



**Facultad de Farmacia
Laboratorio de Biotecnología Microbiana**

**“ESTUDIO DE LA ELIMINACIÓN DE MOLÉCULAS
SULFURADAS ADSORBIDAS SOBRE SOPORTES
INORGÁNICOS, MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE
BACTERIAS BIODESULFURADORAS”.**

Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico.

Paulina Andrea Carvajal Vidal

**Director de Tesis: Dr. Juan Ricardo Ojeda Herrera.
Co-Director de Tesis: Dr. Patricio Francisco Baeza Chandía**

VALPARAÍSO, 2011.



Tabla de Contenidos

RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCIÓN.....	8
Generalidades.....	9
Métodos Tradicionales de Desulfuración de Combustibles Fósiles.....	12
Desulfuración por adsorción.....	14
Métodos alternativos de tratamiento del petróleo:	
Biodesulfuración.....	17
La inmovilización de bacterias.....	21
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	24
Hipótesis.....	25
Objetivos.....	26
General.....	26
Específicos.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
I. Materiales.....	28
Equipos.....	28
Materiales de laboratorio.....	29
Reactivos.....	29
II. Métodos.	31
A. Soportes en estudio.....	31
B. Selección de rango de tamaño de partícula óptimo para la adsorción de moléculas sulfuradas.....	31
C. Adsorción de moléculas sulfuradas en los soportes en estudio.....	31
D. Medidas de Migración Electroforética (ME).....	32
E. Obtención y cultivo de los microorganismos biodesulfuradores.....	33
F. Ensayos biocatalíticos de biodesulfuración.....	34

G. Determinación de la selectividad de adsorción.....	35
H. Determinación de la selectividad de BDS.....	36
RESULTADOS.....	37
A. Selección de rango de tamaño de partícula óptimo para la adsorción de moléculas sulfuradas.....	38
B. Adsorción de moléculas sulfuradas en los soportes en estudio.....	40
C. Medidas de Migración Electroforética (ME).....	49
D. Ensayos Biocatalíticos de Bodesulfuración.....	50
E. Determinación de la selectividad de adsorción.....	52
F. Determinación de la selectividad de BDS.....	54
DISCUSIONES.....	55
A. Selección de rango de tamaño de partícula óptimo para la adsorción de moléculas sulfuradas.....	56
B. Adsorción de moléculas sulfuradas en los soportes en estudio.....	57
C. Medidas de Migración Electroforética (ME).....	59
D. Ensayos Biocatalíticos de Bodesulfuración.....	60
E. Determinación de la selectividad de adsorción.....	62
F. Determinación de la selectividad de BDS.....	63
CONCLUSIONES.....	64
BIBLIOGRAFÍA.....	67
ANEXOS.....	74

Resumen.

La desulfuración por adsorción es una metodología alternativa y/o complementaria a la Hidrodesulfuración (HDS), la cual remueve el azufre del combustible. No obstante, este proceso presenta problemas relacionados con la regeneración de los materiales adsorbentes utilizados. En este contexto, se ha trabajado en la biodesulfuración (BDS) de petróleo, proceso que utiliza microorganismos que oxidan selectivamente compuestos que contienen azufre. Este trabajo estudió la E de los sustratos sulfurados Dibenzotiofeno (DBT), 4,6-dimetil-Dibenzotiofeno (4,6-DMDBT), y un gasoil comercial adsorbidos sobre los materiales inorgánicos alúmina, sílice y sepiolita, mediante la utilización de la bacteria *Rhodococcus rhodochrous*. Los resultados obtenidos muestran que la adsorción de compuestos azufrados se ve afectada por las propiedades superficiales del soporte, tales como tamaño y grupos ácidos. La mayor actividad observada de BDS de DBT, 4,6-DMDBT y gasoil fue observada sobre los soportes alúmina, sílice y sepiolita respectivamente, la cual fue dependiente de la interacción del soporte con las distintas moléculas azufradas y de la capacidad de adsorción de las bacterias. La mayor selectividad de adsorción y biodesulfuración de DBT y 4,6-DMDBT fue obtenida cuando se utilizaron alúmina y sílice como soportes, respectivamente. La degradación de compuestos sulfurados adsorbidos en soportes puede ser considerada como una metodolgia alternativa a los procesos de HDS actuales.

Abstract.

Adsorptive desulfurization is a complement alternative methodology to Hydrodesulfurization (HDS) process, which removes sulfur from fuel. However, some problems due the regeneration of the adsorbent materials, are present. In this context, arise the biodesulfurization (BDS) of fuel, a process that uses microorganisms which selectively oxidize sulfur compounds. This work studied the degradation of the sulfur substrates, dibenzothiophene (DBT), 4,6-dimethyl-dibenzothiophene (4,6-DMDBT), and commercial gas oil which are adsorbed onto inorganic supports, alumina, silica and sepiolite through *Rhodococcus rhodochrous* biodesulfurized bacteria.

The results shows that adsorption of sulfur compounds is affected by superficial properties of the supports, as size and acidic groups. The major activity of BDS observed in DBT, 4,6-DMDBT and gas oil was observed onto alumina, sílice and sepiolite respectively, which depends of interaction between supports and differents sulfur molecules and the adsorption capacity of bacterials. The major adsorption selectivity and BDS of DBT y 4,6-DMDBT was observed when alumina and sílice was used as adsorbent supports. The degradation of sulfured compounds adsorbed onto supports, can be considered an alternative methodology to HDS conventional process.

Introducción.

A nivel mundial cerca de un 85% de la energía utilizada proviene de los combustibles fósiles, y aproximadamente un 40% de este consumo se relaciona con la utilización de petróleo y sus derivados (IEA, 2010). En países desarrollados como Japón y Estados Unidos la energía utilizada que proviene de forma exclusiva del petróleo corresponde a un 43% y 37% respectivamente. En Chile, del suministro total de energía primaria, un 58% corresponde a petróleo, un 6% a gas natural y un 14% a carbón. (IEA, 2010).

Debido a la masiva utilización de combustibles derivados del petróleo (Alcántar y Cruz, 2011) ha sido necesaria la explotación de yacimientos petroleros cada vez más profundos, los cuales son ricos en compuestos aromáticos heterocíclicos sulfurados (Pemex, 2008).

El azufre es considerado el tercer elemento más abundante del petróleo luego del carbono y el hidrógeno, en concentraciones que pueden fluctuar entre 0,03% - 7,89% p/p (300 ppm a 78.900 ppm) (Moheballi y Ball, 2008; Soleimani y col., 2007). Este elemento contenido en el crudo se encuentra generalmente como azufre de tipo inorgánico, compuesto por pirita, azufre elemental y ácido sulfhídrico (H_2S); y por azufre de tipo orgánico correspondiente a las formas aromáticas o saturadas de tioles, sulfuros, disulfuros y tiofenos (figura 1). La porción de compuestos azufrados refractarios a la destilación del diesel se atribuye a compuestos tiofénicos como el dibenzotiofeno (DBT) y sus derivados alquilo en posición 4 y 6, tales como el 4-metil-dibenzotiofeno y el 4,6-dimetil-dibenzotiofeno (4,6-DMDBT). (Soleimani y col., 2007).

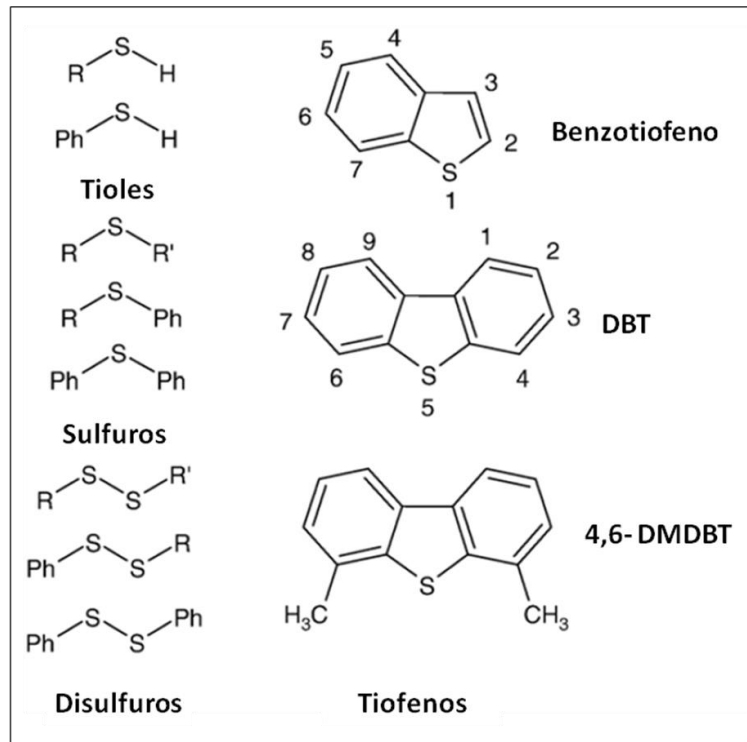


Figura 1: Estructura química de los compuestos azufrados típicos en los combustibles fósiles. (Imagen modificada de Soleimani y col., 2007).

Los compuestos sulfurados contenidos en el petróleo al combustionar liberan a la atmósfera grandes cantidades de dióxido de azufre (SO_2), el cual es reconocido como uno de los mayores contaminantes ambientales a nivel mundial, seguido por los compuestos nitrogenados que también resultan de la combustión del petróleo (Stanislaus y col., 2010; Fujikawa y col., 2006).

Los efectos provocados a la salud humana dependerán del tiempo de exposición, la concentración en que se encuentre el SO_2 y la vía de contacto que permitirá la absorción del producto (ATSDR, 1998). Por lo general, la vía respiratoria es la que se ve más afectada en presencia de compuestos azufrados, debido a que el SO_2 presente en la atmósfera es rápidamente absorbido por las

mucosas, pudiendo ocasionar bronco-constricción, enfermedades respiratorias tales como asma crónica y aguda, rinofaringitis, adelgazamiento de las mucosas, irritación e inflamación del tracto respiratorio superior entre otras, afectando mayoritariamente la morbilidad de personas susceptibles como niños y ancianos (Wegesser y Last., 2008). Además, puede producir alteraciones funcionales respiratorias por un mecanismo de hipersensibilidad o por irritación, generando cambios en las células ciliadas y daños crónicos (Stanislaus, 2010; Lazcano, 2003).

La “Agency for Toxic Substances and Disease Registry” en 1998 reportó varios seguimientos a trabajadores ocupacionalmente expuestos a SO_2 , y los resultados mostraron aumento en los niveles sanguíneos de metahemoglobina, efectos oxidativos en eritrocitos y aumento en las aberraciones cromosómicas e intercambio en las cromátidas hermanas de sus linfocitos. Similares efectos fueron descritos por Meng y col. (2004) al realizar estudios *in Vitro* en linfocitos humanos, demostrando experimentalmente la genotoxicidad y mutagenicidad de los compuestos derivados del SO_2 .

El SO_2 producido de la combustión del petróleo, por la acción de la luz solar se transforma en SO_3 y en presencia de la humedad del aire genera ácido sulfúrico (H_2SO_4). Este compuesto, forma parte de la conocida lluvia ácida, la cual ingresa al “ciclo del agua”, acidifica y contamina ríos y lagos afectando la flora y la fauna, generando además, condiciones corrosivas en el ambiente capaces de destruir pinturas y estructuras externas. (Acero y col., 2003; Gong y col., 2001).

Asimismo, el azufre contenido en la gasolina al combustionar y generar óxidos de azufre altera el funcionamiento y efectividad de los convertidores catalíticos en los motores de vehículos, aumentando la emisión de partículas contaminantes ambientales (Monticello, 2000).

Debido a los serios problemas ocasionados por el SO_2 actualmente las normativas internacionales pretenden reducir al mínimo las cantidades permitidas de azufre en los combustibles. En este sentido, Estados Unidos ha impuesto un máximo permitido entre 500 a 15 ppm de azufre para los diesel de carretera desde el año 2006 (Selvavathi y col., 2009; Kim y col., 2006), con intenciones de reducirlo a 15-10 ppm (diesel de muy bajo azufre) para el año 2010 (Stanislaus y col., 2010).

Métodos Tradicionales de Desulfuración de Combustibles Fósiles.

Con la finalidad de disminuir la cantidad de compuestos azufrados en el petróleo, los procesos más utilizados en el mejoramiento de la calidad del diesel son los de hidrotratamiento (Ojeda, 2004). Desde el punto de vista del volumen de los productos tratados el proceso de purificación más importante es la hidrodesulfuración (HDS) (Ojeda y col., 2008). En esta metodología el átomo de azufre del compuesto sulfurado es reducido a ácido sulfhídrico (H_2S) mediante la utilización de catalizadores metálicos como Molibdeno o Wolframio promovidos por Cobalto o Níquel, soportados sobre sólidos de alta área superficial (como alúmina, sílice o sepiolita), en condiciones de altas presiones de H_2 y altas temperaturas de reacción. Mediante el proceso de Claus el H_2S producido es

oxidado a azufre elemental, el cual puede ser utilizado en otros procesos industriales como la fabricación de ácido sulfúrico para fertilizantes, atomizadores fungicidas para plantas, pólvora, fósforos, algunos tipos de cemento y ungüentos medicinales entre otros. (Cazorla, 2006; Lazcano-Ferrat, 2001)

La mayoría de los componentes sulfurados que están contenidos en los combustibles fósiles son fácilmente removidos en el proceso normal de HDS. En este sentido las condiciones de trabajo de una planta de hidrotratamiento son generalmente de un rango de temperaturas entre 200 – 425 °C y de un rango de presiones de 150 – 250 psi de H₂. Sin embargo, debido a un actual agotamiento de las capas superiores del petróleo, las refinerías se han visto obligadas a trabajar con los denominados “fondos de barril”, en los cuales existen una mayor concentración de moléculas sulfuradas que resultan ser muy refractarias a los procesos normales de HDS. Si a lo anterior se suma el aumento de las regulaciones legales de protección ambiental (Fletcher, 2000; Pemex, 1998) que cada vez son más estrictas en lo relacionado a concentración máxima de SO₂ en el ambiente, ha fomentado la generación de un nuevo tipo de hidrotratamiento denominado “Hidrotratamiento profundo” (Ojeda, 2004; Blumberg y col., 2003; Maghsoudi y col., 2000). Estos procesos modifican las condiciones de trabajo utilizadas en los procesos convencionales como la utilización de aún mayores presiones y temperaturas de trabajo. No obstante, estas severas condiciones de reacción no sólo encarecen el proceso catalítico, sino que además, disminuyen la vida útil del catalizador y la calidad de los combustibles en lo que se refiere a su índice de octanaje (Ojeda, 2004). Todo esto ha llevado a la necesidad de

investigar nuevas alternativas tecnológicas que permitan encontrar metodologías que sean más efectivas y que a su vez puedan disminuir los gastos energéticos asociados al proceso de HDS.

Desulfuración por adsorción.

