

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Estudios en degradación de poliuretano con hongos endófitos del género
Pestalotiopsis

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias Biológicas

LAURA AYALA BUCHELI

Quito, 2015

CERTIFICADO

Yo, Carlos A. Soria Proaño, Director de la disertación, CERTIFICO que la señorita LAURA AYALA BUCHELI ha realizado la investigación sobre el tema “Estudios en degradación de poliuretano con hongos endófitos del género *Pestalotiopsis*” de acuerdo a las normas y técnicas establecidas. Una vez concluido el trabajo, conforme con las disposiciones reglamentarias, autorizo la presentación del informe respectivo.

Quito, 10 de noviembre de 2015

Carlos A. Soria Proaño

DIRECTOR

A mi familia, mis amigos

y la naturaleza.

ESTUDIOS EN DEGRADACIÓN DE POLIURETANO CON HONGOS ENDÓFITOS DEL GÉNERO *Pestalotiopsis*

Laura Ayala, Carlos A. Soría

Laboratorio de Bioquímica de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador

RESUMEN

Muestras de espuma de poliuretano termoestable fueron sometidas a cuatro especies de hongos endófitos del género *Pestalotiopsis*, recolectadas en Ecuador. Se evaluaron muestras del polímero mediante espectrofotometría infrarroja (FT-IR) y microscopía electrónica de barrido (SEM: scanning electron microscope) sometidas cien días a las cuatro especies de hongo. Los espectros obtenidos con FT-IR reflejan un cambio en la composición del polímero al ser sometido a los diferentes hongos, mostrando un aumento en la absorbancia de los picos correspondientes a alcoholes, ácidos carboxílicos e isocianatos. Las imágenes SEM indican cambios en la estructura del polímero. Estos cambios registrados con FT-IR y SEM sugieren una degradación enzimática con cada uno de los cuatro hongos y dan paso a nuevas preguntas con respecto a la actividad enzimática de estos hongos endófitos.

PALABRAS CLAVES: degradación enzimática, endófitos, espectrofotometría infrarroja, *Pestalotiopsis*

**POLYURETHANE DEGRADATION STUDIES WITH ENDOPHYTIC FUNGI OF
THE GENUS *Pestalotiopsis***

ABSTRACT

Thermosetting polyurethane foam samples were exposed to each of four species of endophytic fungi of the genus *Pestalotiopsis*, collected in Ecuador. After being 100 days with the fungi, the polymer samples were evaluated by infrared spectroscopy (FT-IR) and scanning electron microscopy (SEM). The spectra obtained by FT-IR reflect a change in the polymer composition when exposed to the different fungus; there is an increase in absorbance of the peaks corresponding to alcohols, carboxylic acids and isocyanates. The SEM images show a visible change in the structure of the polymer. Variations registered with FT-IR and SEM suggested an enzymatic degradation by each of the four fungi and formulated new questions regarding to the enzymatic activity of these endophytes.

KEYWORDS: endophytic, enzymatic degradation, infrared spectroscopy, *Pestalotiopsis*

INTRODUCCIÓN

El plástico usado representa el 10% del total de los desechos producidos anualmente (Barnes *et al.* 2009) el cual podría permanecer en el ambiente por cientos de años, dependiendo de su composición química (Cózar *et al.* 2014).

En la década de los 50s comenzó la producción masiva de plásticos (Barnes *et al.* 2009), los cuales reemplazaron metales, fibras naturales, vidrio y otros, debido a su resistencia y fácil manipulación. Actualmente la mayoría de plásticos fabricados son producidos como derivados del petróleo (Thompson *et al.* 2009). Dada su característica estructura molecular polimérica plastificante que exhiben, presentan gran dificultad para ser degradados en el medio ambiente (Shah *et al.* 2008).

Entre los factores externos que pueden provocar cambios en la estructura de ciertos materiales sintéticos están los agentes bióticos y los abióticos. Los primeros son microorganismos cuyas enzimas pueden provocar degradaciones estructurales moleculares graduales (Tokiwa *et al.* 2009); las abióticas o condiciones ambientales como temperatura, pH, radiación solar, entre otras, contribuyen complementariamente al proceso degradativo.

La capacidad de *Pestalotiopsis microspora* para degradar poliuretano líquido, un tipo de plástico producido por la condensación de poliisocianato y grupos polioliol con enlaces intramoleculares de uretano, fue reportado por Russell *et al.* (2011). Algunas bacterias y hongos capaces de degradar poliuretano producen esterases (Nakajima-Kambe *et al.* 1999). Considerando la mega biodiversidad del Ecuador (Sierra 2002) se seleccionó al azar para este

estudio un grupo de hongos endófitos del género *Pestalotiopsis* para evaluar sus propiedades degradativas en presencia de poliuretano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las especies

Se utilizaron cuatro especies de *Pestalotiopsis*: tres de ellas aisladas de *Cortadeira jubata* por Barnes y Ordoñez en la provincia de Loja en 2013, y una aislada de *Ganoderma* sp. por Salazar en la provincia de Pichincha en 2013. Fueron previamente identificadas por métodos moleculares como *Pestalotiopsis* sp. Las especie fueron etiquetadas como 12.1, 12.3, 15.1 y 23.1 (Rodríguez-Guerra *et al.* 2012), respectivamente.

Obtención y preparación del poliuretano

El sustrato usado fue espuma comercial de poliuretano termoestable recortado en cubos de 5x5x5mm. Las muestras fueron lavadas con agua destilada.

Aislamiento del hongo

Cada especie de hongo fue inoculado en cajas Petri con SDA (Sabouraud Dextrose Agar: 32.5g en 467.5 ml de agua destilada más 1g de levadura en polvo) usando una campana de flujo laminar (modelo OptiMair Laminar Flow Clean Benches de la marca ESCO). Los inóculos fueron incubados a temperatura ambiente del laboratorio (aprox. 20°C). Diez días después y en condiciones estériles se aisló una muestra de micelio joven de 5x5mm, retirando el agar con un estilete estéril, y se lo inoculó en tubos Falcon de 15 ml con 10 ml de caldo Sabouraud Dextrose (3.5g en 246 ml de agua destilada más 0.5g de levadura en polvo). Estos tubos fueron incubados a temperatura ambiente del laboratorio por una semana.

Inoculación del sustrato

Después de una semana de crecimiento del hongo en el tubo Falcon, se colocaron 13 cubos del poliuretano en cada tubo. Se realizaron tres repeticiones por cada hongo y tres repeticiones del control que consistió de tubos con 13 cubos de poliuretano en medio de cultivo.

Muestreo

Cada diez días durante cien días se traspasó asepticamente un cubo de poliuretano de cada tubo Falcon a un tubo Eppendorf previamente marcado. Se procedió a lavar la muestra cuatro veces con agua miliQ y se retiró en forma estéril el micelio del cubo de poliuretano el mismo que fue transferido a un nuevo Eppendorf el cual fue sometido a un proceso de secado a 60°C por 24 horas antes de proceder con el análisis de la muestra.

Análisis de las muestras

Se utilizó el equipo de espectrofotometría infrarroja (FT-IR System) modelo Spectrum BX de la marca Perkin Elmer con el programa Spectrum versión 5.0.1 (2003) para realizar la lectura de cada cubo de poliuretano. Usualmente, para análisis cuantitativos se utiliza la absorbancia debido a que es directamente proporcional al grosor y concentración de la muestra (Stuart 2007). Se configuró la lectura en absorbancia y un rango de número de onda desde 4000 hasta 520 cm^{-1} para visualizar los picos de interés. Luego se realizaron comparaciones entre los espectros de los cubos sometidos a los hongos, la matriz original (cubos sin tratamientos previos) y el poliuretano control (cubos en caldo de cultivo) para visualizar la variación en la absorbancia de cada pico correspondiente a los grupos hidroxilo, carbonilo, carboxilo, ester y amino.

Se realizaron fotografías con el microscopio electrónico de barrido (SEM: scanning electron microscope) Jeol JSM-5310 en el Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación (INSPI) en Guayaquil. Para el efecto se recubrieron las muestras plásticas con una lámina de oro utilizando el equipo Jeol JFC-1200 por 20 segundos, luego se procedió a obtener las fotografías.

RESULTADOS

Después de los cien días de experimento, ningún tubo Falcon presentó contaminación con otros microorganismos; el medio de cultivo se mantuvo transparente. Los resultados se dan debido a la presencia de una de las cuatro especies de *Pestalotiopsis*.

Las muestras analizadas presentaron cambios en los espectros resultantes de las lecturas realizadas con el FT-IR. La matriz original de poliuretano y la muestra control a los cien días no presentaron diferencias (**Figura 1**). Con respecto a estos espectros se realizaron comparaciones con los espectros de los cubos de poliuretano sometidos a las diferentes especies de hongos. El análisis requería doce espectros en un mismo gráfico (diez espectros correspondientes a los diez muestreos durante cien días, espectro de matriz original y muestra control) lo cual resultaba en el apiñamiento de todos los espectros. Se reportó para cada hongo los espectros de la matriz original, muestra control, muestra a los diez días y muestra a los cien días de exposición al cultivo de cada especie de hongo.

Descripción del espectro de la matriz original

El espectro de la matriz original muestra dos picos característicos de los poliuretanos: el grupo NH en el rango entre 3600 y 3200 cm^{-1} y el grupo carbonilo (de los uretanos) en el rango entre 1800 y 1700 cm^{-1} (**Figura 1**).

