

Actividad biológica del licor negro, la lignina y la vinaza.

Biological activity of black liquor, lignin and vinasse.

Dávila, Juan¹; Sulbarán, Miguel²; Peña-Vera María²; Pérez-Pérez, Elizabeth^{*2}; Valecillos Nelson³

¹Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Sección de Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes

²Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIOMOL) Prof. Guillermo López Corcuera, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes.

³Centro de Estudios Ambientales, Programa de Formación de Grado en Gestión Ambiental, Universidad Bolivariana de Venezuela, Mérida 5101, Venezuela.
elimariana36@gmail.com

Resumen

Las aguas residuales provenientes de la industria y el papel (licor negro) y de la industria destilera (vinaza) poseen una elevada carga orgánica, por lo que su disposición en las fuentes de agua resulta ser en extremo contaminante, contribuyendo con la depleción de las fuentes de agua potable. En los últimos años se han experimentado una gran variedad de métodos de tratamiento para este tipo de efluentes industriales, pero además se ha creado una nueva corriente de pensamiento que dirige la investigación hacia la búsqueda de procedimientos de incrementar el valor agregado de estos compuestos, de modo que no sean simples efluentes de desecho sino la materia prima para nuevos procesos. Es por ello que en el presente trabajo se estudió la bioactividad de la vinaza, licor negro y la lignina precipitada a partir del licor negro, por medio del establecimiento de su actividad antioxidante y antimicrobiana. Se logró determinar los compuestos analizados poseen actividad antimicrobiana contra diversas especies de bacterias, hongos y parásitos considerados como patógenos humanos. Además, se determinó que la lignina precipitada y el licor negro poseen una actividad antioxidante alta, mientras que la actividad antioxidante de la vinaza es media-baja.

Palabras clave: licor negro, vinaza, lignina, actividad antimicrobiana, actividad antioxidante

Abstract

Wastewater from pulp and paper industry (black liquor) and from distilling industry (vinasse) has a high organic load, so its disposal in water sources turns out to be extremely polluting, contributing to the depletion of potable water resources. In recent years, a great variety of treatment methods for this type of industrial effluent have been experimented, but in addition a new current of thought has been created that directs research towards the search for procedures to increase the added value of these compounds, converting wastewaters in raw materials for new processes. For this reason in the present work was investigated the bioactivity of vinasse, black liquor and precipitated lignin precipitated through the establishment of its antioxidant and antimicrobial activity. It was possible to determine the compounds analyzed have antimicrobial activity against various species of bacteria, fungi and parasites considered as human pathogens. Furthermore, it was determined that the precipitated lignin and the black liquor have a high antioxidant activity, while the antioxidant activity of the vinasse is medium-low.

Keywords: Black liquor, vinasse, lignin, antimicrobial activity, antioxidant activity.

1 Introducción

Las principales fuentes de contaminación de cuerpos de agua pueden clasificarse como aguas residuales urbanas, industriales y agrícolas, definiendo aguas residuales como una combinación de los líquidos y residuos arrastrados por el agua, provenientes de zonas urbanas, rurales e industriales, junto a cualquier agua subterránea, superficial

o pluvial que pueda estar presente (Weng, 2019). De interés particular en este estudio son las aguas residuales industriales, las cuales pueden diferir tanto dentro como entre las empresas. El impacto de los vertidos industriales depende no sólo de sus características comunes, como la demanda bioquímica de oxígeno, sino también de su contenido en sustancias orgánicas e inorgánicas específicas (Ylmén y col., 2018).

Entre las aguas residuales que encontramos en la industria destilera, la cual comprende fábricas de cervezas, destilerías, fábricas de alcohol y ciertos compuestos químicos orgánicos, se encuentra la Vinaza. La Vinaza es el subproducto líquido de la producción de alcohol etílico en una destilería, cuyas características dependen básicamente de la materia prima utilizada, las cuales pueden ser melaza, azúcares de remolacha, azúcares de frutas, cereales (trigo, arroz, maíz, centeno), maltas de cereales y madera (Wilkie y col., 2000). En las plantas de Brasil, por cada litro de etanol producido se genera en promedio 13,7 litros de vinaza, y considerando la producción total de 30 billones de litros de etanol en el año 2015, la generación de vinaza fue de aproximadamente 411 billones de litros (Cavalett y col., 2012, UNICA 2016).