La desulfuración por adsorción es una tecnología utilizada para la remoción de moléculas sulfuradas y que se realiza usando condiciones de temperatura y presión ambiental. Esto permite reducir el gasto energético del proceso disminuyendo los costos de operación. Se ha descrito que mediante esta metodología, la concentración de azufre puede alcanzar valores bajo los 10 ppm en la gasolina, con mínimas pérdidas de octanaje, mínimo consumo de hidrógeno y mínimas pérdidas de volumen (Stanislaus y col., 2010). En general, en este proceso el adsorbente remueve selectivamente las moléculas sulfuradas presentes en el hidrocarburo, utilizando un reactor de lecho fluidizado de régimen continuo para mantener una constante remoción de estos compuestos (Li y col., 2009). La regeneración de este adsorbente se realiza de manera constante en un medio oxidante generando moléculas de SO_2 y CO_2 que son liberadas al ambiente (Li y col., 2009; Blumberg y col., 2003).

Se han realizado variadas investigaciones respecto a la adsorción en diferentes matrices, siendo una de las más utilizadas el carbón activo debido a su alta microporosidad (Seredyc, 2010; Rodríguez, 2002). Kumagai, (2009) investigó la remoción de DBT del kerosene por adsorción en cáscara de arroz a diferentes temperaturas y periodos de calentamiento. Este trabajo determinó que la mayor

capacidad de adsorción de DBT fue encontrada en la muestra de cáscara de arroz que tenía el más alto contenido de carbono y mínimo de cenizas. Asimismo, fue observado que los microporos eran tan efectivos en ese material como los mesoporos en lo referido a su capacidad de adsorción. También se ha estudiado la adsorción sobre carbón activo, alúmina activada y materiales adsorbentes a base de níquel con la finalidad de comparar la capacidad de adsorción y la selectividad de compuestos existentes en el diesel y moléculas modelo tales como naftaleno, metil-naftaleno, DBT, 4,6-DMDBT, indol y quinolina. Los resultados obtenidos arrojaron de forma general que para los tres soportes en estudio la selectividad de adsorción observada sigue el siguiente orden creciente: naftaleno metilado < DBT y 4,6-DMDBT < indol y quinolina, y una capacidad de adsorción mayor para el caso de carbón activo (Kim y col., 2006).

A pesar de los avances que se han realizado en este campo, aún hay varios problemas que se deben resolver. Cuando la selectividad del adsorbente es baja, éstos son fácilmente regenerados y reutilizados, pero a medida que se incrementa dicha selectividad los adsorbentes ya utilizados se vuelven más difíciles de regenerar para reutilizarlos. Al respecto, actualmente se utilizan dos métodos para la eliminación de los sustratos adsorbidos, los cuales son la extracción por solvente y la calcinación (Li y col., 2009). No obstante, ambos procesos son muy contaminantes y provocan la pérdida de los materiales adsorbentes. Blanco-Brieva (2010) demostró que soportes del tipo órgano-metálicos son excelentes materiales adsorbentes de compuestos cíclicos como el DBT y 4,6-DMDBT y que el tipo de interacción existente entre soporte y molécula varían dependiendo de la

temperatura aplicada en el proceso, eligiendo como óptima condición una temperatura cercana a la ambiental.

Existen algunos materiales que han sido utilizados como adsorbentes de contaminantes. Entre ellos se encuentra la sepiolita, un silicato natural formado por magnesio hidratado, la cual ha sido utilizada en el área de la industria ambiental (Alkan y col., 2005) como adsorbente de líquidos y olores, aislante térmico y en procesos de filtración, floculación y clarificación (Benesa, 2010). La sepiolita estructuralmente se encuentra formada por canales y bloques extendidos en la misma dirección de la fibra, debido a estas características y al alto valor de su área superficial ha sido objeto de estudios de adsorción de compuestos (Dinamarca y col., 2010; Ibacache, 2008; Alkan y col., 2007). A nivel superficial la sepiolita presenta una cantidad importante de grupos silanoles (Si-OH) (Gálvez, 2008), los que le confieren características interesantes desde el punto de vista de la interacción y la capacidad de adsorción de este material.

Otro sólido usado como adsorbente a nivel industrial debido a sus buenas propiedades de adsorción es la alúmina u óxido de aluminio, que ha sido utilizado para remover moléculas orgánicas desde soluciones acuosas, y soluciones acuosas multi-surfactantes (Wang y Kwak, 1999). Este sólido proviene de la bauxita, mineral que está compuesto principalmente por hidróxidos de aluminio, mezclas de óxido de silicio y otros minerales. Srivastav y col., (2009) realizaron un estudio de desulfuración por adsorción utilizando alúmina activada como adsorbente para remover DBT desde una solución en n-Hexano. El proceso de adsorción se realizó a diferentes concentraciones de DBT, durante 6 días en

condiciones de temperatura de 30 °C y a 120 rpm, determinando la concentración residual de azufre a diferentes tiempos de contacto. Los resultados demostraron que la superficie de la alúmina cuenta con una gran cantidad de grupos funcionales del tipo carbono-oxígeno que actúan de manera efectiva en la adsorción del DBT. Asimismo, se determinó que el proceso de adsorción es dependiente de factores como el tamaño de poro y la concentración inicial de DBT.

Métodos alternativos de tratamiento del petróleo: Biodesulfuración.

La desulfuración biocatalítica o biodesulfuración (BDS) es una metodología que utiliza microorganismos que sean capaces de degradar de manera selectiva, moléculas órgano-sulfuradas sin afectar la estructura básica carbonada característica del combustible (Maghsoudi y col., 2000), manteniendo la capacidad calorífica de éste. (Soleimani y col., 2007; Acero y col., 2003; Blumberg y col., 2003). Tal proceso se realiza bajo condiciones atmosféricas de presión y temperatura, siendo por lo tanto una tecnología innovadora para la remoción de los productos azufrados refractarios con un vasto campo de aplicación (Le Borgne y Quintero, 2003; Gray y col., 2003; Setti y col., 1997).

En el año 1953, Zobell realizó una de las primeras aproximaciones a la desulfuración biocatalítica del petróleo. Posteriormente Kodama en 1973 fue el primer investigador que realizó ensayos de BDS utilizando DBT como molécula tipo. Sin embargo, no se reportó la degradación selectiva de compuestos

orgánicos sulfurados hasta el año 1992 en un trabajo realizado por Kilbane con cepas del genero *Rhodococcus erythropolis*.

Es conocido que la presencia de azufre es uno de los requerimientos necesarios para que un microorganismo se desarrolle y lleve a cabo su actividad metabólica. A pesar de esto, sólo algunos microorganismos son capaces de obtener el azufre necesario a partir de la degradación de moléculas complejas como los tiofenos y dibenzotiofenos (DBT) (Dinamarca, 2010). Esta capacidad degradadora es dependiente de las enzimas y rutas metabólicas que el microorganismo este habilitado para seguir. Se ha descrito que la capacidad de metabolizar el DBT queda determinada por una secuencia de reacción de cuatro pasos (Figura 2), en los cuales se ven involucradas enzimas específicas para cada uno de ellos. Estas enzimas comprenden dos monooxigenasas citoplásmicas (DszA, DszC), una flavina reductasa (DszD) y una desulfurinasa (DszB) (Shavandi y col., 2008). En este mecanismo propuesto, la degradación metabólica del DBT genera como producto principal sulfitos que no necesitan procesos adicionales para su eliminación como los productos de la HDS. Los sulfitos generados son utilizados por la célula bacteriana para sintetizar proteínas y otras moléculas sulfuradas, y los hidroxibifenilos generados son compuestos lipofílicos excretados hacia el medio y por tanto vuelven a formar parte del combustible fósil (fase orgánica) (Monticello, 2000).

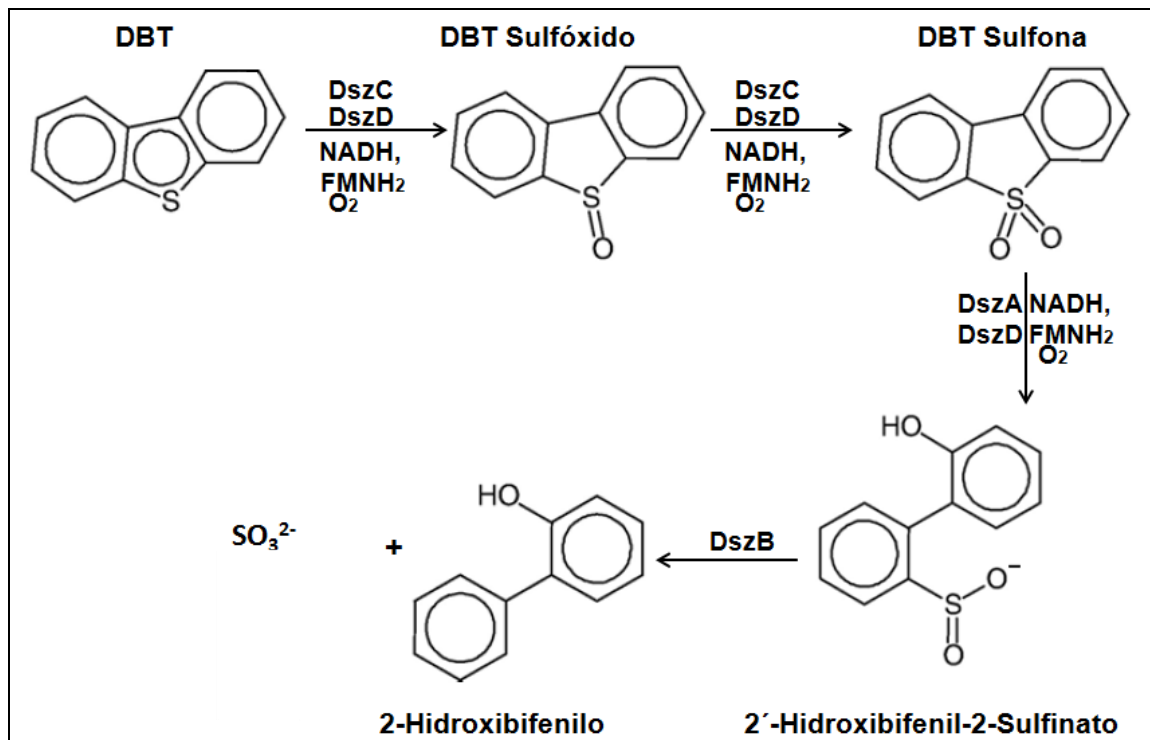


Figura 2: Degradación biológica del azufre del dibenzotiofeno mediante la ruta 4S. (Imagen modificada de Monticello, 2000).

Diferentes cepas bacterianas han sido utilizadas en los procesos de BDS, entre las cuales se encuentran principalmente *Rhodococcus erythropolis* y *Pseudomonas stutzeri*. (Honda y col., 1998; Hirasawa, y col., 2001). En este sentido, se ha demostrado que la cepa *Rhodococcus erythropolis* es capaz de desulfurar efectivamente las moléculas de DBT, y transformarlas en 2-Hidroxibifenilo bajo condiciones muy cercanas a las ambientales. (Olmo y col., 2005). En el 2002, Castorena y col., aislaron una bacteria perteneciente al género *Rhodococcus* desde suelos contaminados con petróleo, observando una disminución aproximada del 60% en la concentración de azufre total de un diesel hidrodesulfurado previamente. Los autores luego de realizar dicha investigación

concluyeron que el microorganismo era capaz de biodesulfurar efectivamente el 4,6-DMDBT.

Asimismo, se ha observado que en presencia de diferentes cepas bacterianas de *Pseudomona* el DBT es degradado generando diferentes metabolitos, entre los que se encuentran ácido benzoico y DBT-sulfona o 2-fenilfenol, lo que sugiere que los mecanismos posibles de degradación de DBT cambian según la cepa bacteriana que se utilice (Isea, 2002).

A pesar de la capacidad de algunas bacterias para degradar compuestos sulfurados, el acceso hacia éstos se dificulta debido a que tales sustratos se ubican en una fase hidrofóbica, distinta a la hidrofílica que contiene a las cepas biodesulfuradoras (Ibacache, 2008). En este sentido, se deben buscar alternativas innovadoras que permitan aumentar la biodisponibilidad de tales compuestos hacia los microorganismos degradadores de azufre.

La inmovilización de bacterias.

La utilización de bacterias inmovilizadas sobre soportes se presenta como una nueva alternativa en el desarrollo de los procesos de biotransformación (Pakula y Freeman, 1996). Bajo esta metodología se obtienen mejores condiciones de trabajo, optimizando la estabilidad operacional, facilitando la separación de los productos de reacción, disminuyendo el riesgo de contaminación, aumentando la duración del biocatalizador y la biodisponibilidad de los sustratos. Una de las primeras aplicaciones que se realizó en este campo fue

la utilización del método de encapsulamiento de bacterias soportadas en un material polimérico (Naito y col., 2001). La mayoría de los soportes utilizados en estas investigaciones son polímeros como alginatos o gelatinas, en los cuales la difusión de los productos metabólicos de las bacterias y la difusión de los sustratos hacia ellas, sucede a través de los poros formados en la matriz del polímero. Una de las desventajas de esta metodología es la utilización de sustratos de gran tamaño molecular que generan problemas estéricos y de difusión (Gálvez, 2008). En este contexto, Hou y col., (2005) estudiaron la biodesulfuración de DBT utilizando bacterias inmovilizadas del género *Pseudomonas stutzeri*-UP-1 aisladas de suelos contaminados y de aguas residuales. En este trabajo se determinó que el alginato de sodio es muy apropiado como material inmovilizante, y que la inmovilización aumenta la estabilidad y el tiempo de vida de las bacterias. En el año 2005 Li F. utilizando un sistema de inmovilización de bacterias en alginato de sodio estudia la desulfuración microbiana de gasolina utilizando *Mycobacterium goodii* X7B. En este trabajo se observó una disminución en la concentración de azufre en la muestra combustible en un valor cercano al 69 %.

En comparación a los métodos de encapsulamiento la inmovilización biocatalítica por adsorción sobre un material inorgánico permite eliminar los problemas de transferencia de masas y problemas estéricos (Lee, 2004). La biomodificación de soportes inorgánicos mediante la utilización de células adsorbidas incrementa el acceso de las bacterias de la fase hidrofílica a los compuestos sulfurados. Para lograr una adsorción efectiva el soporte inorgánico debe poseer características como tener una cierta porosidad y área específica

controlada, ser inerte frente al ataque biológico, insoluble en el medio de cultivo bacteriano y no ser tóxico para las bacterias. Además, debe poseer características que permitan a la célula mantener su actividad metabólica en la reacción biocatalítica (Dinamarca y col., 2010; Lee y col., 2004). Recientemente en una investigación realizada por Dinamarca y col. (2010) se estudió la adsorción de *Pseudomona Stutzeri* sobre cuatro diferentes soportes inorgánicos; sepiolita, sílice, titania y alúmina, los cuales poseen propiedades estructurales y fisicoquímicas distintas. Los resultados demostraron que la adsorción de *P. stutzeri* sobre la superficie de los sólidos está determinada por fuerzas de tipo electrostáticas y físicas, las cuales son dependientes de la naturaleza del soporte y del pH de trabajo. Además se encontró en todos los sistemas estudiados una directa relación entre el grado de adsorción de *P. stutzeri* y la actividad de BDS de gasoil, demostrando que una alta interacción entre la bacteria y el soporte permite una mayor biodisponibilidad de los sustratos orgánicos. La comparación de los diferentes soportes utilizados determinó que los sistemas que utilizaron Sílice y Sepiolita fueron los más activos, en las condiciones de reacción ensayadas.