El pico encontrado entre 3000 y 2800 cm^{-1} es característico de una cadena carbonada, posiblemente un reflejo de la sección de dioles. La absorbancia que se reporta a 2370 cm^{-1} corresponde a los grupos isocianatos, propio de sistemas con polimerización incompleta durante la condensación del isocianato con los polioles (Biedermann 2011). Los picos que aparecen antes de 1600 cm^{-1} corresponden a la huella dactilar de la molécula; cuando se trata de compuestos complejos es difícil realizar una interpretación correcta (Skoog *et al.* 2008) por lo que esta región no es analizada. A pesar de esto, entre 1100 y 950 cm^{-1} aparece un pico grande que corresponde normalmente a la presencia de éteres pero también podría concernir a ésteres y carbonatos.

Descripción del espectro de la muestra control

La variación entre la matriz original y la muestra control difieren en el pico correspondiente a los isocianatos (2370 cm^{-1}), el cual tiene una menor absorbancia en el espectro de la muestra control.

Descripción de la variación en los espectros de las muestras sometidas a las cepas de Pestalotiopsis

Los espectros correspondientes a los cubos de poliuretano sometido a las cepas 12.1, 12.3 y 15.1 a los diez y cien días se asemejan entre sí, presentando la misma variación con respecto a los espectros de la matriz original y la muestra control (**Fig. 2, Fig. 3 y Fig. 4**).

Se puede observar un aumento en la absorbancia de dos picos entre 3600 y 2800 cm^{-1} . Estos se analizan en conjunto, reflejando la presencia de ácidos carboxílicos. El pico simple entre 3600 y 3200 cm^{-1} corresponde al OH del ácido carboxílico mientras que el siguiente pico compuesto ubicado entre 3200 y 2800 cm^{-1} muestra el grupo carbonilo del ácido carboxílico. El siguiente

segmento, entre 2400 y 2300 cm^{-1} mostró también aumento en la absorbancia. Este pico corresponde a isocianatos, analizado en conjunto con los dos anteriores sugiere la despolimerización del poliuretano.

La cepa 23.1 provocó un cambio diferente en las muestras de poliuretano. El primer pico, entre 3700 y 3400 cm^{-1} , aparentemente corresponde a una amina terminal y no se evidencia el pico del hidroxilo. El pico entre 3200 y 2800 cm^{-1} presenta un aumento en la absorbancia, al igual que el que se sitúa entre 2400 y 2300 cm^{-1} .

Descripción de las fotografías SEM

Las fotografías obtenidas con el microscopio electrónico de barrido demuestran cambios que se generan en las muestras sometidas diez y cien días a las cuatro especies de hongos. Se organizaron las fotografías en cuatro grupos para la apreciación visual del cambio generado con cada especie de *Pestalotiopsis*. Cada figura (**fig. 6**, **fig. 7**, **fig. 8** y **fig. 9**) comprende dos imágenes de la matriz original (A y B), dos imágenes de la muestra control después de cien días (C y D), dos imágenes de una muestra de poliuretano sometida diez días (E y F) y dos imágenes de una muestra de poliuretano sometida cien días a una de las especies de *Pestalotiopsis*.

La matriz original (A y B) presenta una estructura firme con membranas entre el esqueleto. Una vez que el plástico es agregado en el medio de cultivo, muestra correspondiente al control (C y D), las membranas desaparecen pero el esqueleto estructural se mantiene firme.

Con la especie 12.1 (**Fig. 6**) el poliuretano presenta cambios a los diez (E y F) y cien días (G y H). A los diez días (E con aumento x35 y D con aumento x500) se puede observar un cambio mínimo con respecto a la muestra control: la estructura del esqueleto se mantiene firme. A los

cien días (G con x35 y H con x750) se aprecia un fuerte cambio en la estructura del polímero, el esqueleto está débil y comprimido. Con aumento x750 se evidencian deformaciones en la estructura, mostrando rupturas y cambio en los bordes.

Con la especie 12.3 (**Fig. 7**) el poliuretano presenta cambios a los diez (E y F) y cien días (G y H). A los diez días (E con aumento x35 y D con aumento x500) se puede apreciar un esqueleto compactado y frágil. A los cien días (G con x35 y H con x750) la muestra se asemeja a la de los diez días, excepto por la muestra con aumento x750 donde se observan rupturas en la estructura y residuos de hifas pegadas al polímero.

Con la especie 15.1 (**Fig. 8**) el poliuretano presenta cambios a los diez (E y F) y cien días (G y H). A los diez días (E con aumento x35 y D con aumento x500) se visualiza una muestra debilitada y a los cien días (G con x35 y H con x750) se ve la muestra compactada y aminorada. A los cien días con aumento x750 se ven porosidades y ranuras.

Con la especie 23.1 (**Fig. 9**) el poliuretano presenta cambios a los diez (E y F) y cien días (G y H). A los diez días (E con aumento x35 y D con aumento x350) se observar una estructura aparentemente estable, similar a la de la muestra control (C y D). A los cien días (G con x35 y H con x750) la estructura plástica se debilita y se encoje. Con aumento x750 pueden apreciarse ligeros cambios en los bordes del plástico, como las deformidades granuladas.

DISCUSIÓN

La capacidad exoenzimática de un microorganismo para degradar polímeros sintéticos como los plásticos tiene importancia ya sea en procesos de biorremediación, en la ecología microbiana o en la microbiología industrial (Howard y Hilliard 1999). El presente trabajo

reporta los cambios que se observan en la estructura del poliuretano expuesto al crecimiento de cuatro especies de *Pestalotiopsis* aisladas en Ecuador.

Microorganismos capaces de degradar poliuretano poseen ureasas, esterasas y proteasas (Shah *et al.* 2008). Estas enzimas pertenecen a la familia de las hidrolasas (Romano *et al.* 2015, Acosta *et al.* 2012) cuya reacción catalítica requiere de la presencia de agua de reacción para provocar la ruptura o la formación de enlaces moleculares que ocurrirían en medios de cultivo líquidos o semisólidos.

Los cambios en la estructura del plástico fueron detectados con espectrofotometría infrarroja de reflectancia atenuada total (ATR), una técnica usada para obtener espectros de muestras complejas (Skoog *et al.* 2008). Se escogió la región del infrarrojo medio debido a que el espectro característico del poliuretano se identifica en el rango de los 4000 hasta los 520 cm^{-1} .

Los picos observados en los diferentes espectros proveen indicios de los cambios ocurridos en el poliuretano en presencia de exoenzimas provenientes de los cultivos de *Pestalotiopsis*; el aumento de la absorbancia de ciertos picos sugiere cambios en la estructura molecular del polímero. El espectro de la muestra control se mantiene similar al de la matriz original (**Fig. 1**) y las fotografías SEM exponen una muestra control con un esqueleto rígido y estable similar al de la matriz original, lo que indica que el medio de cultivo, en el que fue realizado el experimento, no provoca alteraciones en el plástico. Por lo tanto, es posible asumir que el aumento de las absorbancias del poliuretano expuesto durante diez y cien días a cada una de las cuatro especies de *Pestalotiopsis* es debido al crecimiento y actividad enzimática extracelular.

El puente molecular característico del poliuretano es el enlace uretano el cual une al isocianato con un poliol (Nakajima-Kambe *et al.* 1999). Considerando la posible actividad reportada de las exoenzimas: esterasas, proteasas y ureasas (Howard y Blake 1998) , se consideró posibles rupturas moleculares del poliuretano dentro de nuestro experimento.

La acción de la esterasa ocurre por adsorción hidrofóbica a la superficie del polímero seguida de la hidrólisis del enlace ester (Shimao 2001) que resulta en un alcohol y un ácido carboxílico (Walker y Mackness 1983) y que eventualmente terminarían como CO₂ y H₂O (Tokiwa *et al.* 2009). El área de los picos que sufrieron aumento en el rango del espectro infrarrojo en los poliuretanos expuestos a las cepas 12.1 (**Fig.2**), 12.3 (**Fig. 3**) y 15.1 (**Fig. 4**), corresponden al rango de los ácidos carboxílicos y alcoholes, sugiriendo un incremento de la concentración de estos grupos en el compuesto, lo que propone actividad enzimática degradativa en el polímero. *Pestalotiopsis microspora* posee actividad esterásica (Russell *et al.* 2011) lo que sugeriría que otras especies de hongos endófitos pertenecientes al mismo género, poseen actividades enzimáticas similares.

En la **Figura 1** se observa la comparación entre el espectro de la matriz original y la muestra control, donde se evidencia una ligera variación en el pico correspondiente a la polimerización incompleta de poliuretano (entre 2400-2300 cm⁻¹), dada por un exceso de grupos isocianatos (-NCO) en la producción del plástico (DeThomas *et al.* 1994). Cuando el polímero es introducido en medio de cultivo (como muestra control) estos isocianatos son liberados en medio acuoso, provocando la disminución en la absorbancia de este pico.

Los espectros correspondientes a las muestras sometidas a las diferentes especies de *Pestalotiopsis* (*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*,

Figura 3, Fig. 4 y Fig. 5) presentan un aumento en la absorbancia del pico entre 2400-2300 cm^{-1} , reflejando un aumento en la concentración de isocianatos terminales. Los isocianatos están enlazados entre ellos por uniones uretano, los cuales podrían ser hidrolizados por el enzima ureasa (Rangel *et al.* 2009), dejando isocianatos terminales. Esto podría explicar el aumento en la absorbancia de este pico.

En las Fig. 3 y 4, se puede apreciar el aumento de la absorbancia de los picos entre 3600 y 2800 cm^{-1} . Esto refleja un aumento en la concentración de alcoholes y ácidos carboxílicos, proponiendo la ruptura de enlaces éster dentro de la molécula. Sin embargo, el pico representante del grupo éster (1730 cm^{-1}) presenta un aumento en la absorbancia. Debido a la complejidad del polímero, podrían generarse otras reacciones bioquímicas generando un aumento de carbonilos (1760-1665 cm^{-1}). El grupo

carbonilo del ácido carboxílico se ve reflejado en este rango, entonces un aumento en la absorbancia de estos picos podría reflejar el aumento de ácidos carboxílicos, el cual también se aprecia entre 3200 y 2800cm^{-1} .

