global review," [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/222698236_PVC_additives_-_A_global_review.