Este trabajo tiene como objetivo principal estudiar la eliminación de dos sustratos sulfurados Dibenzotiofeno y 4,6-dimetil-dibenzotiofeno y de un gasoil comercial adsorbidos previamente sobre soportes inorgánicos de alúmina, sílice y sepiolita, mediante la utilización de bacterias biodesulfuradoras del género *Rhodococcus rhodochrous*.

Hipótesis y Objetivos.

I. HIPOTESIS

“Bacterias biodesulfuradoras del género *Rhodococcus rhodochrous* permitirán eliminar moléculas sulfuradas adsorbidas sobre materiales inorgánicos, mediante un proceso ambientalmente amigable”

II. OBJETIVOS

A. General:

Eliminar moléculas sulfuradas adsorbidas sobre soportes inorgánicos, utilizando bacterias biodesulfuradoras del género *Rhodococcus rhodochrous*.

B. Específicos:

- 1.- Determinar el tamaño de soporte óptimo de alúmina, sepiolita y sílice para la adsorción de DBT, 4,6-DMDBT y de un gasoil comercial.
- 2.- Estudiar la máxima capacidad de adsorción de DBT, 4,6-DMDBT y de un gasoil comercial, sobre alúmina, sepiolita y sílice.
- 3.- Verificar el grado de adsorción de DBT y 4,6-DMDBT sobre los tres soportes inorgánicos mediante medidas de Migración Electroforética (ME).
- 4.- Determinar la actividad de Biodesulfuración (BDS) de la cepa bacteriana *Rhodococcus rhodochrous* en la eliminación de DBT, 4,6-DMDBT y gasoil, adsorbidas sobre los tres soportes inorgánicos mediante técnicas cromatográficas
- 5.- Determinar la selectividad de adsorción de cada soporte inorgánico para los sustratos sulfurados DBT y 4,6-DMDBT mediante técnicas cromatográficas.
- 6.- Determinar la selectividad de actividad de la cepa *Rhodococcus rhodochrous* en la utilización de los sustratos sulfurados DBT y 4,6-DMDBT, adsorbidos sobre soportes inorgánicos.

Materiales y Métodos.

I. MATERIALES

A. Equipos:

- ⊖ Agitador Shaker Termorregulado Companion[®], modelo SK- 300.
- ⊖ Autoclave Huxley[®] Speedy, modelo HL – 340.
- ⊖ Balanza Analítica Mettler[®], modelo AE 163.
- ⊖ Centrífuga con refrigeración Eppendorf[®], modelo 5810R.
- ⊖ Centrífuga con refrigeración Heal Force[®], modelo Neofuge 15R.
- ⊖ Cromatógrafo Gaseoso Shimadzu[®], modelo GC-2010 con detector FID y columna capilar spb-5.
- ⊖ Desionizador de agua Heal Force[®], modelo NW Ultra Pure Water System.
- ⊖ Espectrofotómetro Thermo[®] modelo Génesis 10uv.
- ⊖ Freezer Whirpool[®], modelo WVG29.
- ⊖ Horno de inducción Leco[®] S-144DR con detector Infrarrojo.
- ⊖ Mechero Bunsen Fisher[®].
- ⊖ Mufla Naber[®], modelo N3 D2804 Lilenthal/Bremen.
- ⊖ Refrigerador Fensa Progress 3705 XF EUROSYSYSTEM[®].
- ⊖ Vórtex CIENTEC[®] Maxi Mix II, modelo 37600 mixer.
- ⊖ Zeta Meter, modelo ZM-77.

B. Materiales de laboratorio:

- ⊖ Asa de siembra en loop.
- ⊖ Botellas Duran Shott®
- ⊖ Cápsulas de porcelana.
- ⊖ Celdas de Espectrofotómetro.
- ⊖ Matraces erlenmeyer de volumen variable.
- ⊖ Micropipetas Labnet®, modelos p10, p20, p200, p1000 y p5000.
- ⊖ Mortero y pistilo de porcelana.
- ⊖ Placas de Petri desechables Greiner Bio-One®.
- ⊖ Probetas graduadas de 100 y 500 mL.
- ⊖ Puntas de micropipetas, p10, p20, p200, p1000 y p5000.
- ⊖ Tamices metálicos 10-16, 40-230.
- ⊖ Tubos Eppendorf®.
- ⊖ Tubos Falcon®.

C. Reactivos:

- ⊖ Alúmina: T-126 BASF área específica $200\text{m}^2\text{g}^{-1}$.
- ⊖ Sepiolita: $\text{Si}_{12}\text{O}_{30}\text{Mg}_8(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_4 \times 8\text{H}_2\text{O}$ 120NF Tolsa área específica $300\text{m}^2\text{g}^{-1}$.
- ⊖ Sílice: D11 – 10BASF área específica $80\text{m}^2\text{g}^{-1}$.
- ⊖ Sustratos sulfurados: Dibenzotiofeno, DBT (Merck®); 4,6-dimetil-dibenzotiofeno 4,6-DMDBT (Merck®); Gasoil, Refinería Aconcagua, Enap Chile.
- ⊖ Acetato de etilo (Merck®).

- ⊖ Ácido Clorhídrico HCl (Merck®).
- ⊖ Agua destilada.
- ⊖ Agua purificada.
- ⊖ Citrato de sodio (Merck®).
- ⊖ Cloruro de Amonio, NH_4Cl (Merck®).
- ⊖ Cloruro de Calcio, CaCl_2 (Merck®).
- ⊖ Cloruro de Cobre, CuCl_2 (Merck®).
- ⊖ Cloruro de Fierro tetrahidratado, $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (Merck®).
- ⊖ Cloruro de Magnesio, $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck®).
- ⊖ Cloruro de Manganeso, $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (Merck®).
- ⊖ Cloruro de Sodio, NaCl (Merck®).
- ⊖ Cloruro de Zinc, ZnCl_2 (Merck®).
- ⊖ Fosfato ácido de Potasio, K_2HPO_4 (Merck®).
- ⊖ Fosfato diácido de Potasio, KH_2PO_4 (Merck®).
- ⊖ Hexadecano (Merck®).
- ⊖ Molibdato de Sodio, Na_2MoO_4 (Merck®).
- ⊖ Succinato de Sodio (Merck®).
- ⊖ Wolframato de Sodio, Na_2WO_4 (Merck®).

II. MÉTODOS

A. Soportes en estudio.

Tres diferentes soportes obtenidos comercialmente y con probada capacidad de adsorción (Dinamarca M. A. y col., 2010) fueron utilizados en el proceso de adsorción de compuestos azufrados. Estos fueron:

Sílice (SiO_2) D11-10 BASF (área S_{BET} $80 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$)

Alúmina (Al_2O_3) T-126 BASF, (área S_{BET} $200 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$)

Sepiolita ($\text{Mg}_4\text{Si}_6\text{O}_{15}(\text{OH})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 120 NF Tolsa (área S_{BET} $300 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$)

B. Selección de rango de tamaño de partícula óptimo para la adsorción de moléculas sulfuradas.

Para la selección del rango de tamaño óptimo para la adsorción de moléculas sulfuradas se estudiaron dos rangos de tamaños de partículas, $425 \text{ um} - 63 \text{ um}$ (rango malla 40-230) y $1,18 \text{ mm} - 2,00 \text{ mm}$ (rango malla 10-16), los cuales se obtuvieron mediante un proceso de pastillado y posterior tamizado.

C. Adsorción de moléculas sulfuradas en los soportes en estudio.

Previo al proceso de adsorción de las moléculas sulfuradas los soportes fueron calcinados en una mufla por un período de 24 horas a $400 \text{ }^\circ\text{C}$ para eliminar la materia orgánica y las sustancias volátiles adsorbidas superficialmente, y posteriormente autoclavados para evitar contaminación biológica.

El proceso de adsorción se llevó a cabo en matraces de 50 mL utilizando un gramo de cada soporte y 10 mL de una solución de 100 ppm de DBT en hexadecano o 10 mL de una solución de 100 ppm de 4,6-DMDBT en hexadecano. Para el caso de gasoil se utilizó una muestra comercial que contenía 0,37 % en peso de azufre (Anexo 1).

Los matraces se ubicaron en un incubador con agitación orbital a una velocidad de 100 rpm para aumentar el contacto del soporte con las moléculas sulfuradas y a una temperatura de 26 °C. En el transcurso del proceso de adsorción fueron tomadas alícuotas de 500 uL de sobrenadante a cada sistema a los tiempos 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 26, 29, 32, 35, 48, 52 y 77 horas. La cuantificación de la concentración de DBT y 4,6 DMDBT fue realizada mediante Cromatografía Gaseosa (GC), modelo GC-2010 con detector FID y columna capilar spb-5, mientras que el análisis de azufre en gasoil fue realizado en un equipo Leco S-144DR con detector Infrarrojo. La cantidad de moléculas sulfuradas adsorbidas se obtuvo de la diferencia entre la concentración de solución inicial y la concentración remanente del sobrenadante.

D. Medidas de Migración Electroforética (ME).

Para la determinación de las medidas de ME previamente se adsorbieron 5 mL de soluciones de DBT y 4,6-DMDBT 100 ppm cada uno sobre 500 mg de alúmina de un rango de tamaño de partícula de 1,18 mm – 2,00 mm (rango malla 10-16), durante un periodo de 72 horas a 100 rpm y 26 °C. La medición

electroforética fue realizada un equipo Zeta Meter modelo ZM-77, usando 30 mg de muestra suspendida en 300 mL de una solución 10^{-3} M de KCl. El pH del medio fue ajustado con soluciones 0,2 M de HCl o 0,2 M de NaOH (Dinamarca y col., 2010).

E. Obtención y cultivo de los microorganismos biodesulfuradores.

En este trabajo se utilizó la cepa bacteriana biodesulfuradora *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 (ATCC 53968), la cual fue obtenida comercialmente en American Type Cell Collection (ATCC).

Este microorganismo fue crecido en 100 mL de medio de cultivo basal A (Magsoudi y col., 2000) utilizando citrato de sodio y succinato de sodio como única fuente de energía y carbono, y DBT como única fuente de azufre. Las condiciones de crecimiento fueron 30 °C en un incubador con agitación a 200 rpm por 72 hrs.

La composición del medio de cultivo A se muestra en la tabla 1:

Tabla 1: Composición del medio de cultivo.

Componente	Cantidad (mL) para un Litro de medio de cultivo
CaCl ₂	0,9
Dibenzotiofeno 0,0623M	1
MgCl ₂ x 6H ₂ O	5
Citrato de sodio 2% p/v	10
Solución Metal B	10
FeCl ₂ x 4H ₂ O	10
Succinato de Sodio 0,3M	100
Solución A	100
H ₂ O	763

La descripción de las composiciones de las soluciones A y metal B, mostradas en la tabla 1, se muestran en las tablas 2 y 3, respectivamente:

Tabla 2: Composición de solución A

Componente	Cantidad (g) para un Litro de solución A
NaCl	0,1
KH ₂ PO ₄	5
NH ₄ Cl	10
K ₂ HPO ₄	40

Tabla 3: Composición de solución Metal B

Componente	Cantidad (g) para un Litro de solución B
CuCl ₂	0,050
Na ₂ WO ₄	0,050
Na ₂ MoO ₄	0,100
ZnCl ₂	0,500
HCl	0,500
MnCl ₂	0,504

F. Ensayos biocatalíticos de biodesulfuración

Para los ensayos biocatalíticos de biodesulfuración inicialmente la cepa *R. rhodochrous* fue recolectada desde su medio de cultivo mediante centrifugación a 4000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y resuspendida en 5 mL de NaCl al 0,85%. Luego 1 mL de esta suspensión de células, cuantificadas mediante medidas de absorbancia a 600 nm (Goubin S., 2006), junto con el soporte determinado con el sustrato sulfurado adsorbido (DBT, 4,6-DMDBT o gasoil) fueron agregados a 10 mL de medio de cultivo sin suplementar, para tener una

razón gasoil/volumen de reacción de 1:10. La reacción se llevó a cabo por períodos de tiempo de 12, 24, y 48 horas a una temperatura de 26 °C y en un régimen de agitación de 100 rpm. Para la cuantificación de la actividad biodesulfuradora de DBT y 4,6-DMDBT fue separada la fase orgánica del medio de reacción mediante extracción con acetato de etilo en proporción 1:1 incluyendo el soporte y analizados por Cromatografía Gaseosa (GC) modelo GC-2010 con detector FID y columna capilar spb-5.

Para el caso del gasoil se realizó separación de fases mediante centrifugación del medio de reacción junto con el soporte a 13000 rpm por 45 minutos luego de lo cual la fase gasoil fue analizada en un equipo Leco S-144 DR con detector infrarrojo. La actividad biodesulfuradora en gasoil, se expresó como porcentaje de biodesulfuración (% BDS) según la siguiente fórmula:

$$\%BDS = (S_i - S_0) / S_0 \times 100$$

Donde, S_i es la concentración de azufre remanente luego de la reacción y S_0 es la concentración inicial de azufre en el gasoil.

G. Determinación de la selectividad de adsorción.

Para la determinación de la selectividad de adsorción un gramo de soporte fue adicionando a 5 mL de una mezcla de solución de 100 ppm formada por DBT y 4,6-DMDBT en hexadecano. El proceso de adsorción fue realizado a 26 °C a una agitación de 100 rpm por un período de 72 horas, durante el cual se extrajeron muestras cada 24 horas. La cuantificación de la concentración de DBT y

4,6-DMDBT adsorbida fue realizada mediante Cromatografía Gaseosa (GC) modelo GC-2010 con detector FID y columna capilar spb-5.

H. Determinación de la selectividad de BDS.

Para determinar la selectividad de BDS previamente fueron adsorbidos en cada soporte 10 mL de DBT de una concentración de 50 ppm y en forma paralela en los mismos soportes 10 mL de 4,6-DMDBT de una concentración de 50 ppm en forma separada. Obteniendo entonces para cada soporte dos sistemas con dos sustratos adsorbidos diferentes. Dicho proceso fue realizado a una temperatura de 26 °C, a una agitación de 100 rpm y por un período de tiempo de 72 horas. Luego de finalizar el periodo de adsorción los soportes con ambos sustratos adsorbidos (DBT y 4,6-DMDBT) fueron agregados a un medio de reacción que contenía 10 mL de medio de cultivo sin suplementar y 1 mL de la cepa *R. rhodochrous* cuantificadas mediante medidas de absorbancia a 600 nm para tener una razón gasoil/volumen de reacción de 1:10. La reacción se llevó a cabo por un período de tiempo de 72 horas a una temperatura de 26 °C y en un régimen de agitación de 100 rpm. Para la cuantificación de la actividad biodesulfuradora de DBT y 4,6-DMDBT fue separada la fase orgánica del medio de reacción mediante extracción con acetato de etilo en proporción 1:1 incluyendo el soporte y analizados por Cromatografía Gaseosa (GC) modelo GC-2010 con detector FID y columna capilar spb-5

Resultados.