Las diferentes vibraciones que puede tener una molécula podrían no aparecer en un espectro (Skoog *et al.* 2008). Esto se debe a que un pico puede sobrelapar a otro pico que se encuentre cercano. En el caso de los alcoholes y las aminas, sus picos aparecen en rangos similares (entre $3600 - 2800\text{cm}^{-1}$) lo cual podría provocar que el pico del alcohol opaque la aparición del pico amina. Por lo tanto, debería considerarse la posibilidad de que el aumento del pico del ácido carboxílico corresponda a la ruptura del enlace uretano entre el isocianato y el diol, resultando en una amina y un éster de ácido fórmico. La presencia de ácido carboxílico en un espectro se evalúa con los dos picos entre $3600 - 2800\text{cm}^{-1}$, permitiendo que el pico entre $3600 - 3200\text{cm}^{-1}$ (hidroxilo) sobrelape al pico amina.

La **figura 5** muestra los espectros de las muestras sometidas al hongo *Pestalotiopsis* 23.1. Se puede evidenciar que los espectros sufren un cambio distinto al que sufren los espectros de las muestras sometidas a las otras tres especies. El pico compuesto en 3600 cm^{-1} refleja la presencia de una amina terminal y los picos correspondientes a alcoholes y ácidos carboxílicos presentan aumento en la absorbancia pero no como se observa en las **figuras 2, 3 y 4**. Esto podría reflejar una variación en las enzimas que libera cada especie o la posibilidad del hongo de consumir los productos de la reacción exoenzimática. En este caso, se podría considerar la acción de amidasas y ureasas sobre el poliuretano.

El espectro resultante antes de 1600 cm^{-1} corresponde a la huella dactilar del compuesto, área de poco análisis en moléculas complejas debido a la alta probabilidad de malinterpretación

(Skoog *et al.* 2008). A pesar de esto, cuando se ven cambios en esta zona, se concluye que la composición molecular ha cambiado. Al comparar el espectro de la matriz original con los espectros de las muestras sometidas a cada una de las cuatro especies de *Pestalotiopsis* se verifica una variación en esta zona.

En los espectros IR se verifica que no existe diferencia entre la muestra de diez y cien días, insinuando que la degradación se da en los primeros diez días. A pesar de esto, la diferencia entre las imágenes SEM de diez a cien días (**Fig.6, Fig. 7, Fig. 8 y Fig. 9**) manifiesta un cambio en el poliuretano, el cual podría ser únicamente físico.

El poliuretano no fue triturado para poder obtenerlo fácilmente después de una degradación parcial y realizar las lecturas en el espectro. Las muestras de plástico no desaparecieron pero si cambiaron su estructura física, siendo su elasticidad mayor y su resistencia menor, resultando en una muestra diferente a la inicial.

La biodegradación de un polímero natural o sintético puede verse afectada por ciertos factores en el diseño y producción de estos: el peso molecular, la cristalinidad y la temperatura de fusión (Tokiwa *et al.* 2009). A esto se suma el tiempo de exposición y la comunidad microbiana, que en este caso se limitaba a cien días y una sola especie de hongo por experimento.

Es posible apreciar el contraste entre los efectos que provocan las diferentes especies de *Pestalotiopsis* sobre el poliuretano, pero para poder realizar comparaciones y determinar niveles de eficiencia, se requiere identificar las enzimas que actúan y la composición exacta del polímero.

CONCLUSIONES

La investigación realizada en los últimos 30 años sobre degradación de materiales sintéticos es de gran utilidad no solo para la biodegradación de los plásticos existentes sino para poder desarrollar nuevos polímeros con moléculas que puedan ser degradadas por microorganismos en tiempos razonables y en diversas condiciones ambientales.

El presente estudio sugiere una degradación parcial del poliuretano en el tiempo estudiado posiblemente a la presencia de exoenzimas capaces de romper enlaces uretano y éster, y formula nuevas preguntas sobre la dinámica enzimática de cada microorganismo estudiado. Debido a esta complejidad, sería prudente proseguir con el aislamiento y caracterización de las exoenzimas para probar su interacción con el poliuretano y determinar eficiencias entre especies.

Los resultados que se visualizan en las gráficas de rangos de absorbancia y microscopía electrónica demuestran curvas y alteraciones estructurales muy distintas entre controles y experimentales. Los picos de los hidroxilos, ácidos carboxílicos e isocianatos proponen un cambio a nivel molecular del polímero.

No fue posible conocer la composición exacta de la espuma de poliuretano lo cual limita el estudio, pero se podría intentar trabajar a la par con estas industrias para continuar con la búsqueda y cultivo de cepas de microorganismos que puedan degradar eficientemente el poliuretano en tiempos apropiados. La investigación con muestras de plástico comercial locales debe continuar para poder analizar la dinámica de los microorganismos y su capacidad de degradar estos polímeros.

AGRADECIMIENTOS

A los MSc. Pablo Pozo y Eliza Jara por su asistencia técnica y académica; al INSPI en Guayaquil por el uso del microscopio electrónico de barrido; a la Escuela de Química de las Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) por el uso del espectrofotómetro infrarrojo; a la Msc. Alexandra Narvaez por la revisión de este artículo; a la PUCE por los fondos destinados a esta investigación.

REFERENCIAS

- Acosta Y., El Zauahre M., Rodríguez L., Reyes N. y Rojas D. (2012). Indicadores de calidad bioquímica y estabilidad de la materia orgánica durante el proceso de compostaje de residuos orgánicos. *Multiciencias* 12, 390-399.
- Barnes D.K., Galgani F., Thompson R.C. y Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 364, 1985–98.
- Cózar A., Echevarría F., González-Gordillo J.I., Irigoien X., Ubeda B., Hernández-León, S., Palmae A.T., Navarro S., García-de-Lomasa J., Ruizg A., Fernández-de-Puelles M.L. y Duarte, C.M. (2014). Plastic debris in the open ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111,17–19.

DeThomas F.A., Hall J.W. y Monfre, S.L. (1994). Real-time monitoring of polyurethane production using near-infrared spectroscopy. *Talanta* 41, 425–431.

Howard G. T. y Hilliard N.P. (1999). Use of Coomassie blue-polyurethane interaction in screening of polyurethanase proteins and polyurethanolytic bacteria. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 32, 12–19.

Nakajima-Kambe T., Shigeno-Akutsu Y., Nomura N., Onuma F. y Nakahara T. (1999). Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 134–40.

Rangel N.A., De Alva H., Romero J., García-Hernández E. y Rivera J.L. (2009). Matemáticos de materiales compuestos de poliuretano poroso/hidroxiapatita. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 10, 180–197.

Rodríguez-Guerra A., Barnes C.W., Ordóñez M.E., Salazar A., Soria C.A. (2012) Identificación y evaluación de algunos hongos con actividad celulásica aislados en Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas* 33, 65-81.

Romano D., Bonomi F., de Mattos M.C., de Sousa Fonseca T., de Oliveira M.D.C.F. y Molinari F. (2015). Esterases as stereoselective biocatalysts. *Biotechnol. Adv.* 33, 547-565

Russell J.R., Huang J., Anand P., Kucera K., Sandoval A.G., Dantzler, K.W., Hickman, D., Jee J., Kimovec M.F., Koppstein, D., Marks D.H., Mittermiller P.A., Nuñez S.J., Santiago M., Townes M.A., Vishnevetsky M., Williams N.E., Nuñez Vargas M.P., Boulanger L.A., Bascom-Slack C., Strobel, S. (2011). Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6076–84.

Shah A.A., Hasan F., Hameed A. y Ahmed S. (2008). Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* 26, 246–65.

Shimao M. (2001). Biodegradation of plastics. *Environ. Biotechnol.* 12, 242–247.

Sierra R., Campos F. y Chamberlin J. (2002). Assessing biodiversity conservation priorities : ecosystem risk and representativeness in continental Ecuador. *Landsc. Urban. Plan.* 59, 95-110.

Skoog D.A., Holler F.J. y Crouch S.R. (2008) *Principios de análisis instrumental*. 6ª ed. Editorial Cengage Learning. México DF. México. 1064 pp.

Stuart, B. (2007). Infrared Spectroscopy. En: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley & Sons. Hoboken. EUA. Vol 14. pp. 224-243.

Thompson R.C., Swan S.H., Moore C.J. y vom Saal F.S. (2009). Our plastic age. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 364, 1973–1976.

Tokiwa Y., Calabia B.P., Ugwu C.U. y Aiba S. (2009). Biodegradability of plastics. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3722–3742.

Walker C.H. y Mackness M.I. (1983). Esterases: Problems of Identification and Classification. *Biochem. Pharmacol.* 32, 3265–3269.