A. Selección de rango de tamaño de partícula óptimo para la adsorción de moléculas sulfuradas.

Los resultados obtenidos en los ensayos de adsorción sobre los soportes en estudio, utilizando dos diferentes tamaños de partícula se muestran en las Tablas 1 y 2. En forma general, la comparación de ambos sistemas demuestra que existe una mayor adsorción de las moléculas sulfuradas DBT y 4,6-DMDBT, cuando se utiliza un tamaño de partícula de 1,18 mm – 2,00 mm (rango malla 10-16).

Para el caso de DBT, se puede apreciar que en los tres soportes en estudio no se observa una saturación de la molécula sulfurada durante las 12 horas de adsorción, cuando es utilizado un tamaño de partícula de 1,18 mm – 2,00 mm. A un tamaño menor de soporte se puede ver que la adsorción tiende a alcanzar un máximo sobre algunos soportes. Un comportamiento similar es observado en el sistema 4,6-DMDBT, no obstante la adsorción de este compuesto es menor a la observada en DBT, en ambos tamaños de partículas, observándose que a las 12 horas se alcanza la saturación en la mayoría de los soportes.

La comparación entre los diferentes soportes a un tamaño de partícula mayor, muestra que en el caso de DBT a las 12 horas la mayor adsorción ocurre sobre alúmina mientras que la menor sobre sílice. Para 4,6-DMDBT un comportamiento distinto es observado, siendo sepiolita el soporte que presenta una mayor adsorción.

Cuando ahora es comparada la adsorción de DBT y de 4,6-DMDBT sobre los diferentes soportes a un tamaño de partícula menor, no son apreciadas

diferencias significativas sobre los soportes alúmina y sepiolita, mientras que sobre sílice se observa una mayor adsorción de 4,6-DMDBT.

Tabla 1: Adsorción de DBT sobre los soportes, alúmina, sepiolita y sílice de diferentes tamaños de partículas.

Soporte	DBT adsorbido (ppm)		
	1h.	1,5h.	12h.
Alúmina 1,18 - 2,00 mm	33,71	55,07	62,03
Sepiolita 1,18 - 2,00 mm	7,74	15,32	46,43
Sílice 1,18 - 2,00 mm	18,50	22,83	30,67
Alúmina 425 – 63 um	2,92	3,88	4,76
Sepiolita 425 – 63 um	1,61	4,00	9,55
Sílice 425 – 63 um	1,50	3,89	5,04

Tabla 2: Adsorción de 4,6-DMDBT sobre los soportes, alúmina, sepiolita y sílice sobre diferentes tamaños de partículas.

Soporte	4,6-DMDBT adsorbido (ppm)		
	1h.	1,5h.	12h.
Alúmina 1,18 -2,00 mm	2,04	9,90	19,25
Sepiolita 1,18 -2,00 mm	25,00	31,52	32,89
Sílice 1,18 -2,00 mm	14,86	15,84	17,54
Alúmina 425 – 63 um	3,60	3,40	3,08
Sepiolita 425 – 63 um	N.D.	2,86	3,47
Sílice 425 – 63 um	12,3	12,4	N.D.

N.D.: Dato no determinado cromatográficamente

B. Adsorción de moléculas sulfuradas en los soportes en estudio.

En la figura 3 se puede observar la cinética de adsorción de DBT sobre alúmina, en donde la concentración adsorbida es expresada en ppm y el tiempo de adsorción en horas. En dicha figura es posible apreciar que a tiempos menores a 10 hrs existe un alto grado de adsorción de aproximadamente 20 ppm, mientras que a tiempos mayores tiende a mantenerse constante a valores cercanos a los 65 ppm. Al finalizar el tiempo de adsorción no fue observada una saturación del soporte.

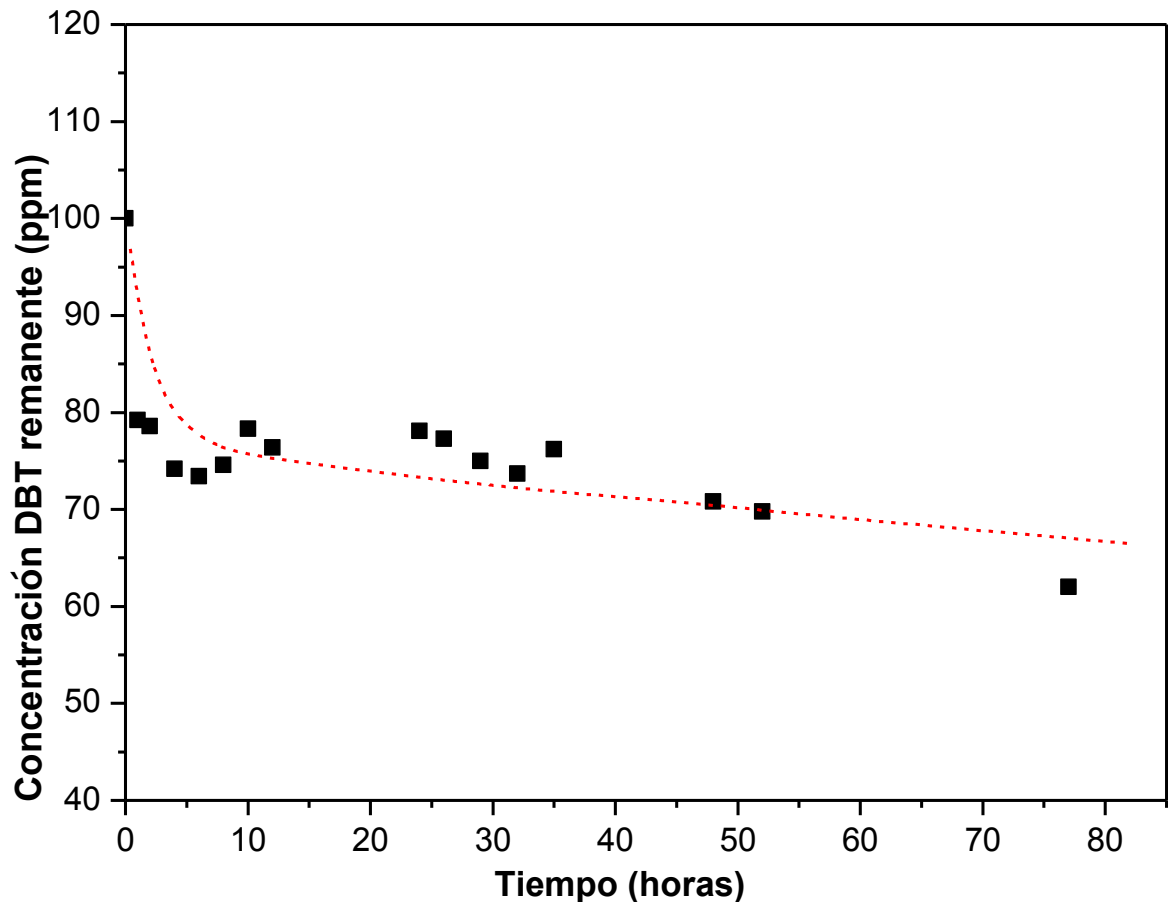


Figura 3: Capacidad de adsorción de DBT sobre alúmina.

La cinética de adsorción de 4,6-DMDBT sobre alúmina se puede observar en la figura 4. A diferencia del comportamiento sobre DBT la figura muestra que existe una adsorción lineal o constante durante todo el periodo estudiado, encontrándose 68 ppm adsorbidos a las 77 horas. No fue observado un plató de adsorción en el tiempo de adsorción ensayado.

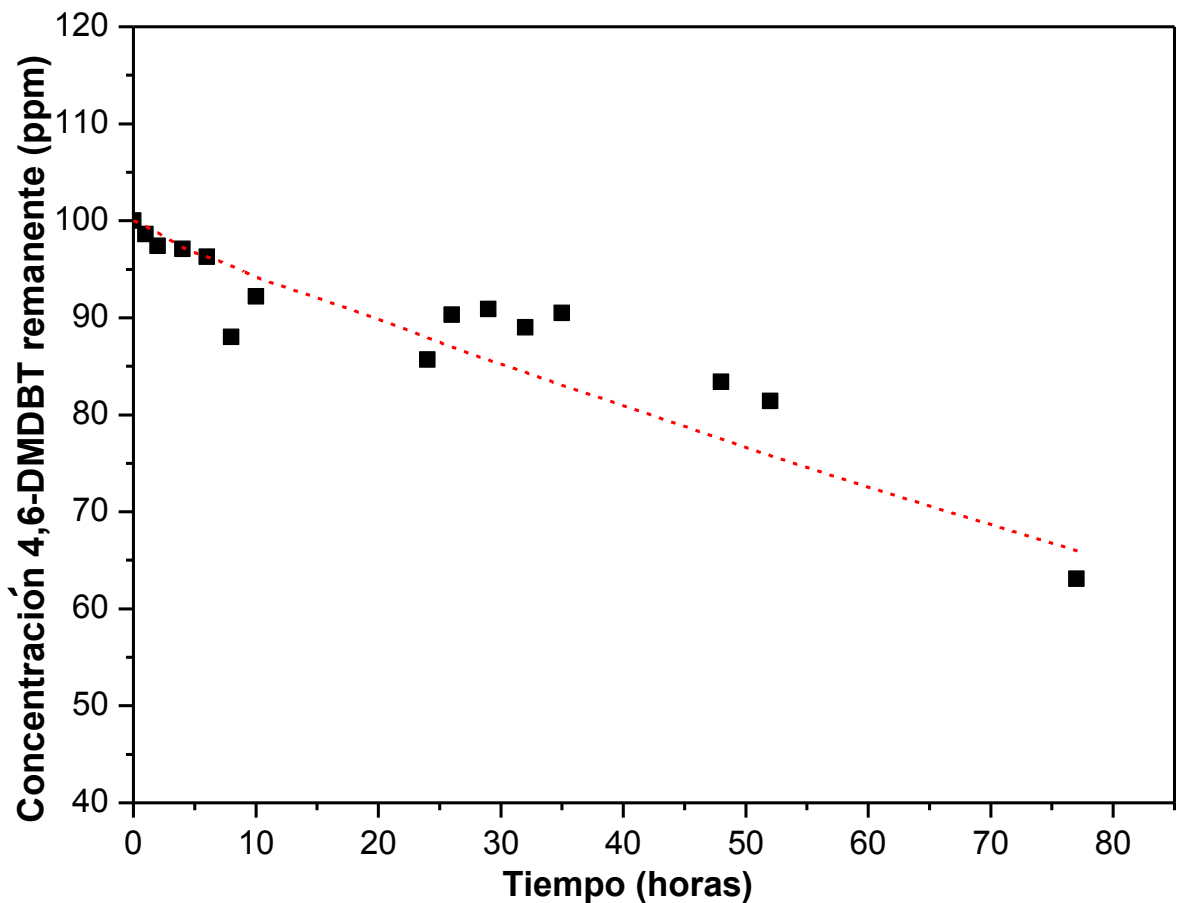


Figura 4: Capacidad de adsorción de 4,6-DMDBT sobre alúmina.

La figura 5 muestra la curva de adsorción de DBT sobre sepiolita a diferentes tiempos de ensayo. Al analizar la cinética se puede ver una disminución en el valor inicial de DBT hasta una concentración de 75 ppm aprox., a un tiempo de adsorción cercano a las 10 hrs. Posteriormente, a tiempo mayores la adsorción se mantiene constante alcanzando la máxima capacidad de adsorción del soporte.

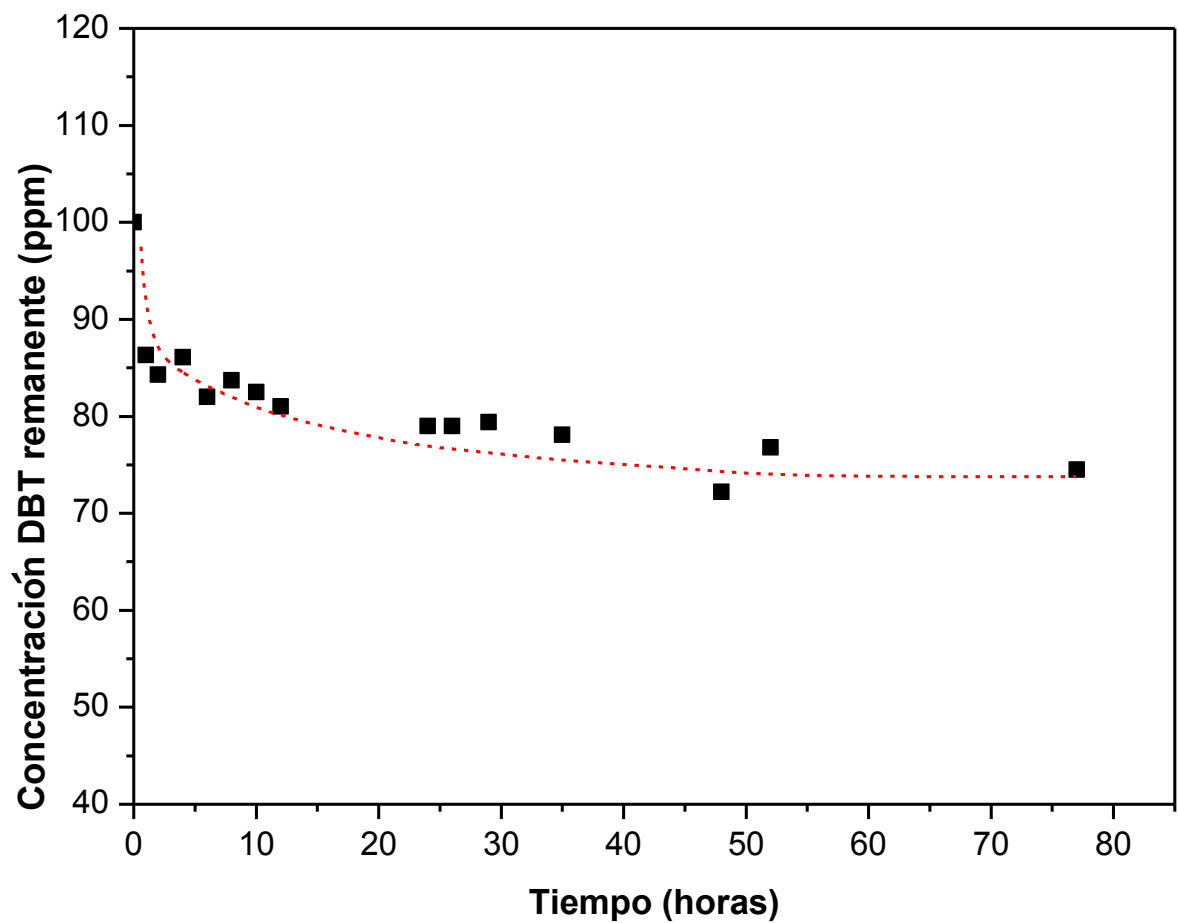


Figura 5: Capacidad de adsorción de DBT sobre sepiolita

La cinética de adsorción de 4,6-DMDBT sobre sepiolita se puede apreciar en la figura 6. Al igual que sobre alúmina se observa una adsorción lineal o constante durante todo el tiempo estudiado, encontrándose un valor cercano a los 65 ppm al final del período de adsorción. De manera similar a los sistemas donde fue adsorbido 4,6-DMDBT no se observó una saturación del soporte.

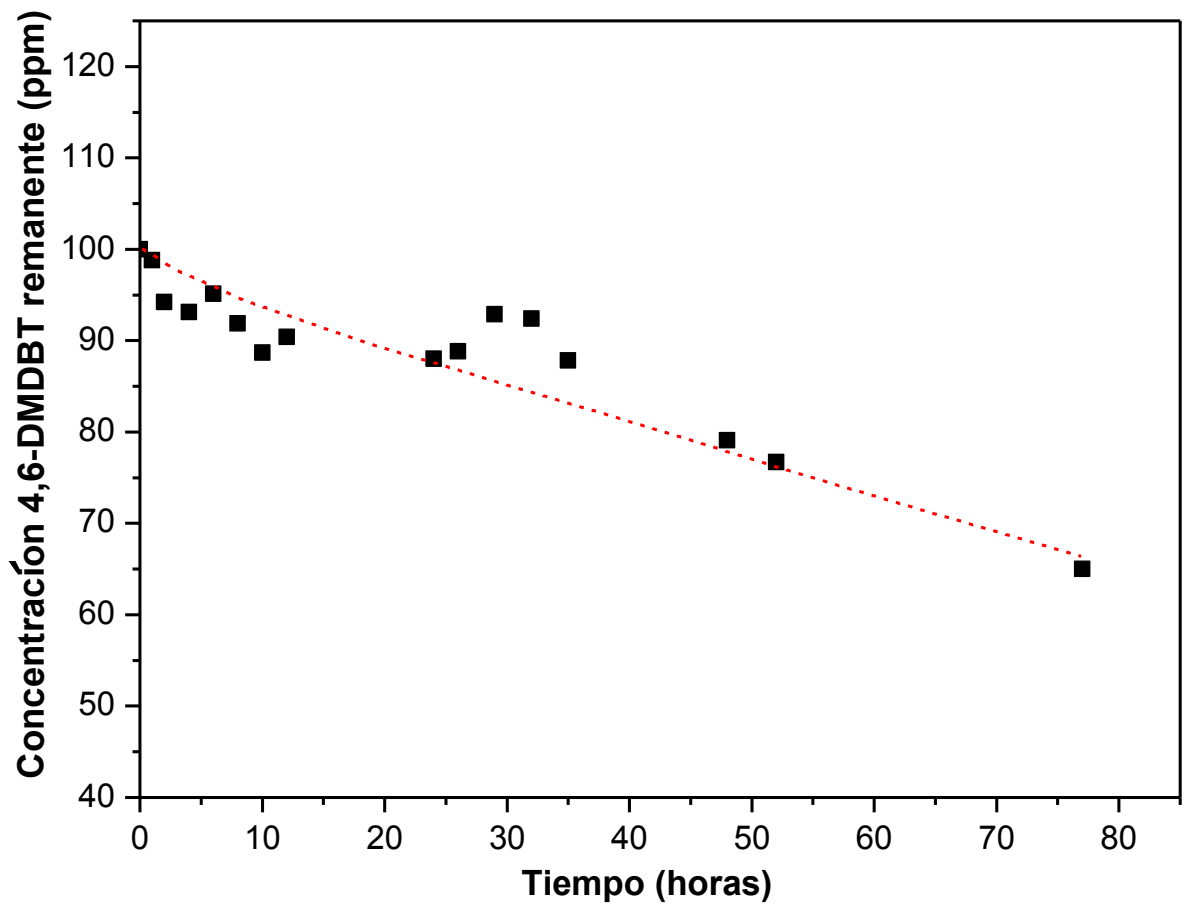


Figura 6: Capacidad de adsorción de 4,6-DMDBT sobre sepiolita.

En la figura 7 se observa la curva de adsorción de DBT sobre sílice. Un comportamiento similar a los soportes alúmina y sepiolita se puede ver en el caso de este soporte a tiempos menores. Es decir, una disminución en el valor inicial de DBT hasta una concentración menor (68 ppm) a un tiempo de adsorción cercano a las 10 hrs, y luego a tiempos mayores un valor constante de adsorción. No obstante el sistema alcanza su máximo de adsorción a una concentración de 65 ppm remanentes a un tiempo de 52 hrs.

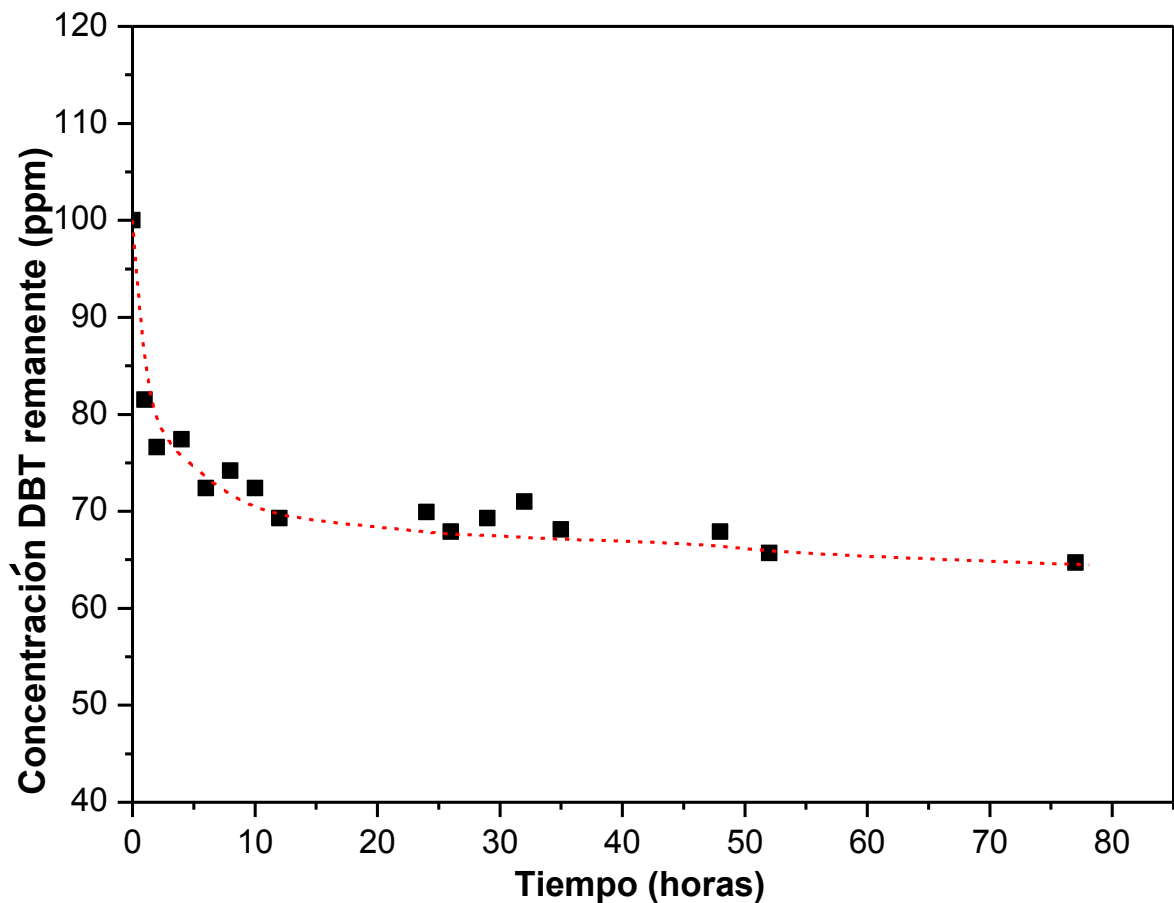


Figura 7: Capacidad de adsorción de DBT sobre sílice.

La figura 8 muestra la cinética de adsorción de 4,6-DMDBT sobre sílice. A diferencia del comportamiento en los otros dos soportes la tendencia de adsorción en sílice inicialmente es alta, cercana a los 20 ppm, y posteriormente se mantiene constante hasta alcanzar un valor cercano a los 70 ppm a las 77 hrs de adsorción. No obstante, no es observado un plató de adsorción en el soporte cuando 4,6-DMDBT es adsorbido sobre sílice, lo cual se asemeja al comportamiento de los otros dos soportes.

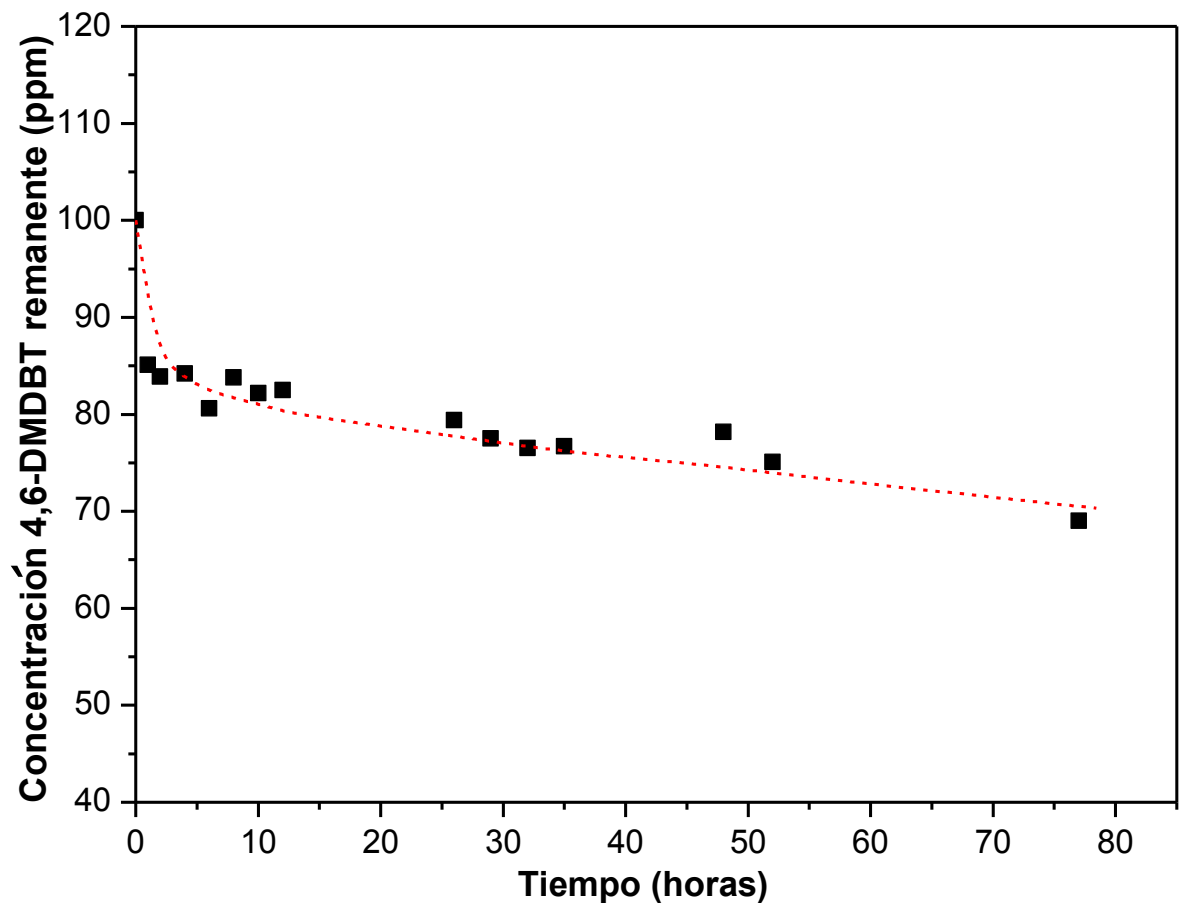


Figura 8: Capacidad de adsorción de 4,6-DMDBT sobre sílice.

La figura 9 muestra la curva de adsorción de gasoil sobre alúmina, con una concentración inicial de 3700 ppm (0,370%) de azufre. Se observa una curva de adsorción con una tendencia a la saturación a las 50 horas, y una disminución de la cantidad de azufre cercana a los 0,313% la cual se mantiene constante hasta las 77 horas.

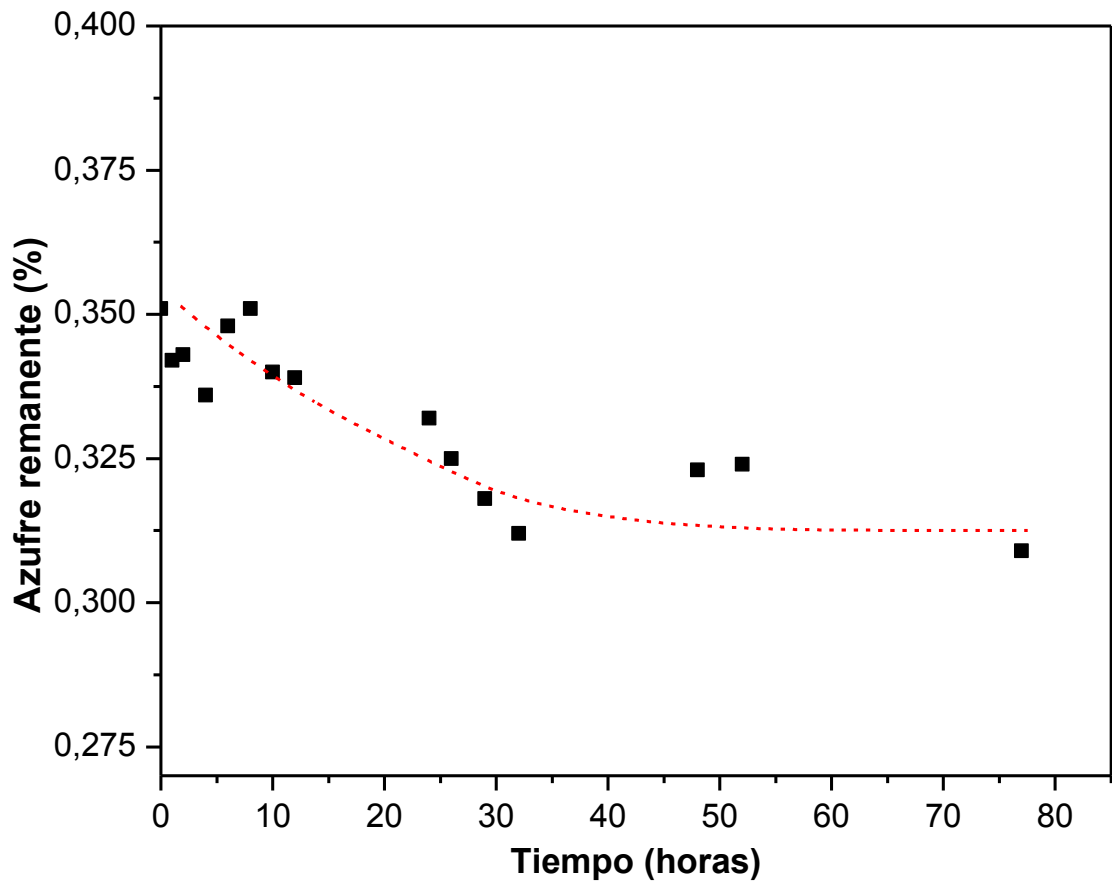


Figura 9: Curva de adsorción de gasoil sobre alúmina.