ANEXOS

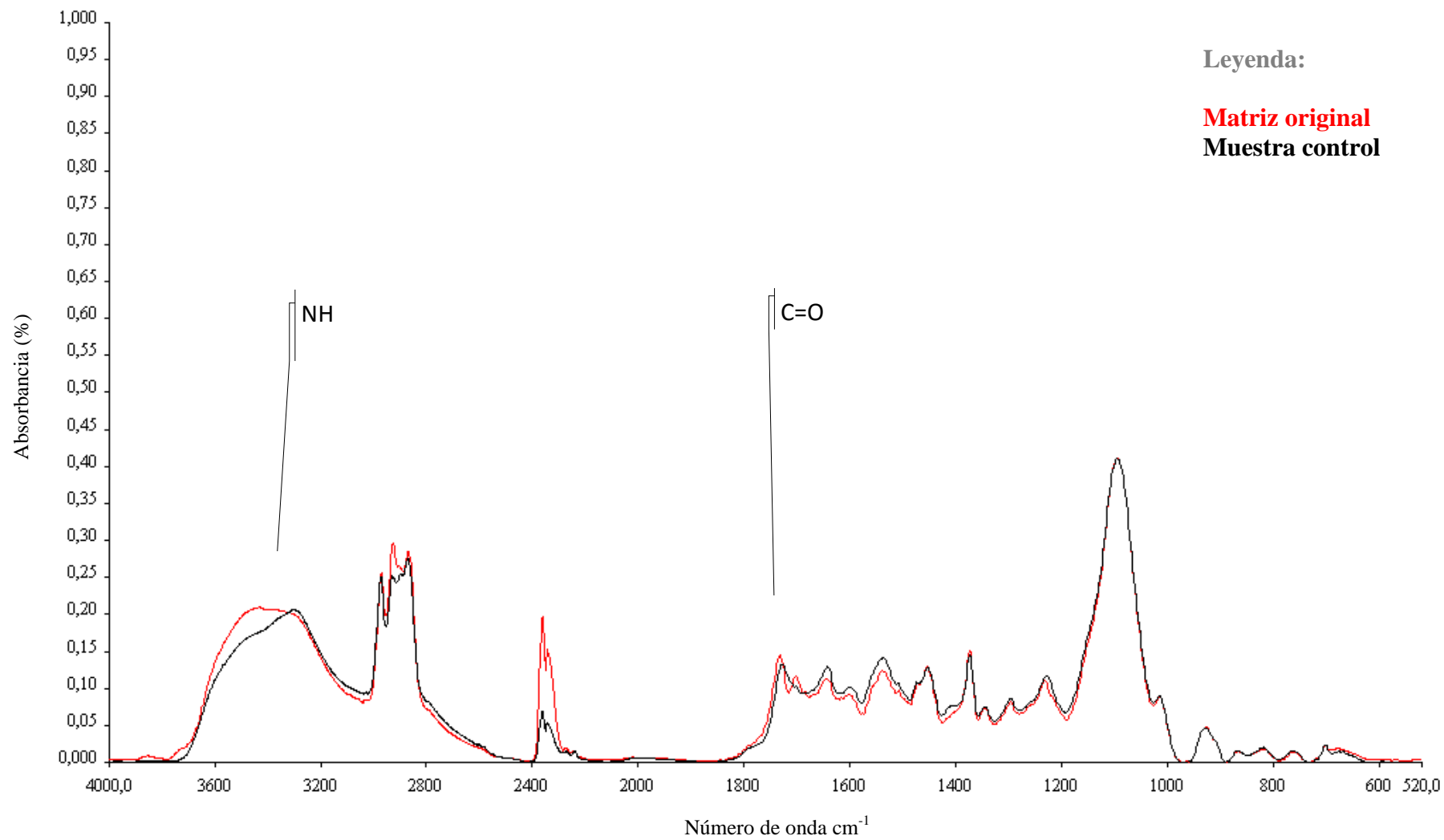


Figura 1: Espectro IR de la matriz original (rojo) y espectro de la muestra control (negro) a los cien días.

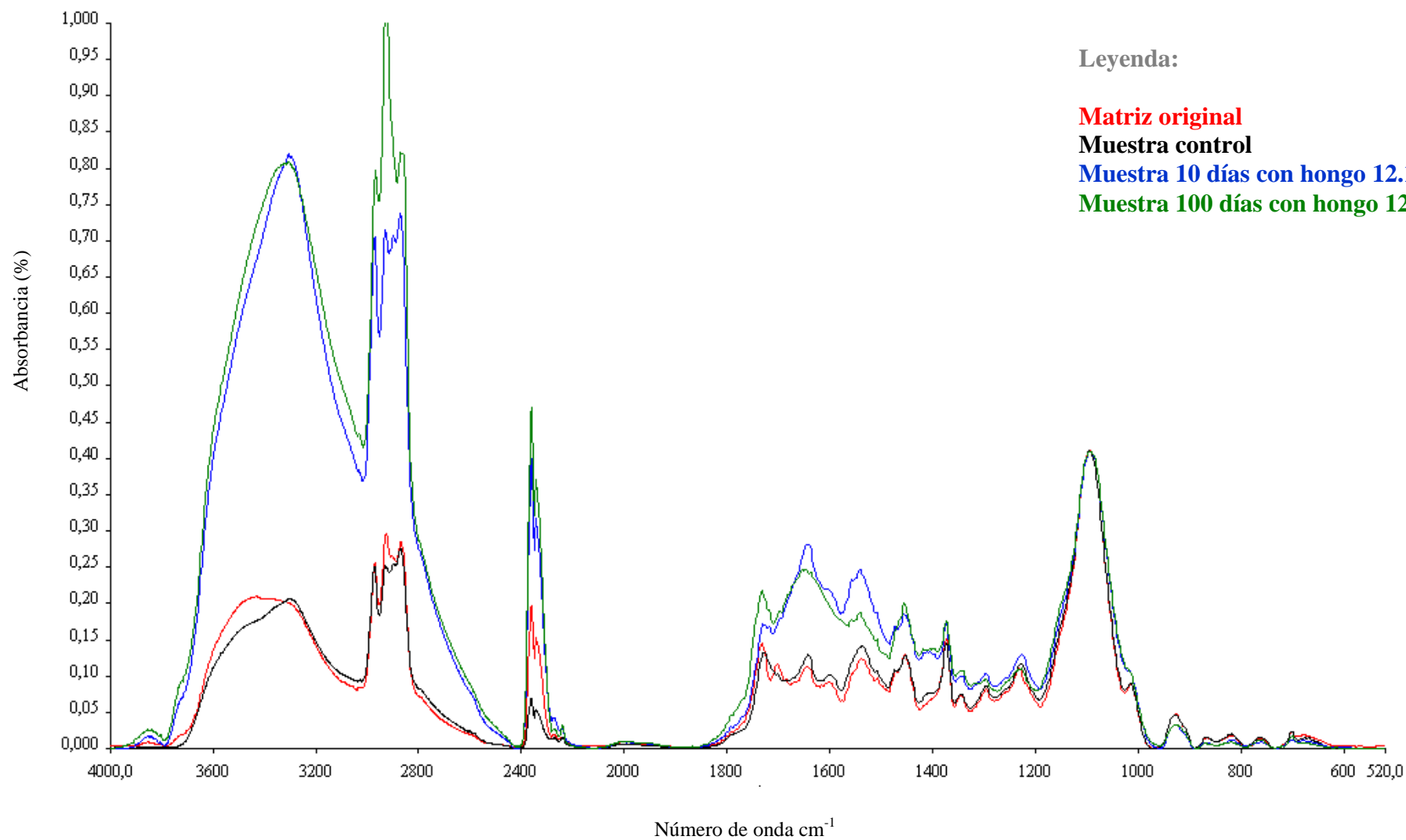


Figura 2: Espectros IR de la matriz original (rojo), muestra control (negro) y muestras de poliuretano sometidas a la especie 12.1 por diez (azul) y cien días (verde)

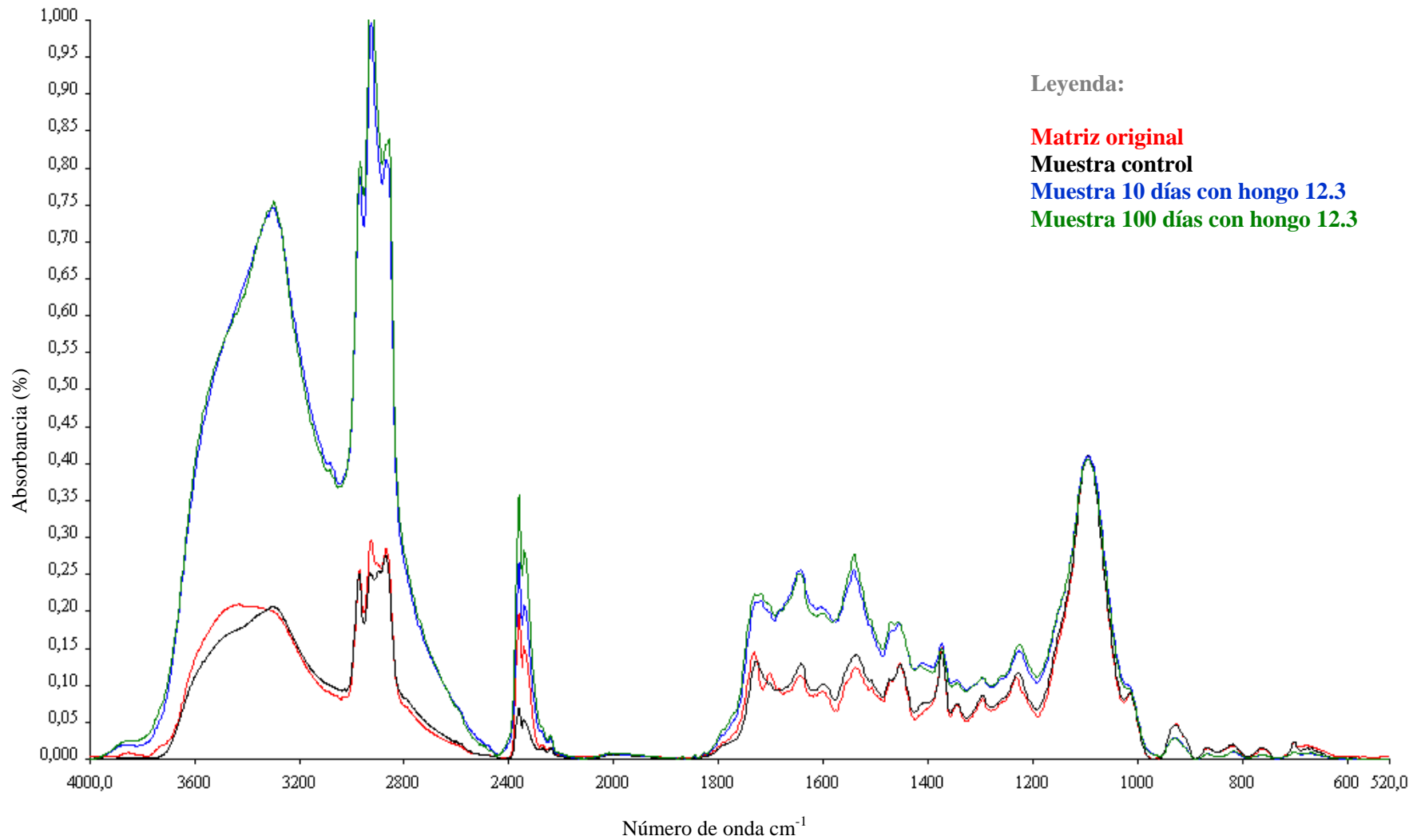


Figura 3: Espectros IR de la matriz original (rojo), muestra control (negro) y muestras de poliuretano sometidas a la especie 12.3 por diez (azul) y cien días (verde)