En la figura 10, se presenta la curva de adsorción de gasoil sobre sepiolita con una concentración inicial de 3700 ppm (0,370%) de azufre, en ella se puede observar una tendencia a la saturación a las 60 horas con una disminución de la cantidad total de azufre cercana a 0,308% la cual se mantiene constante hasta las 77 horas de adsorción.

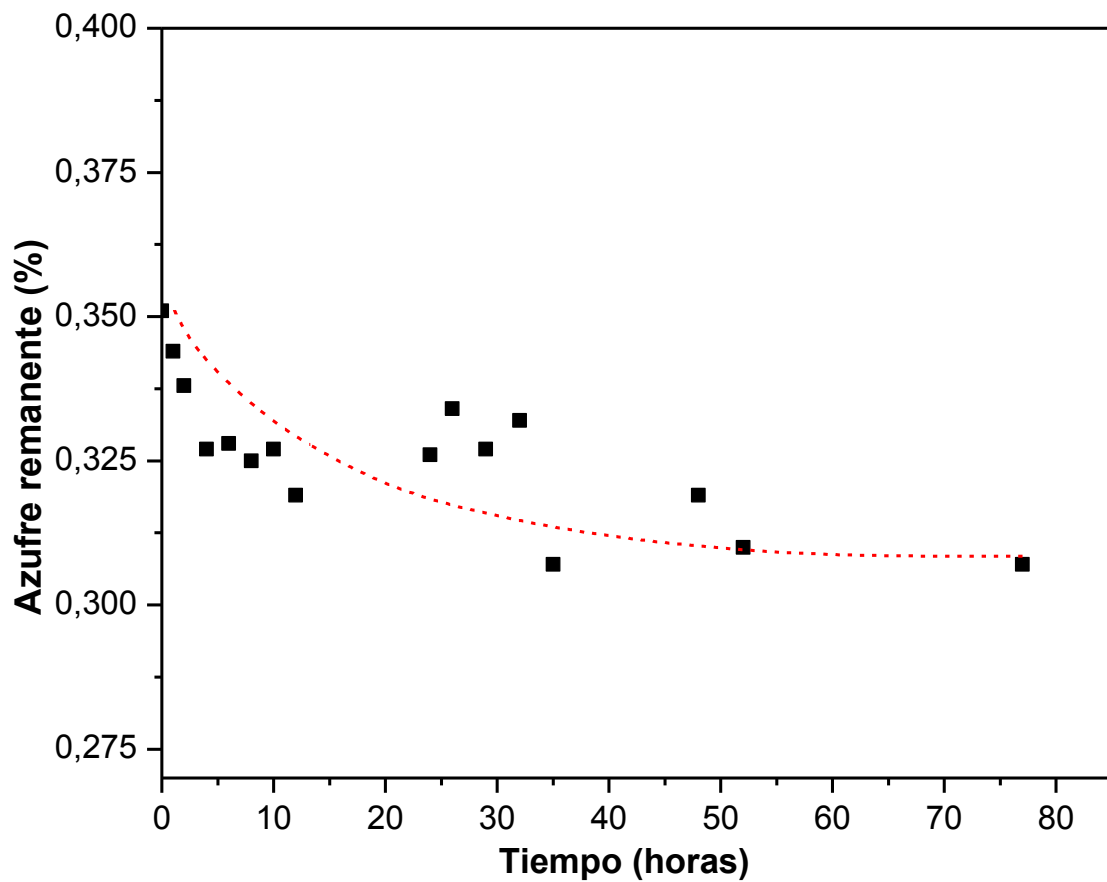


Figura 10: Curva de adsorción de gasoil sobre sepiolita.

En la figura 11 se muestra la curva de adsorción de gasoil sobre sílice con una concentración inicial de 3700 ppm de azufre total (0,370%), se observa una curva con tendencia a la saturación a las 48 horas con una disminución del azufre total de 0,322% la que se mantiene constante hasta las 77 horas.

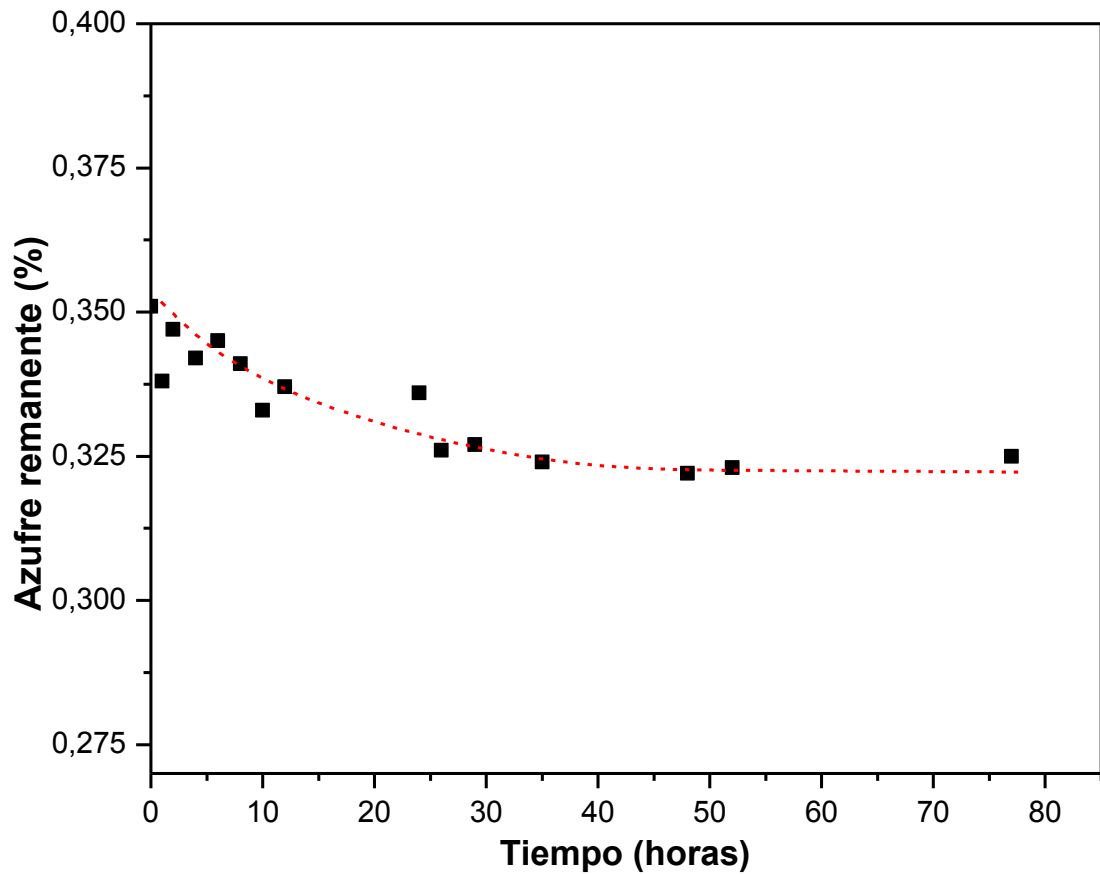


Figura 11: Curva de adsorción de gasoil sobre sílice

C. Medidas de Migración Electroforética (ME)

Los valores de los puntos de carga cero (PCC) de las medidas de ME de los sistemas DBT/alúmina, 4,6-DMDBT/alúmina y el valor del punto isoeléctrico (PIE) del soporte se presentan en la figura 12. Los resultados muestran que existe un desplazamiento del PIE de la alúmina hacia valores menores de pH, obteniendo un valor de PCC de 7,8 para ambos sistemas.

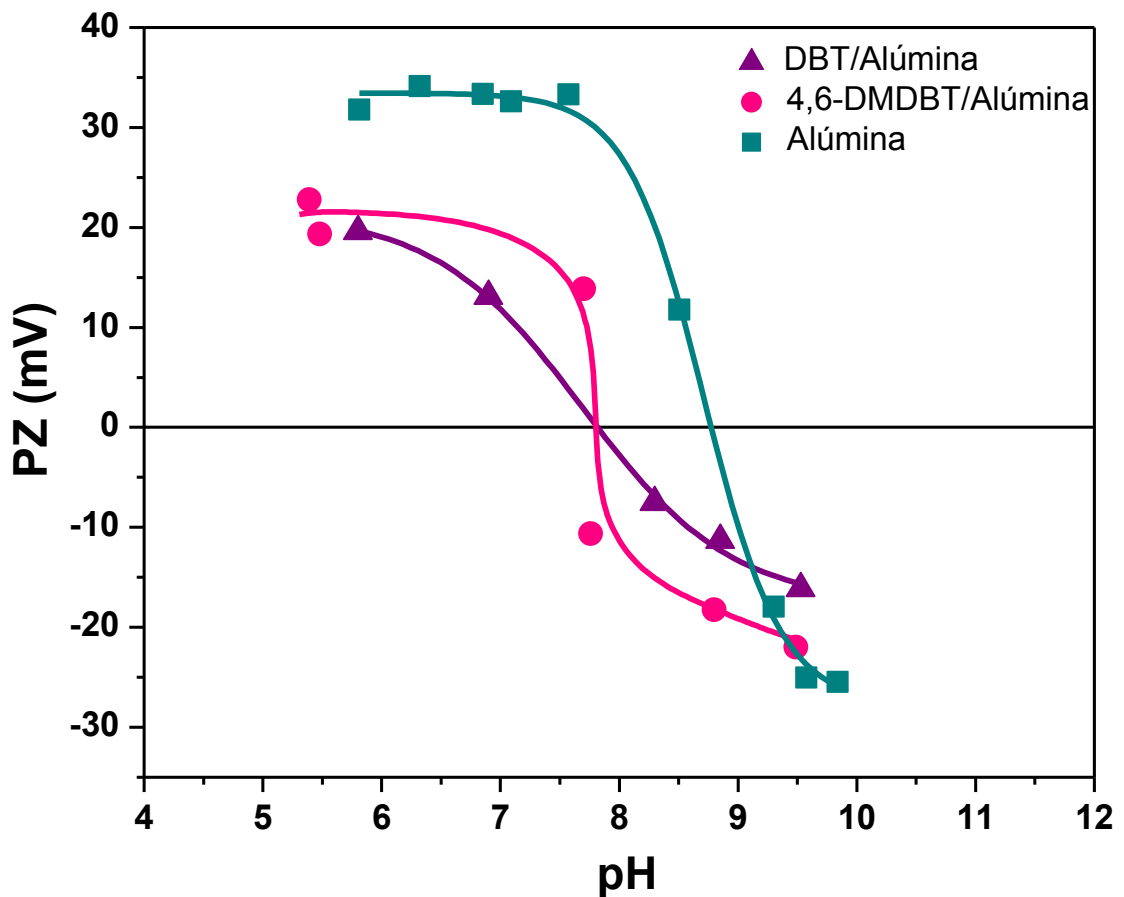


Figura 12: Resultados de la ME del soporte alúmina, y de los sistemas DBT/alúmina y 4,6-DMDBT/alúmina, luego de un periodo de 77 hrs de adsorción.

D. Ensayos Biocatalíticos de Biodesulfuración.

La comparación de los resultados de la actividad de BDS de DBT obtenidos a distintos tiempos de reacción y con distintos soportes, se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Comparación de actividad de BDS de DBT adsorbido sobre sílice, sepiolita y alúmina.

Sistema Biocatalítico	Actividad de BDS (ppm de DBT N°cel⁻¹h⁻¹) x 10¹¹		
	12 h.	24 h.	48 h.
DBT/Sílice	N.D.	9,29	1,90
DBT/Sepiolita	9,72	6,28	1,83
DBT/Alúmina	N.D.	18,60	N.D.

ND: Dato no determinado cromatográficamente.

Los resultados muestran que existe una disminución de la actividad de BDS con el tiempo de reacción, lo cual fue observado en la mayoría de los sistemas estudiados. La comparación de la actividad en función del sólido utilizado como material soporte de DBT, muestra que la mayor degradación del sustrato fue obtenida a las 24 hrs de reacción sobre alúmina, mientras que la menor actividad fue obtenida sobre sepiolita a las 48 hrs de reacción. No obstante, los valores de actividad de los tiempos menores y mayores de reacción del sistema DBT/alúmina no pudieron ser determinados cromatográficamente, por lo que su comparación sólo pudo efectuarse a un tiempo de reacción de 24 hrs. De forma similar no pudo ser determinada la actividad de BDS para el sistema DBT/sílice a las 12 hrs de reacción.

En la tabla 4 se muestra la comparación de los resultados de BDS de 4,6-DMDBT obtenidas a distintos tiempos de reacción y con distintos soportes.

Tabla 4: Comparación de actividad de BDS de 4,6-DMDBT adsorbido sobre sílice, sepiolita y alúmina.

Sistema Biocatalítico	Actividad de BDS (ppm de 4,6-DMDBT N°cel⁻¹h⁻¹) x10¹¹		
	12 h.	24 h.	48 h.
Sílice/4,6-DMDBT	24,1	6,72	1,11
Sepiolita/4,6-DMDBT	15,8	8,35	3,91
Alúmina/4,6-DMDBT	1,86	9,70	N.D.

N.D.: Dato no determinado cromatográficamente

De acuerdo a los resultados observados se puede apreciar que de manera similar al DBT, la actividad de BDS disminuye con el tiempo de reacción. El sistema más activo a las 12 horas fue el que utilizó sílice como soporte de 4,6-DMDBT, mientras que el menos activo fue sobre alúmina. No obstante, la mayor actividad de sílice sólo fue observada a tiempos menores de actividad, debido a que a mayores tiempos, la mayor degradación del sustrato sulfurado ocurre en los soportes sepiolita y alúmina.

La comparación de los resultados de la actividad de BDS de gasoil a distintos tiempos de reacción y con distintos soportes, se muestran en la tabla 5. Los resultados muestran que la actividad de BDS de gasoil se mantiene constante en el tiempo independiente del soporte en que se lleve a cabo. No obstante, se aprecia una diferencia entre la actividad dependiendo del soporte, resultando sepiolita el soporte donde se observa la mayor actividad, mientras que para el

caso de alúmina no fue determinado ningún grado de degradación de las moléculas sulfuradas del gasoil.

Tabla 5: Porcentaje de BDS de gasoil obtenida durante 12, 24 y 48 horas en los soportes sílice, sepiolita y alúmina.