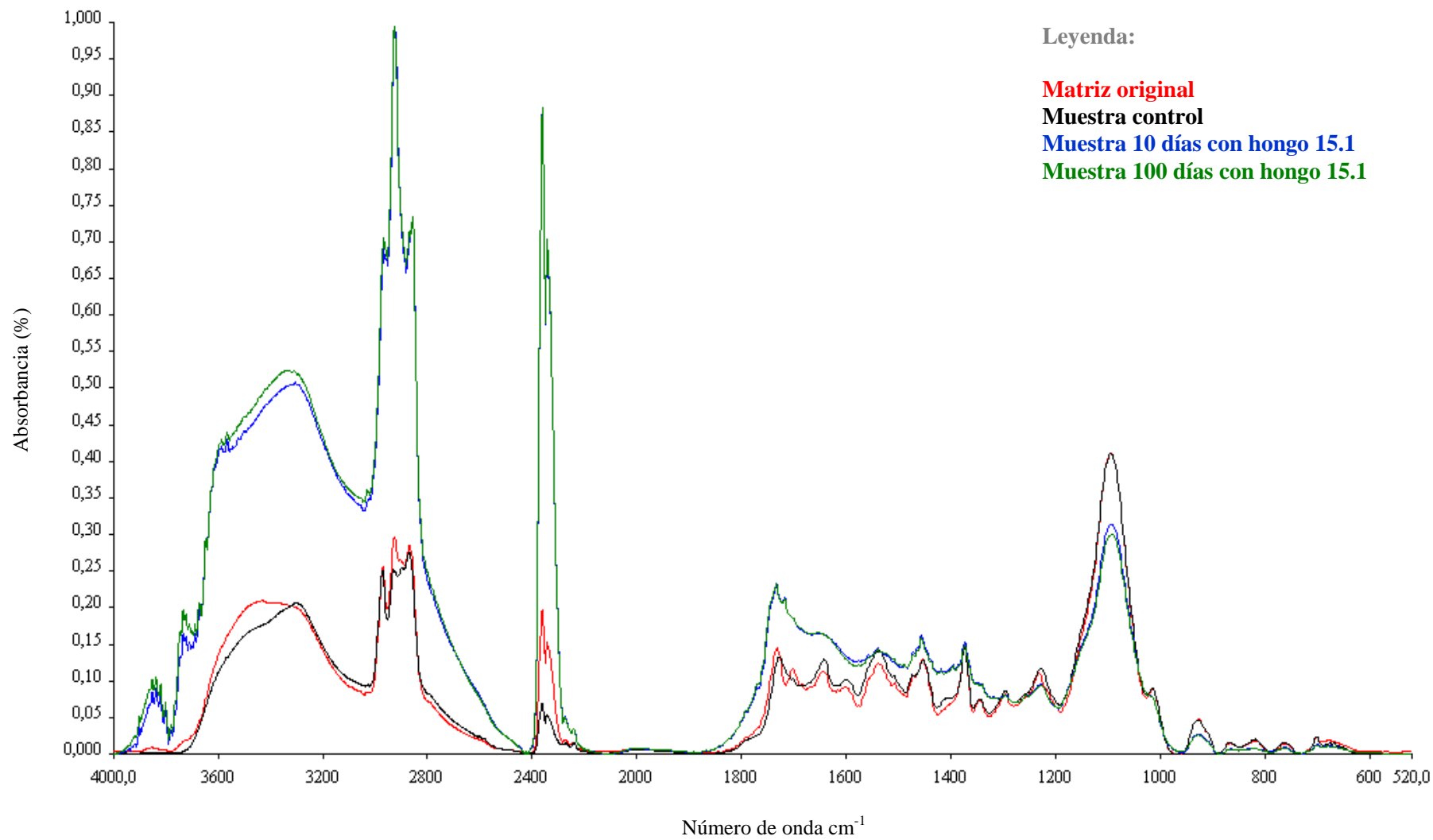


Figura 4: Espectros IR de la matriz original (rojo), muestra control (negro) y muestras de poliuretano sometidas a la especie 15.1 por diez (azul) y cien días (verde)

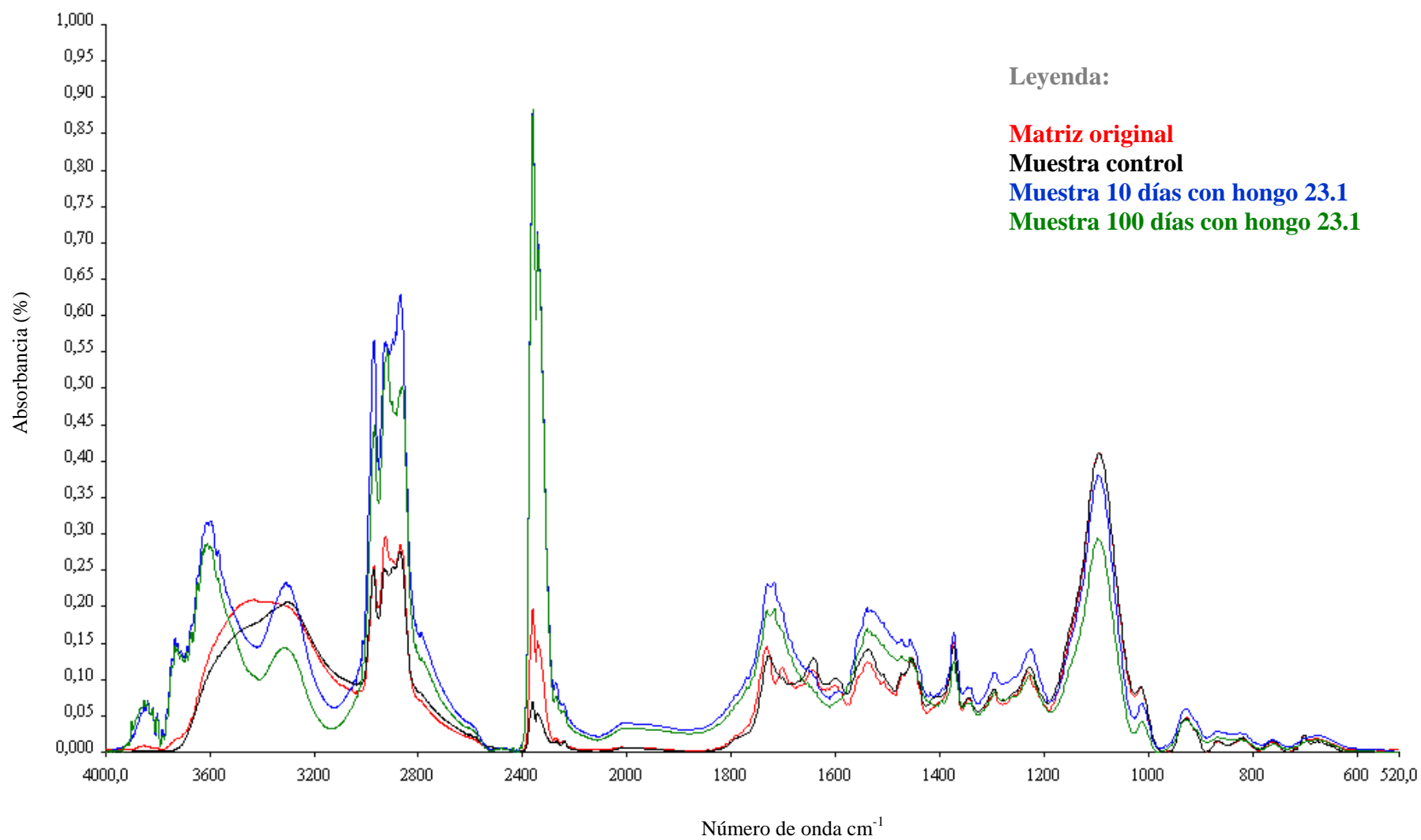


Figura 5: Espectros IR de la matriz original (rojo), muestra control (negro) y muestras de poliuretano sometidas a la cepa 23.1 por diez (azul) y cien días (verde).

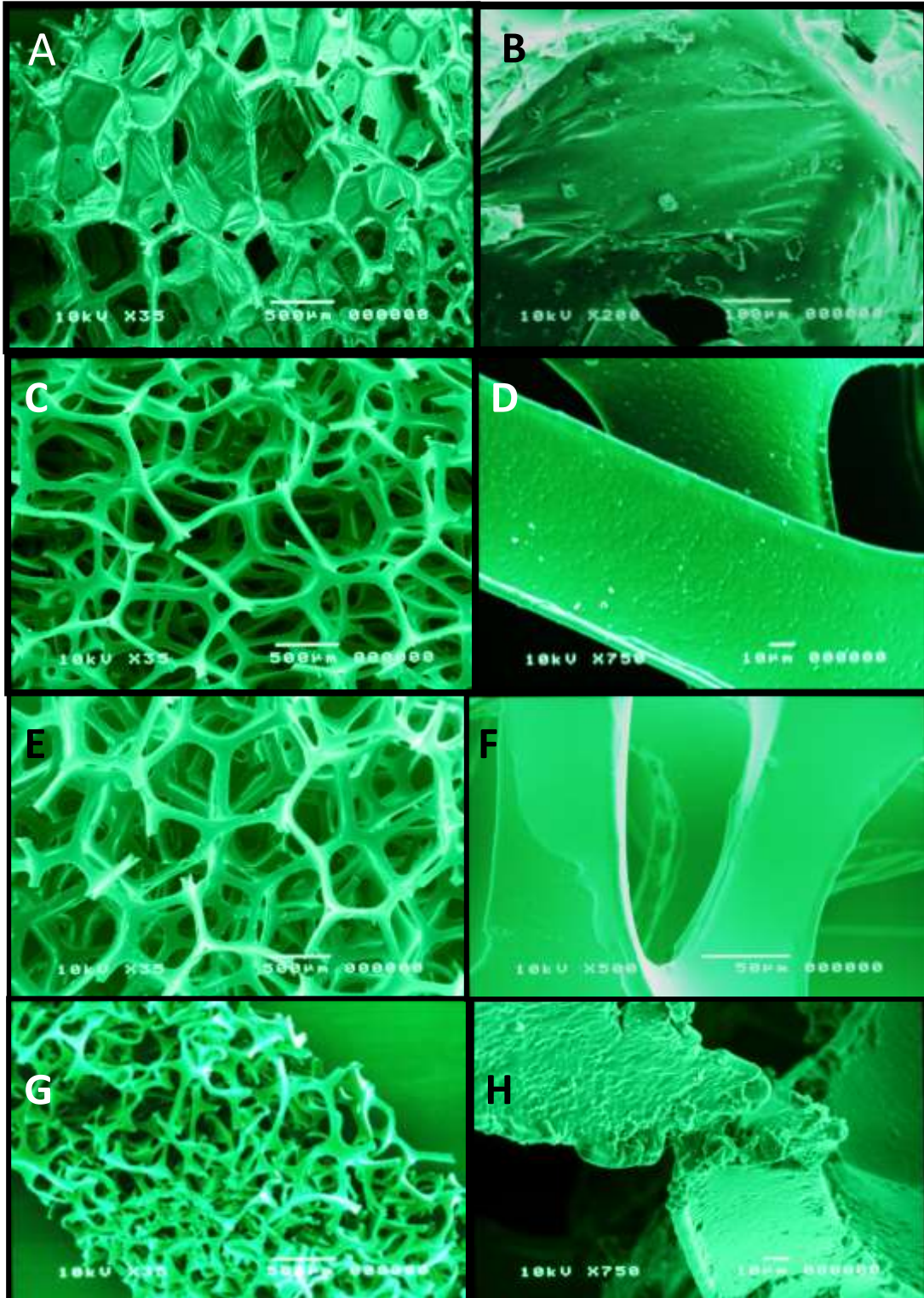


Figura 6: A. Matriz original con aumento x35; B. Matriz con aumento x200; C. Muestra control después de cien días con aumento x35; D. Muestra control después de cien días con aumento x750; Muestras sometidas a la especie 12.1: E. Muestra sometida diez días con el hongo con aumento x35; F. Muestra sometida diez días con el hongo con aumento x500; G. Muestra sometida cien días con el hongo con aumento x35; H. Muestra sometida cien días con el hongo con aumento x750.

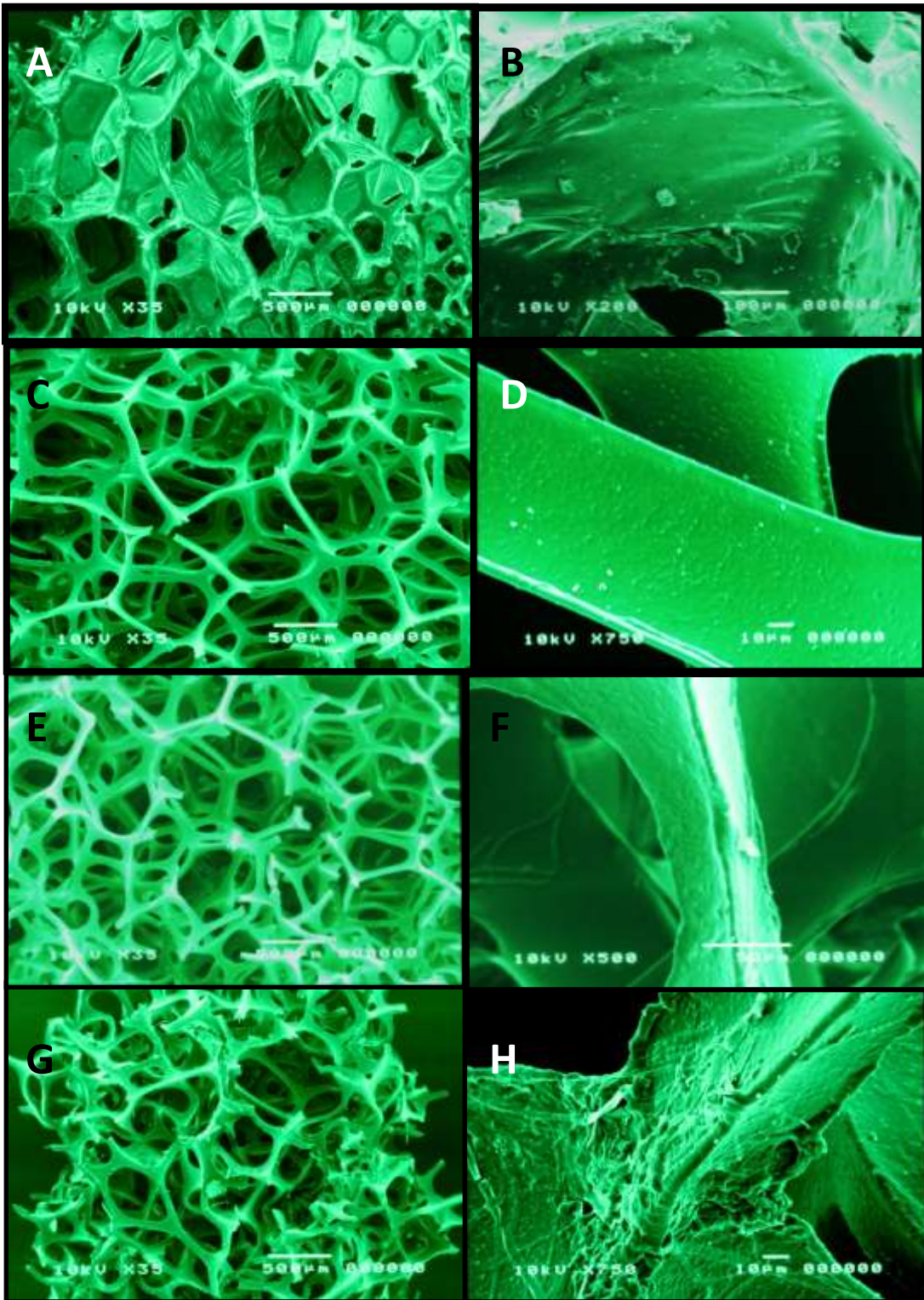


Figura 7: A. Matriz original con aumento x35; B. Matriz con aumento x200; C. Muestra control después de cien días con aumento x35; D. Muestra control después de cien días con aumento x750; Muestras sometidas a la especie 12.3: E. Muestra sometida diez días con el hongo con aumento x35; F. Muestra sometida diez días con el hongo con aumento x500; G. Muestra sometida cien días con el hongo con aumento x35; H. Muestra sometida cien días con el hongo con aumento x750.