Sistema Biocatalítico	Biodesulfuración porcentual N°cel⁻¹h⁻¹		
	12 h.	24 h.	48 h.
Sílice/gasoil	4,12	4,12	3,57
Sepiolita/gasoil	7,41	7,69	7,14
Alúmina/gasoil	0	0	0

E. Determinación de la selectividad de adsorción.

En la tabla 6 se aprecian los resultados de la comparación de la selectividad de adsorción de DBT y 4,6-DMDBT sobre los soportes en estudio, a distintos tiempos de adsorción. Los resultados muestran que en todos los adsorbentes existe una selectividad de adsorción orientada hacia el DBT en todo el intervalo de tiempo estudiado. No obstante, en el caso de los sistemas que utilizaron alúmina y sepiolita se observan mayores valores de selectividad a tiempos menores de adsorción, mientras que para el caso de sílice los valores se mantienen constantes. La comparación de los soportes demuestra que alúmina es el soporte que adsorbe una mayor cantidad de DBT en la mayoría de los tiempos estudiados.

Tabla 6: Comparación de selectividad de adsorción de DBT y 4,6 DMDBT sobre los soportes alúmina, sílice y sepiolita.

Soporte	ppm de DBT adsorbidos	ppm de 4,6-DMDBT adsorbidos	Relación DBT/4,6-DMDBT
Alúmina			
24 h.	23,5	2,4	9,80
48 h.	26,6	11,1	2,40
72 h.	22,2	3,5	6,34
Sílice			
24 h.	21,9	8,3	2,64
48 h.	28,9	10,8	2,68
72 h.	24,3	9,9	2,45
Sepiolita			
24 h.	24,1	3,2	7,53
48 h.	24,7	3,6	6,86
72 h.	25,3	8,3	3,05

F. Determinación de la selectividad de BDS.

Los resultados de selectividad de actividad de BDS a un tiempo de reacción de 24 hrs. se muestran en la tabla 7. En dicha tabla se puede observar que la selectividad de actividad de BDS es dependiente del soporte utilizado como adsorbente. En este sentido, cuando se utiliza sílice como soporte-adsorbente la selectividad de actividad es mayor para 4,6-DMDBT, mientras que lo contrario ocurre en alúmina, donde la selectividad es mayor para DBT. Para el caso de sepiolita, los valores de actividad también demuestran una mayor selectividad hacia DBT, aunque en menor grado que la alúmina.

Tabla 7: Comparación de la selectividad de actividad de BDS de DBT y 4,6-DMDBT en los soportes sílice, sepiolita y alúmina.

Sistema	Actividad de BDS (ppm S* N°cel ⁻¹ h ⁻¹) x10 ¹¹		Relación BDS DBT/4,6DMDBT
	DBT	4,6 DMDBT	
Sílice	0,397	1,15	0,35
Sepiolita	1,85	0,42	4,35
Alúmina	2,05	0,0896	22,86

* ppm S: ppm de DBT o 4,6 DMDBT

Discusiones.

A. Selección de rango de tamaño de partícula óptimo para la adsorción de moléculas sulfuradas.

Los resultados obtenidos en estos ensayos muestran que cuando es utilizado un rango mayor de partícula (1,18 mm – 2,00 mm), existe una alta adsorción de DBT y 4,6-DMDBT independientemente de la naturaleza superficial del soporte. La razón de tal comportamiento se puede deber a que en este rango de partícula, existe una mayor superficie de soporte capaz de interactuar con las moléculas sulfuradas de gran tamaño. La comparación de la capacidad de adsorción de los soportes estudiados por los sustratos azufrados, muestra que en los dos rangos de tamaños de partículas existe una mayor adsorción de DBT por sobre 4,6-DMDBT, cuando se compara a un tiempo de 12 hrs. Esto puede deberse al impedimento estérico causado por los dos grupos metilo del 4,6-DMDBT lo cual puede afectar su capacidad de adsorción.

En relación a las diferencias encontradas en los valores de adsorción de DBT y 4,6-DMDBT sobre los soportes, se puede sostener que éstas se relacionan con las distintas áreas superficiales y diferente naturaleza superficial del material. No obstante, tales diferencias deben ser analizadas en mayor detalle a tiempos de adsorción mayores que a 12 hrs, donde se haya alcanzado una posible saturación total de la superficie de cada soporte.

En el rango de 425um – 63um, se observan valores de adsorción menores a los obtenidos al utilizar un tamaño mayor de partículas. Tales diferencias están basadas en la menor superficie que presentan los soportes en este rango de trabajo para interactuar con los sustratos sulfurados.

B. Adsorción de moléculas sulfuradas en los soportes en estudio.

Los resultados de las curvas de adsorción de los sustratos sulfurados obtenidos concuerdan con los de selección de tamaño, ya que se observó en los tres soportes una mayor adsorción de DBT a un tiempo de 12 hrs de estudio. No obstante, a un periodo de tiempo de 77 hrs. fue observada una mayor cantidad de 4,6-DMDBT adsorbido en los tres soportes. Tal comportamiento sucede a pesar del impedimento estérico ocasionado por los grupos metilos de esta molécula en el proceso de adsorción. No obstante, estos grupos al ser donadores de electrones, pueden generar interacciones físicas entre ellos y los grupos -OH de la superficie del soporte, ocasionando una mayor adsorción.

El análisis de los resultados de adsorción de DBT demostró que el soporte que presenta la mayor saturación es sepiolita, seguido por sílice y finalmente alúmina. Tal comportamiento indica que la alúmina sería el soporte que puede adsorber una mayor cantidad de DBT. Como fue mencionado previamente las diferencias en el grado de adsorción están relacionadas con los valores de área superficial y con la presencia de cargas superficiales del soporte. En tal sentido, se puede observar que tanto la alúmina como sepiolita presentan los mayores valores de área, lo cual en el caso de sepiolita no sería proporcional a su capacidad de adsorción. Por otro lado, la comparación de la naturaleza química de los soportes indica que la alúmina presenta una mayor densidad de sitios ácidos Bronsted (-OH) en la superficie en comparación a sílice y sepiolita. No obstante, cuando se comparan los valores de fuerza ácida de los soportes estudiados, se puede observar que es mayor en el caso de la sílice y menor en el caso de la alúmina. En

tal sentido, es posible suponer que la mayor adsorción en alúmina estaría referida a una mayor cantidad de interacciones existente entre los grupos superficiales -OH con el DBT, mientras que para el caso de sepiolita y sílice la interacción a pesar de ser mayor en magnitud posee menos sitios de adsorción (Srivastav, 2009). El mayor grado de adsorción observado en sílice en comparación a sepiolita, está referido a su mayor valor de fuerza ácida, más que a los valores de área superficial.

En cuanto a la adsorción de 4,6-DMDBT no se presentan diferencias significativas en la adsorción sobre los diferentes soportes, o en la saturación de ellos, ya que los valores obtenidos fueron similares independiente de las diferencias superficiales de densidad o fuerza de sitios ácidos. Como fue discutido previamente tal comportamiento se relaciona exclusivamente con una alta interacción entre los grupos superficiales de los soportes y probablemente los grupos -CH₃- del 4,6-DMDBT debido a la nube electrónica que poseen. Si bien la cantidad de DBT en solución disminuye rápidamente en un comienzo, la concentración de 4,6-DMDBT adsorbida finalmente es mayor.

En el caso de utilizar gasoil como sustrato sulfurado, se encontró que las curvas de adsorción sobre los tres soportes son similares en cuanto a su adsorción y periodo de saturación. Esto indicaría que las diferencias superficiales características de los soportes, tales como área superficial, densidad y fuerza ácida de los grupos funcionales, parecen no generar grandes efectos en la adsorción de este compuesto. Debido a que el gasoil está compuesto de una mezcla de diferentes compuestos sulfurados su análisis se realizó en función de la

cantidad de azufre total. Por tal motivo no se puede describir con certeza qué moléculas se encuentran adsorbidas en el soporte. Sin embargo, se conoce que el DBT es el compuesto azufrado que se encuentra en mayor cantidad en el gasoil utilizado en este trabajo (Anexo 1), seguido por sus derivados metilados, lo que lleva a considerar que la mayoría de las moléculas adsorbidas podrían corresponder a DBT.

C. Medidas de Migración Electroforética (ME)

Los resultados de las medidas de ME muestran que mediante esta técnica es posible demostrar la existencia de adsorción de sustratos sulfurados sobre materiales adsorbentes, de manera complementaria a los análisis cromatográficos. En este sentido, el desplazamiento de los valores de PIE de alúmina demuestra que hubo un cambio superficial producto de la utilización de los sitios ácidos durante la adsorción. Este desplazamiento no fue relacionado con la incorporación de un adsorbato que pudiese provocar un cambio en los valores de PZ, sino más bien a una disminución de los sitios ácidos superficiales de la alúmina. Los valores de PCC obtenidos en ambos sistemas se relacionan principalmente con la concentración adsorbida de los sustratos, que en este caso fue similar (Concentración adsorbida de DBT 19 ppm y concentración adsorbida de 4,6-DMDBT 18 ppm, ambas sobre 500mg de soporte).

D. Ensayos Biocatalíticos de Biodesulfuración.

Los resultados de actividad de BDS observados para la degradación de DBT, muestran que existe inicialmente una disminución de la actividad con el tiempo de reacción. Este comportamiento se debe a la disminución de la concentración de los sustratos sulfurados presentes en el medio biocatalítico. La comparación de la actividad en función de los soportes, permite observar que es sobre alúmina donde existe la mayor degradación de DBT por parte de las bacterias, a un tiempo de reacción de 24 hrs, seguidos de sílice y sepiolita. Tal resultado se debe a las diferencias encontradas en los grados de adsorción de las moléculas sulfuradas. En este sentido, se encontró que sobre alúmina existía una mayor interacción entre DBT y los grupos superficiales, lo cual permite una mayor disponibilidad del sustrato para las bacterias biodesulfuradoras. La comparación a tiempos mayores no pudo ser realizada entre los tres soportes debido a que para el caso de la alúmina no se determinó su análisis cromatográfico. No obstante, la comparación entre los soportes sílice y sepiolita, a tiempos de 24 y 48 hrs de reacción, confirman que la actividad de BDS es dependiente del grado de interacción entre el soporte y la molécula sulfurada.

El análisis de los resultados de la actividad determinada para 4,6-DMDBT a las 12 horas de reacción muestra que estos decrecen en el orden de sílice, sepiolita y alúmina. Estos resultados sugieren que sobre sílice existiría una mayor interacción entre los sustratos sulfurados y el soporte lo que implicaría una mayor cantidad de 4,6-DMDBT adsorbido y disponible para ser biodesulfurado. No obstante, como no fue observada alguna diferencia significativa en los valores de

adsorción de este sustrato sobre los tres soportes, se sugiere que las diferencias en actividad estarán más bien relacionadas con la afinidad de las bacterias por la adhesión a los soportes y no por la adsorción de los compuestos sulfurados. En este contexto, ha sido demostrado que la mayor interacción fue determinada cuando se utilizaron sepiolita y sílice como materiales adsorbentes (Dinamarca y col. en el 2010). Tal comportamiento concuerda con los resultados de actividad encontrados a mayores tiempos de reacción, con excepción de la alúmina donde a un tiempo de 24 hrs aumenta su capacidad de degradación. Esto podría ser explicado debido a que a este tiempo de reacción permanecieron una mayor cantidad de moléculas sulfuradas sobre la superficie del sólido, lo cual permitió una mayor biodisponibilidad hacia las bacterias.

Los resultados de gasoil muestran que a pesar que se observaron valores de actividad de BDS estos son menores en comparación a los sustratos modelos como DBT y 4,6-DMDBT. Esta diferencia estaría relacionada con la variedad de compuestos que componen el gasoil. En este sentido, es posible que se necesitaran un número mayor de bacterias o un tiempo mayor de reacción, para llegar a valores de actividad superiores. No obstante, como este trabajo tiene por objetivo la comparación de distintos sistemas con diferente naturaleza, los valores obtenidos permiten encontrar diferencias que son significativas para su análisis. En este sentido, es posible observar que la mayor biodesulfuración se llevó a cabo en el sistema de gasoil sobre sepiolita a los tres tiempos de reacción ensayados, disminuyendo en un 7% la cantidad de azufre existente. Por otro lado sílice, si bien

logra una biodesulfuración efectiva, alcanza valores cercanos al 5%, mientras que en alúmina no se observa actividad de BDS de gasoil.

Los resultados sugieren que las diferencias superficiales de los soportes utilizados influyen en la actividad biodesulfuradora bacteriana, tal como lo fue planteado anteriormente. En este contexto, las bacterias tienen una mejor adherencia sobre sepiolita que sobre sílice, lo que explicarían las diferencias encontradas en los valores de actividad. Si bien es cierto, la disminución de la capacidad de BDS observada en los sustratos sulfurados fue establecida sobre la base de disminución de su concentración, no es posible descartar una disminución en los valores de actividad metabólica de las bacterias adheridas.

E. Determinación de la selectividad de adsorción.

Los resultados de selectividad de adsorción muestran que existe una afinidad por parte de los tres soportes a la adsorción de DBT. Tal comportamiento puede deberse a que cuando existe una adsorción competitiva, en donde un soporte se encuentra en presencia de DBT y 4,6-DMDBT conjuntamente, existe una mayor repulsión entre las moléculas de 4,6-DMDBT por causa de la presencia de los grupos metilos. Asimismo, DBT es un compuesto que es mucho más soluble en hexadecano que 4,6-DMDBT, por lo que la disolución de ambos compuestos en un mismo solvente disminuiría su capacidad de disolución. El alto valor de selectividad encontrado en el soporte alúmina se relaciona con la mayor interacción de este soporte con el DBT.

Los soportes sílice y sepiolita serían más eficaces en la adsorción de DBT y 4,6-DMDBT en forma competitiva, ya que no presentan una selectividad tan definida hacia uno de los compuestos como en el caso de la alúmina.

F. Determinación de la selectividad de BDS.

Las diferencias encontradas en la selectividad de BDS muestran que los valores están muy relacionados con el grado de interacción entre el soporte y la molécula sulfurada. En este sentido, es posible observar que el mayor valor de selectividad hacia DBT fue obtenido sobre alúmina, mientras que la mayor selectividad hacia 4,6-DMDBT fue obtenida en sílice. Esto permite suponer que la actividad de BDS de DBT depende de la cantidad de sitios activos, mientras que en el caso de 4,6-DMDBT depende de la fuerza ácida. En el caso de DBT, el valor de selectividad obtenido permite suponer que este soporte tiene también un valor mayor de fuerza ácida más que de sitios activos.

Conclusiones.

- ⊕ La comparación de los diferentes tamaños de partículas demuestra que utilizando un rango de 1,18 – 2,00 mm existe una mejor adsorción de los compuestos azufrados que a un tamaño menor, debido a una mayor superficie de contacto disponible.
- ⊕ La adsorción de DBT demostró ser dependiente del soporte utilizado, encontrándose la mayor concentración sobre alúmina. En el caso de 4,6-DMDBT y de gasoil su adsorción fue similar en todos los soportes en estudio.
- ⊕ La medición de ME demuestra que es posible determinar la existencia de sustratos sulfurados adsorbidos sobre soportes inorgánicos, de manera complementaria a las medidas cromatográficas.
- ⊕ La mayor actividad observada de BDS de DBT, 4,6-DMDBT y gasoil sucede sobre los soportes alúmina, sílice, y sepiolita respectivamente.
- ⊕ Las diferencias encontradas en los valores de actividad de BDS son dependientes de la interacción del soporte con las distintas moléculas azufradas y de la capacidad de adsorción de las bacterias.
- ⊕ En presencia de ambos sustratos la mayor selectividad de adsorción y biodesulfuración de DBT y 4,6-DMDBT fue obtenida cuando fueron utilizados alúmina y sílice como soportes, respectivamente.