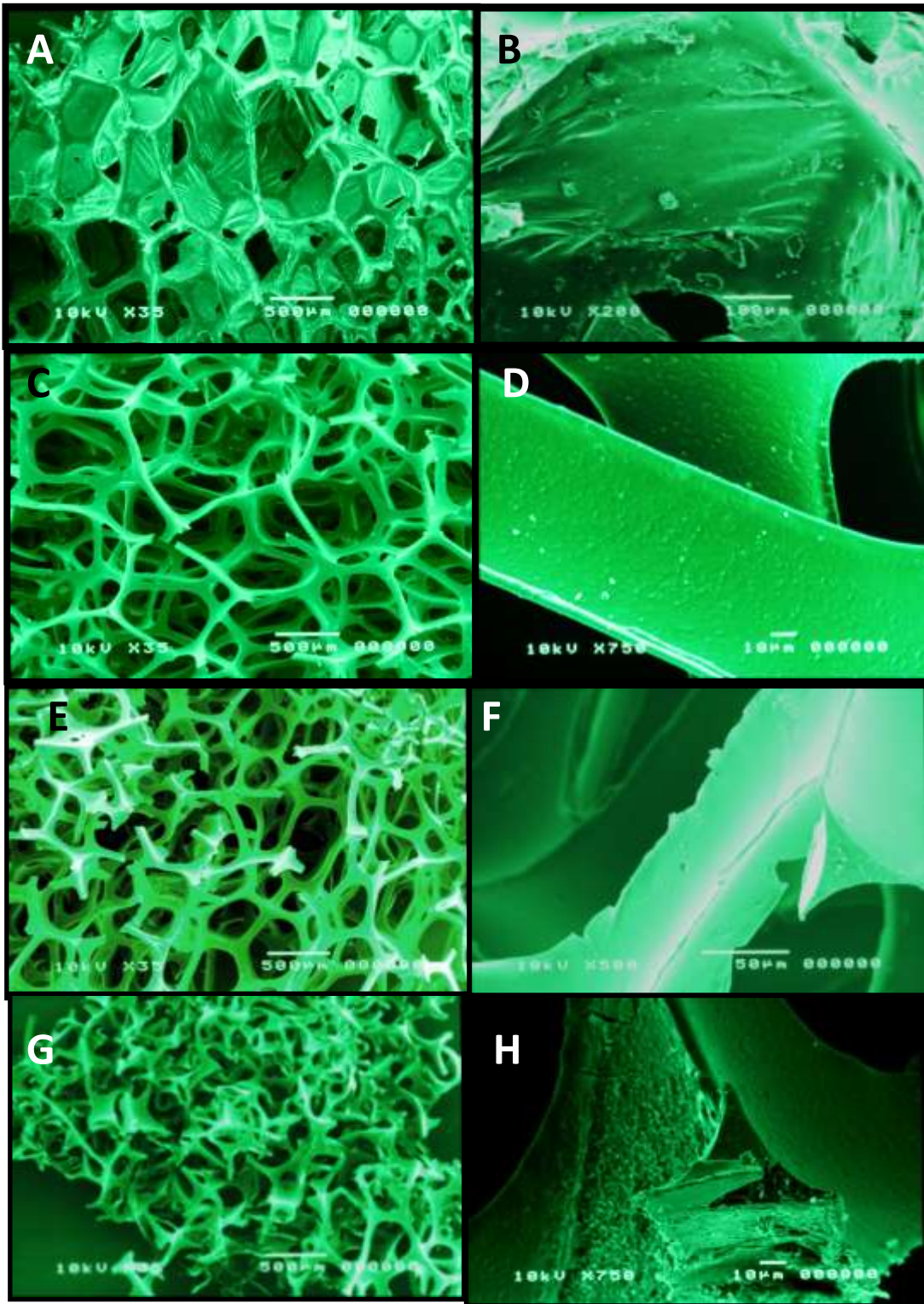


Figura 8: A. Matriz original con aumento x35; B. Matriz con aumento x200; C. Muestra control después de cien días con aumento x35; D. Muestra control después de cien días con aumento x750; E. Muestra sometida diez días con el hongo con aumento x35; F. Muestra sometida diez días con el hongo con aumento x500; G. Muestra sometida cien días con el hongo con aumento x35; H. Muestra sometida cien días con el hongo con aumento x750.

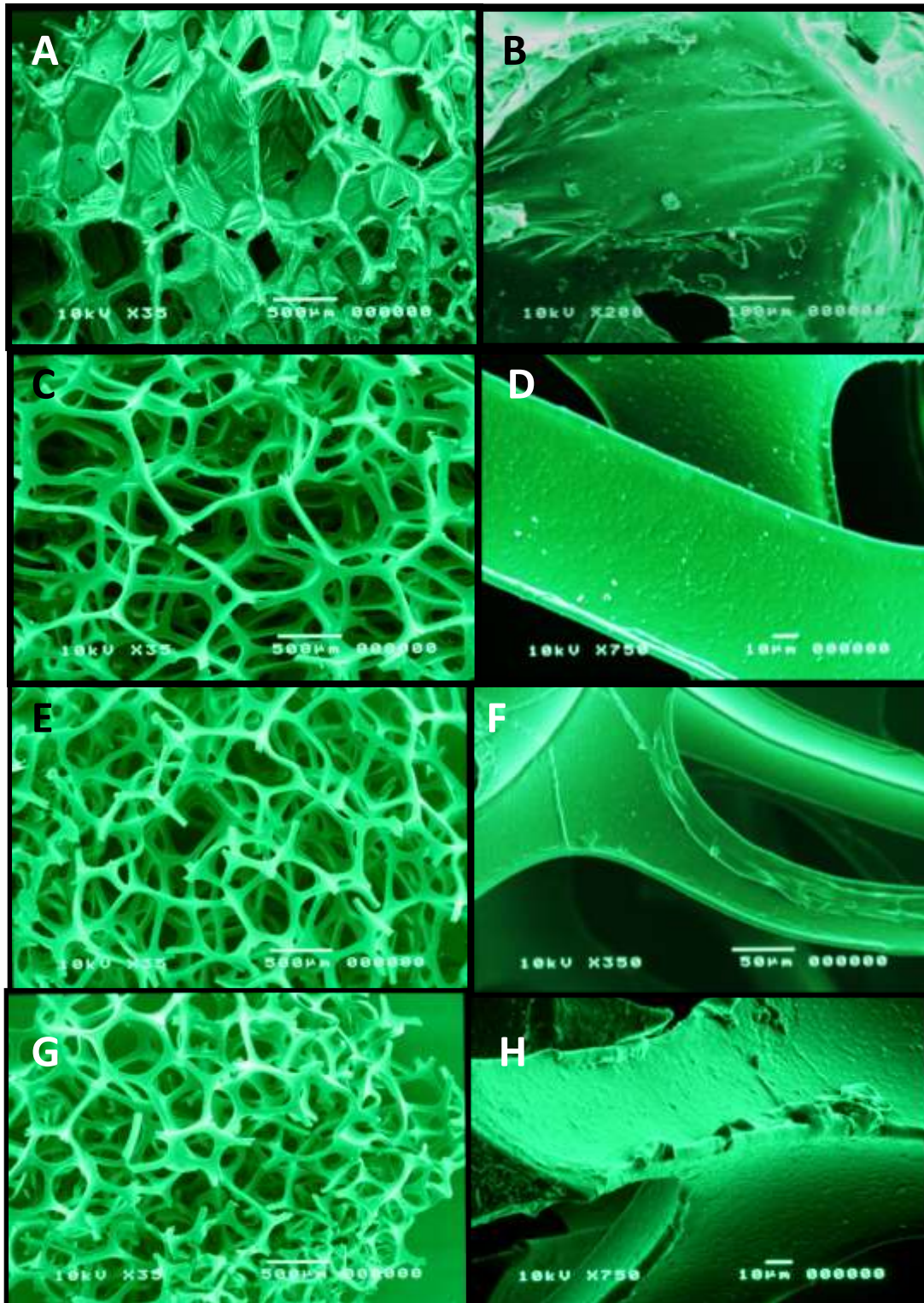


Figura 9: A. Matriz original con aumento x35; B. Matriz con aumento x200; C. Muestra control después de cien días con aumento x35; D. Muestra control después de cien días con aumento x750; Muestras sometidas a la especie 23.1: E. Muestra sometida diez días con el hongo con aumento x35; F: Muestra sometida diez días con el hongo con aumento x350; G. Muestra sometida cien días con el hongo con aumento x35; H. Muestra sometida cien días con el hongo con aumento x750.

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Laura Ayala Bucheli, CI 1714399662 autora del trabajo de graduación titulado “Estudios en degradación de poliuretano por hongos endófitos del género *Pestalotiopsis*”, previa a la obtención del grado académico de LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de Conformidad con el artículo 144 de la ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENECYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea entregado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual.

Quito, 10 de noviembre de 2015

Srta. Laura Ayala Bucheli

C.I. 1714399662

REVISTA INTERNACIONAL DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

Normas para autores/as

Para evitar retrasos en el proceso de revisión de los trabajos sometidos, es recomendable que los autores se aseguren que su texto no tenga errores de morfosintaxis, independientemente de que estén escritos en español o en inglés. Asimismo, es imprescindible que las referencias, tanto las citadas en el texto como las de la lista de ellas, se ciñan exactamente a lo establecido en las Instrucciones para los autores. La claridad y orden con que un trabajo esté redactado facilitará la labor de los árbitros y hará más rápido el proceso de revisión.

Es **OBLIGATORIO** incluir, en la **sección de comentarios al editor**, los nombres, institución y direcciones de correo electrónico de **al menos** dos posibles revisores para su manuscrito, que no deberán pertenecer a la institución de trabajo de alguno de los autores. **DE NO INCLUIR AL MENOS DOS REVISORES, EL MANUSCRITO NO SERÁ PROCESADO.**

Extensión de los manuscritos

Resumen: 250 palabras; Texto: 5000 palabras

Extensión comunicaciones breves

Texto: 2500 palabras sin contar las referencias y 4 figuras

Instrucciones

1. Los artículos deben someterse en línea a través de la siguiente dirección:

<http://www.revistas.unam.mx/index.php/rica.html>

Deberán prepararse en algún procesador de textos comun (Word de Microsoft, LibreOffice, OpenOffice o similares) pueden ser escritos en español o en inglés y los dos resúmenes (uno en cada idioma) deben incluirse al principio.

2. El título se escribe con mayúsculas.
3. Los **nombres de los autores** y **sus instituciones NO** deben incluirse en el archivo sometido pero serán capturados en el paso Introducción de Metadatos del envío en línea. Asimismo, los **agradecimientos** deberán ser **excluidos** del manuscrito durante el proceso de arbitraje para asegurar el anonimato de los involucrados.
4. Las palabras clave se asientan en minúsculas.
5. Todos los manuscritos deben presentar subtítulos escritos con mayúsculas y centrados. Se sugieren los siguientes y en este orden: RESUMEN, ABSTRACT, INTRODUCCIÓN, MATERIALES Y MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSIÓN, CONCLUSIONES, AGRADECIMIENTOS y REFERENCIAS. En el caso de las revisiones, las comunicaciones breves y las notas técnicas, los títulos dependen de cada autor.
6. Cuando se incluye una abreviatura, debe explicarse la primera vez que se utilice en la forma siguiente: ... metil metano sulfanato (MMS). Las cifras decimales se separan con punto. Ejemplo: 38.5, el formato de las unidades métricas es con "/". Ejemplo: m/s, mg/kg, etc.
7. Las ilustraciones se expresan como figuras (con números arábigos) y cuadros (con números romanos). Deben incluirse al final del texto, aunque en la publicación son intercaladas en el mismo. Cuando las palabras "**figura**" y "**cuadro**" formen parte del texto, se anotan completas, con minúsculas y en letra negra; si se usan entre paréntesis pueden escribirse (**Fig. 1**) y (**Cuadro I**). Los pies de imagen se enlistan en hojas separadas al final del manuscrito. En los cuadros se incluye el encabezado de la siguiente manera: **CUADRO I. FRECUENCIA DE...**
8. La literatura citada se consigna al final, bajo el título de REFERENCIAS, en orden alfabético por autores, sin numeración. Cuando se mencionan varios artículos del mismo autor, éstos se presentan cronológicamente.

a. ARTÍCULOS EN REVISTAS

Cada una de las referencias contendrá los siguientes datos:

- i. Nombre del autor y colaboradores (en su caso), comenzando con el apellido paterno, seguido de las iniciales de los nombres.
- ii. Año de la publicación entre paréntesis.