- ⊕ Los resultados demuestran que la biodesulfuración por adsorción en soportes inorgánicos, presenta una alternativa innovadora, para ser utilizada en la eliminación de moléculas sulfuradas adsorbidas en los procesos de Desulfuración por Adsorción.

Bibliografía.

Acero J.; Berdugo C.; Mogollón L. (2003). Biodesulfurization process evaluation with a *Gordona rubropertinctus* strain. *Ciencia, Tecnología y Futuro* 4: 43-54.

Alcántar F. y Cruz M.J. (2011). Análisis de la distribución de azufre en productos, emisiones de SO_x y la recuperación del mismo en el sistema nacional de refinación. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental* 27: 153-163.

Alkan M.; Tekin G.; Namli H. (2005). FTIR and zeta potential measurements of sepiolite treated with organosilanes. *Microporous and Mesoporous Materials*. 84, 75-83.

Alkan M.; Demirbas Ö.; Dogan M. (2007). Adsorption kinetics and thermodynamics of an anionic dye onto sepiolite. *Microporous and Mesoporous Materials*. 101. 388-396.

BENESA-Bentonitas Especiales, S.A. (2010). España. <http://www.benesa.com> (página visitada en Julio 2011)

Blumberg KO.; Walsh MP.; Pera C. (2003). Low sulfur gas-oline and diesel, the key to lower vehicle emissions. *Seminarios Petróleo Internacional*. The International Council on Clean Transportation, 66.

Castorena G.; Suárez C.; Valdez I.; Amador G.; Fernández L.; Le Borgne S. (2002). Sulfur-selective desulfurization of dibenzothiophene and diesel oil by newly isolated *Rhodococcus sp.* strains. *FEMS Microbiol Lett* 215: 157-61.

Cazorla D.; Ruiz A.; y Acosta M. (2006). Tratamiento tópico de la escabiosis con azufre precipitado en petrolato, en escolares de Coro, Estado Falcón, Venezuela. *Parasitol Latinoam* 61: 74 – 81

Denome S.; Oldfield C.; Nash J.; Young K. (1994). Characterization of the Desulfurization Genes from *Rhodococcus sp.* Strain IGTS8. *Journal of Bacteriology* 176: 6707-6716.

Dinamarca MA.; Ibacache-Quiroga C.; Baeza P.; Galvez S.; Villarroel M.; Olivero P.; Ojeda J. (2010). Biodesulfurization of gas oil using inorganic supports

biomodified with metabolically active cells immobilized by adsorption. *Bioresource Technology* 101: 2375-2378

Fujikawa T., Kimura H., Kiriya K. (2006). Development of ultradeeps HDS catalyst for production of clean diesel fuels. *Catalyst Today* 111: 188-193.

Gálvez, SA. Estudio de la adsorción de bacterias sobre soportes inorgánicos, y su influencia sobre la actividad de biodesulfuración de dibenzotiofeno y gasoil. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, 2008.

Gong H.; Linn SW.; y Terrell S. (2001). Anti-Inflammatory and lung function effects of Montelukast in asthmatic volunteer exposed to Sulfur Dioxide. *American college of physicians* 119: 402-408.

Goubin S.; Huaying Z.; Jianmin X.; Guo C.; Wangliang L.; y Huizhou L. (2006). Biodesulfurization of hidrodesulfurized diesel oil with *Pseudomonas delafieldii* R-8 from high density culture. *Biochemical Engineering Journal* 27: 305-309

Gray K.; Mrachko G.; y Squires C. (2003). Biodesulfurization of fossil fuels *Current opinion in Microbiology*. 6: 229-235

Hirasawa K.; Ishii Y.; Kobayashi M.; Koizumi K.; y Maruhashi K. (2001). Improvement of desulfurization activity in *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 by genetic engineering. *Biosci. Biotech. Biochem.* 65: 239-246.

Honda H.; Sugiyama H.; Saito I.; y Kobayashi T. (1998). High cell density culture of *Rhodococcus rhodochrous* by pH-stat feeding and dibenzothiophene degradation. *J. Ferment. Bioeng.* 85: 334-338.

Hou Y.; Kong Y.; Yang J.; Zhang J.; Shi D.; y Xin W. (2005). Biodesulfurization of dibenzothiophene by immobilized cells of *Pseudomonas stutzeri* UP-1" *Fuel* 84: 1975-1979.

Ibacache C.J. Aplicaciones biotecnológicas de los biosurfactantes: Evaluación de la utilización de biosurfactantes sobre desulfuración biocatalítica. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, 2008.

Isea D.; Herrera L.; Cárdenas C.; Prieto A.; Delgado J.; Briceño B. (2002). Biodegradación del dibenzotiofeno por bacterias *Pseudomonas* aisladas de campo boscón. Centro de Investigación Facultad ingeniería, Universidad del Zulia 8: 107-115.

Kim JH.; Ma X.; Zhou A.; y Song C. (2006). Ultra-deep desulfurization and denitrogenation of diesel fuel by selective adsorption over three different adsorbents: A study on adsorptive selectivity and mechanism. *Catalysis Today* 111: Issues 1-2, 74-83.

Kumagai S.; Enda T.; Shimizu Y.; Toida Y. (2009). Removal of dibenzothiophenes in kerosene by adsorption on rice husk activated carbon. *Fuel* 88: 1975-1982

Lazcano R. Toxicología Clínica. Akadia. Buenos Aires, 9,45pp.

Lazcano-Ferrat I. (2001). El papel del azufre y el potasio en la producción de hortalizas. *Informaciones Agronómicas* 4: 6.

Le Borgne S.; y Quintero R. (2003). Biotechnological processes for the refining of petroleum. *Fuel processing Technology* 81: 155-169.

Lee J.; Han S.; y Hyeon T. (2004). Síntesis of new nanoporous carbon material using nanostructured silica material as templates. *J. Mater. Chem.* 14: 478.

Li F.; Xu P.; Feng J.; Meng L.; Zheng Y.; Luo L.; y Ma C. (2005). Microbial Desulfurization of Gasoline in a *Mycobacterium goodii* X7B Immobilized-Cell System. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 276-281.

Li W.; Tang W.; Liu Q.; Xing J.; Li Q.; Wang D.; Yang M.; Li X.; y Liu H. (2009). Deep desulfurization of diesel by integrating adsorption and microbial method. *Biochemical Engineering Journal* 44: 297-301.

Maghsoudi S.; Kheirilomoom A.; Vossoughi M.; Tanaka E.; y Katoh S. (2000). Selective desulfurization of dibenzothiophene by newly isolated *Corynebacterium* sp. strain P32C1. *Biochemical Engineering Journal* 5: 11-16.

Meng Z.; Qin GH.; Zhang B.; Bai JL. (2004) DNA damaging effects of sulfur dioxide derivatives in cells from various organs of mice. *Mutagenesis* 19: 465-468.

Mohebbali G and Ball AS. (2008) Biocatalytic desulfurization (BDS) of petrodiesel fuels. *Microbiology* 154: 2169–2183

Monticello D. (2000). Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. *Current Opinion in Biotechnology* 11: 540-546.

Naito M.; Kawamoto T.; Fujino K.; Kobayashi M.; Maruhashi K.; Tanaka A. (2001). Long-term repeated biodesulfurization by immobilized *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 55: 374.

Ojeda J. Estudio de nuevos catalizadores para la Hidrodesulfuración e Hidrodesnitrogenación de Gasoil; El papel del Hidrógeno Spillover. Tesis Doctoral en Química. Universidad de Santiago de Chile, Santiago, 2004.

Ojeda J.; Escalona N.; Fierro JLG.; Lopez A.; Gil-Llambías FJ. (2005). Effect of the preparation of $\text{Re}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ catalysts on the HDS and HDN of gas oil. *Applied catalysis A: General* 281: 25-30.

Ojeda J.; Escalona N.; Palacios J M.; Yates J.; Fierro J.; López-Agudo A.; Gil-Llambías J. (2008). Promoter effect of Co on the catalytic activity of $\text{Re}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ catalyst for the HDS and HDN of gasoil. *Applied Catalysis A: General* 350: 6-15.

Olmo C.; Santos V.; Alcon A.; Garcia-Ochoa F. (2004). Production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulfurization: influence of operational conditions. *Biochemical Engineering Journal* 22: 229-237

Onaka T.; Konishi J.; Ishii Y.; y Maruhashi K. (2001). Desulfurization characteristic of thermophilic *Paenibacillus* sp. Strain A 11-2 against asymmetrically alkylated dibenzothiophenes. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92: 193-196

Pakula R. y Freeman A. (1996). A new continuous biofilm bioreactor for immobilized oil degrading filamentous fungi. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 20-25.

PEMEX, petróleos Mexicanos, Anuario Estadístico. (2008). <http://www.pemex.com> (página visitada Julio 2011)

Rodríguez F. (2002). Eliminación de Contaminantes del Aire con Carbones Activados. Laboratorio de Materiales Avanzados. Publicaciones de la Universidad de Alicante. España.

Selvavathi V.; Chidambaram V.; Meenakshisundaram A.; Sairam B.; Sivasankar B. (2009). Adsorptive desulfurization of diesel on activated carbon and nickel supported system. *Catalysis today* 141:99-102.

Seredyc M.; Khin M.; Bandos T. (2010). Enhancement in Dibenzothiophene Reactive Adsorption from Liquid Fuel via Incorporation of Sulfur Heteroatoms into the Nanoporous Carbon Matrix. *ChemSusChem* 4: 139-14.

Setti L.; Lanzarini G.; y Pifferi P. (1997). Whole cell biocatalysis for an oil desulfurization process. *Fuel processing technology* 52: 145-153.

Shavandi M.; Sadeghizadeh M.; Zomorodipour A.; y Khajeh K. (2008). Biodesulfurization of dibenzothiophene by recombinant *Gordonia alkanivorans* RIPI90A. *Bioresource Technology* 100: 475-479.

Soleimani M.; Bassi A.; y Margaritis A. (2007). Biodesulfurization of refractory organic sulfur compounds in fossil fuels. *Biotechnology Advances* 25: 570-596.

Srivastav A.; Srivastava VC. (2009). Adsorptive desulfurization by activated alumina. *Journal of Hazardous Materials* 170: 1133-1140

Stanislaus A, Marafi A, Rana M.S. (2010) Recent advances in the science and technology of ultra low sulfur diesel (ULSD) production. *Catalysis today* 153: 1-68

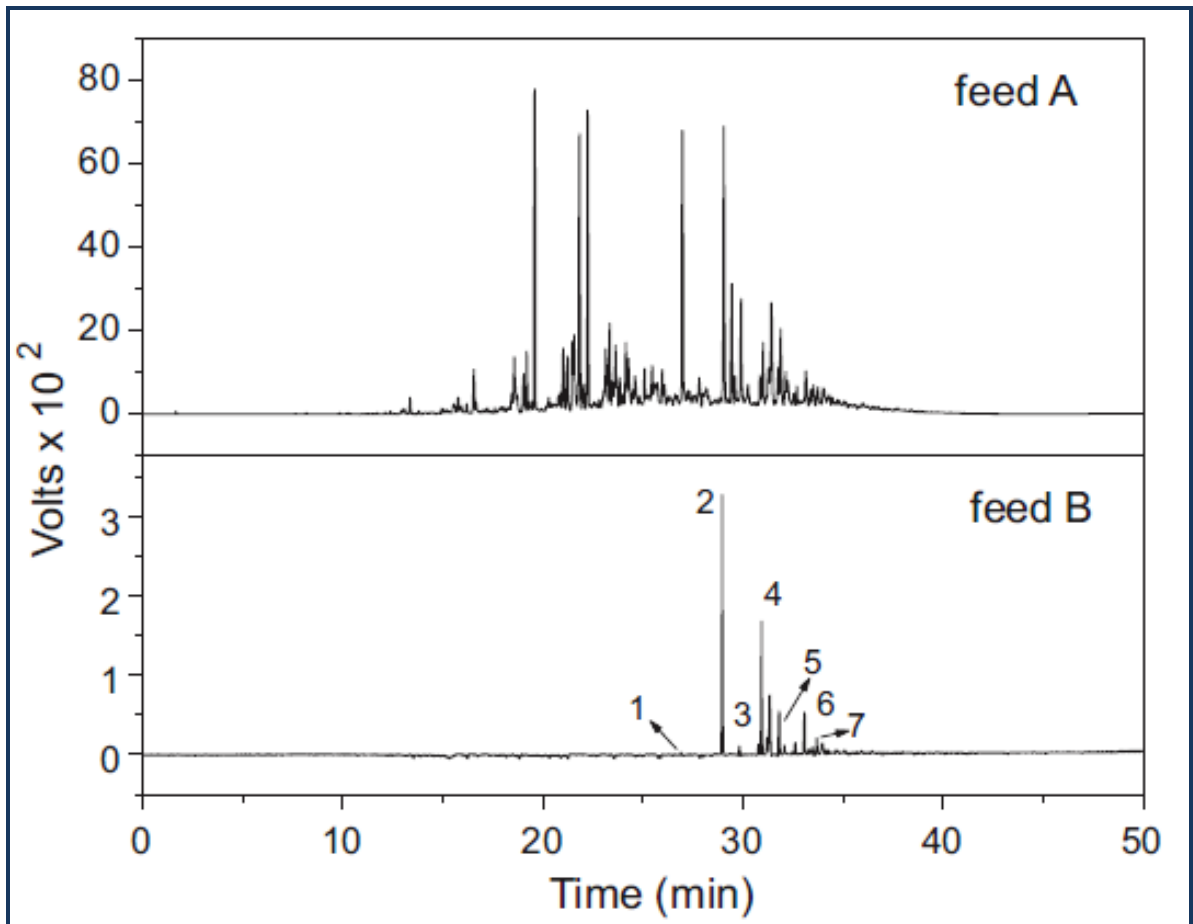
U.S. Energy Information Administration (IEA). (2010). "International Energy Outlook"

Wang W. y Kwak J. (1999). Adsorption at the alumina-water interface from mixed surfactant solution. *Colloids and Surfaces A* 156: 95-110.

Wegesser T.; y Last J. (2008). Lung responses to coarse PM: Bioassay in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203: 159-166.

ANEXOS

Anexo 1: Cromatografía del diesel utilizado en experimentación con un Cromatógrafo Gaseoso Shimadzu, modelo GC-2010 con detector FID y columna capilar spb-5.



En el anexo 1 se muestran los resultados de una cromatografía realizada al diesel utilizado en experimentación en donde: Feed A) Gasoil; Feed B) diesel ciudad; 1) DBT; 2) 4-metil-DBT; 3) 2-metil-DBT; 4) 4,6-DMDBT; 5) 3,6-DMDBT; 6) 2,4,6-trimetil-DBT; 7) 1,4,6-trimetil-DBT. Con la finalidad de conocer su composición