- iii. Título completo del artículo.
- iv. Nombre abreviado de la revista en que apareció (si la revista no tiene abreviatura, no poner punto entre el nombre y el número del volumen).
- v. Volumen, páginas de inicio y conclusión del artículo.

Ejemplos:

Hostettler F. D., Pereira W. E., Kvenvolden K. A., van Genn A., Luoma S. N., Fuller C. C. y Anima R. (1999). A record of hydrocarbon input to San Francisco Bay traced by biomarker profiles in surface sediment and sediment cores. *Mar. Chem.* 64, 115-127.

Simoneit B.R.T. (1984). Organic matter of the troposphere: III. Characterization and sources of petroleum and pyrogenic residues in aerosols over the western United States. *Atmos. Environ.* 18, 51-67.

D'Ascenzo G., Gentili A., Marchese S., Marino A. y Perret D. (1998). rapid and simple method for extraction and determination of imidazolinone herbicide in soil. *Analisis* 26, 251-255.

b. LIBROS

- i. Nombre del autor y colaboradores (en su caso), comenzando con el apellido paterno, seguido de las iniciales de los nombres.
- ii. Año de la publicación entre paréntesis.
- iii. Título del libro en letras normales.
- iv. Edición (de la segunda en adelante).
- v. Casa editorial, ciudad de publicación, país y páginas totales.

Ejemplos:

APHA (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. 20a ed. American Public Health Association. Washington, EUA. 1325 pp.

Stoker M.S. y Seager S.L. (1981). Química ambiental; contaminación del aire y del agua. Blume, Barcelona, 320 pp.

c. CAPÍTULOS EN LIBROS

- i. Nombre del autor y colaboradores (en su caso), comenzando con el apellido paterno, seguido de las iniciales de los nombres.
- ii. Año de la publicación entre paréntesis.
- iii. Título del capítulo En: título del libro.
- iv. Entre paréntesis, nombre del(los) editor(es), comenzando con las iniciales de los nombres seguido del apellido paterno.
- v. Casa editorial, ciudad de publicación, país y páginas de inicio y conclusión.

Ejemplos:

Tulloch A.P. (1976). Chemistry of waxes of higher plants. En: Chemistry and biochemistry of natural waxes. (P.E. Kolattukudy, Ed.). Elsevier, Amsterdam, Holanda, pp. 235-287.

Underbrink A.C., Schairer L.A. y Sparrow A.H. (1973). Tradescantia stamen hairs: a radiobiological test system applicable to chemical mutagenesis. En: Chemical mutagens: principles and methods for their detection (A. Hollaender, Ed.). Plenum Press, Nueva York, EUA, Vol. 3, pp. 71-207.

d. TESIS

- i. Nombre del autor, comenzando con el apellido paterno, seguido de las iniciales de los nombres.
- ii. Año de la publicación entre paréntesis.
- iii. Título de la tesis.
- iv. Grado obtenido.
- v. Dependencia, universidad.
- vi. Ciudad de publicación, país y páginas totales.

Ejemplos:

Alvarado L. (2001). Cuantificación de arsénico y flúor en agua de consumo en localidades de seis estados de la República Mexicana con hidrofluorosis endémica. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, México, 78 pp.

García Meza M.R. (2003) Aplicación preliminar del modelo fotoquímico de calidad del aire CIT para simular la dispersión de contaminantes atmosféricos en la Zona Metropolitana de Guadalajara. Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente. Tlaquepaque, Jalisco, México, 115 pp.

e. MEMORIAS DE CONGRESO

- i. Nombre del autor y colaboradores (en su caso), comenzando con el apellido paterno, seguido de las iniciales de los nombres.
- ii. Año de la publicación entre paréntesis.

- iii. Título completo de la ponencia.
- iv. "Memorias".
- v. Nombre del congreso o simposio.
- vi. Lugar y fecha del congreso o simposio.
- vii. Páginas de inicio y conclusión, o formato de almacenamiento.

Ejemplos:

Mejía S.G.M., Sauri R.M.R. y Arias E.D. (2002). Manejo de los residuos peligrosos en Yucatán. Memorias. XIII Congreso Nacional 2002 de la Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales. Guanajuato, Gto. 17 al 20 de abril, 2002. CD-ROM.

f. DOCUMENTOS OFICIALES E INSTITUCIONALES

- i. Abreviatura institucional.
- ii. Año de la publicación entre paréntesis.
- iii. Nombre del documento.
- iv. Nombre completo de la institución.
- v. Tipo de documento, ciudad de publicación y páginas.

Ejemplo:

USEPA (2001). EPA-816-K-02-018. Implementation guidance for the arsenic rule. Office of Ground Water and Drinking Water, United States Environmental Protection Agency. Manual. Washington, DC. 83 pp.

g. NORMAS OFICIALES

- i. Abreviatura institucional.
- ii. Año de la publicación entre paréntesis.
- iii. Clave de la Norma, título completo.
- iv. Nombre completo de la institución que promueve la Norma.
- v. Casa editorial o institución que publica la Norma, fecha de publicación.

Ejemplo:

SEMARNAT (1996). Norma Oficial Mexicana NOM-003-CNA-1996. Requisitos durante la construcción de pozos de extracción de agua para prevenir la contaminación de acuíferos. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Diario Oficial de la Federación. 6 de enero de 1997.

SSA (1998). Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. Secretaría de Salud. Diario Oficial de la Federación. 7 de mayo de 1999.

h. PÁGINAS ELECTRÓNICAS

Sólo se aceptarán páginas hospedadas por instituciones que respalden una investigación o cuerpo de información.

- i. Nombre del autor y colaboradores (en su caso), comenzando con el apellido paterno, seguido de las iniciales de los nombres.
- ii. Año de la publicación entre paréntesis.
- iii. Título completo del artículo [en línea].
- iv. Dirección de la página electrónica donde se hospeda el documento.
- v. Fecha de consulta dd/mm/aa

Ejemplos: □BOLPRIAVEN (2007). Base de datos Agroalimentaria de Venezuela. Indicadores de la producción agrícola: tabla variable con la distribución porcentual del volumen de producción por entidad federal [en línea]. <http://www.bolpriaven.com/website/bdatop.asp> 06/02/2009

i. PATENTES

Elementos:

- i. Nombre(s) del(os) inventor(es)
- ii. Año de concesión oficial
- iii. Título de la patente
- iv. País y número de la patente
- v. Clasificación de la patente
- vi. Fecha de concesión oficial
- vii. Número y fecha de solicitud de la patente
- viii. Paginación

Ejemplo:

Cook E. A. y Gottschlich C.F. 1980. Reducing metal oxide formation a continuos metal sheet in the hot dip coating. EUA, patente No. 4,183,983. (C1.427-321; C23C1/02), 15 ene 1980. Solicitud 934,627, 17 ago 1978. 8 pp.

9. CITAS EN EL CUERPO DEL TEXTO

a. Cuando son uno o dos autores, se deberá anotar entre paréntesis el apellido de cada uno y el año de publicación, sin coma intermedia. Si se citan múltiples autores, éstos se presentan en orden cronológico y se separan por una coma.

Ejemplo:

[...] se determinaron como los principales contaminantes a los bióxidos de azufre y de nitrógeno (Álvarez 1983, Martínez y Álvarez 1989, Jiménez 1997).

b. Cuando son más de dos autores, se asienta el apellido del primer autor, seguido por *et al.* en cursiva. En caso de que el nombre del autor forme parte de la redacción del escrito, únicamente se pondrá paréntesis al año de publicación.

Ejemplo:

[...] los principales contaminantes determinados por Álvarez *et al.* (1983) fueron los bióxidos de azufre y de nitrógeno.

c. Si se trata de un autor institucional (documentos y normas oficiales), se anotan las siglas oficiales y el año de publicación.

Ejemplo:

[...] se compararon los resultados con los máximos permitidos por la NOM-177-SSA1-1998 (SSA 1998).

10. Se recomienda que en la redacción del texto se use la forma impersonal, inclusive en los agradecimientos.

11. Es necesario que los autores remitan el título resumido de su trabajo para formar las cornisas de las páginas impares, así como el título completo en inglés para la tabla de contenidos.

12. Si se incluyen cuadros y figuras tomadas de otras publicaciones, se debe remitir una copia de la autorización del autor o del editor para que sea publicado.

13. Los autores que lo deseen pueden obtener copias de sus trabajos de la siguiente dirección electrónica:

<http://www.revistas.unam.mx/index.php/rica.html>

14. Una vez que un artículo es aceptado para su publicación, el autor está de acuerdo en que los derechos de su texto pasan a ser propiedad de la Revista Internacional de Contaminación Ambiental con las implicaciones legales que esto significa. Para la reproducción de cualquier artículo o parte de él, por cualquier medio, se deberá contar con la autorización por escrito del Editor de la Revista Internacional de Contaminación Ambiental.