La Vinaza es un compuesto altamente coloreado, el cual es difícil de tratar mediante procesos biológicos convencionales como lodos activados o lagunas anaeróbicas (Jiménez y col., 2006). Además, la vinaza es recalcitrante debido a su contenido de Melanoidinas, polímeros responsables del color marrón en el residuo, que se forman por la reacción de Maillard entre los grupos aminos y los grupos carbonilos (Parnaudeau y col., 2008).

La descarga de la Vinaza en el ambiente es peligrosa y tiene un alto potencial de contaminación. Su alta Demanda Química de Oxígeno (DQO) de aproximadamente 40.000 mg/l significa que su descarga en los cuerpos de agua natural puede resultar en eutrofización (aumento gradual de la concentración de fósforo, nitrógeno y otros nutrientes en un ecosistema acuático), lo que causa un incremento de las concentraciones de algas y microorganismos en la superficie, impidiendo que entre la luz solar y el oxígeno necesario para la subsistencia de la vida subacuática (Gunkel y col., 2007). Sus componentes altamente coloreados (melanoidinas) también reducen la penetración de la luz solar en los ríos, lagos y lagunas, disminuyendo la actividad fotosintética y la concentración de oxígeno disuelto. La descarga en la tierra es igualmente dañina, causando una reducción en la alcalinidad del suelo y la presencia de manganeso, además inhibe la germinación de las semillas y causa la depleción de la vegetación (Paredes y col., 2015).

Otras de las aguas residuales de interés para el presente trabajo es el Licor Negro (LN) proveniente de la industria de la pulpa y el papel, nombre que se debe a su coloración oscura, y que está compuesto por una parte de materia orgánica (producto de la extracción de la lignina) y por otra inorgánica (principalmente de NaOH y Na₂S). El LN es usualmente quemado o recobrado químicamente, pero actualmente se están investigando procesos que permitirían recuperarlo disminuyendo el

daño que éste causa a la biósfera (Lora 2008). Además, es la mayor fuente de ligninas que se conoce, estimándose que sólo en los Estados Unidos de Norteamérica se generan 26 millones de toneladas de ligninas al año en la industria papelería (Mansouri y col., 2006).

La palabra lignina proviene del término latino *lignum* que significa madera; así, a las plantas que contiene una gran cantidad de ligninas se les denomina leñosas. La lignina se caracteriza por ser un complejo aromático (no carbohidratado) del que existen muchos polímeros estructurales (ligninas), es una macromolécula con un elevado peso molecular, que resulta de la unión de varios ácidos y alcoholes fenilpropiónicos (Ponomarenko y col., 2014). Después de la celulosa, la lignina es el polímero orgánico más abundante en el mundo vegetal y es la única fibra no polisacárida que se conoce. La lignina realiza múltiples funciones que son esenciales para la vida de las plantas, entre ellas: transporte interno de agua, nutrientes y metabolitos; proporciona rigidez a la pared celular y actúa como puente de unión entre las células de la madera, creando un material que es notablemente resistente a los impactos, compresiones, flexiones y ataques de microorganismos (Hansen y col., 2016).

Las características altamente contaminantes de la vinaza y el licor negro, combinado con sus altos niveles de producción, necesariamente ameritan un adecuado tratamiento y disposición final. En el caso de la vinaza, lo más frecuente es su aplicación en los campos de cultivo de caña de azúcar como fertilizante debido a sus altos niveles de materia orgánica y nutrientes (potasio, nitrógeno y fósforo) (Prado y col., 2013). Desde el punto de vista económico, esta es la alternativa más simple y menos costosa (mínima inversión inicial y costos de mantenimiento); sin embargo, tiene un adverso impacto ambiental, tales como incremento de la salinización y lavado de los nitratos del suelo, contaminación de las aguas superficiales, y empeoramiento del calentamiento global debido a la liberación de óxido nitroso (N₂O) (Gunkel y col., 2007; Paredes y col., 2015). En el caso del licor negro, la situación es mucho más complicada debido a su elevada DQO y coloración.

En los últimos años se ha considerado que para mejorar el potencial energético y la biosostenibilidad de los procesos industriales, las aguas residuales generadas de estos procesos no deben considerarse como materiales de desecho, sino que deben convertirse en materia prima para otros procesos. Este concepto es ahora inherente al campo del tratamiento biológico de efluentes industriales, en el que científicos y los avances tecnológicos de los últimos años han impulsado la creación de nuevas líneas de investigación dirigidas no solo a la idoneidad de los residuos depositados en el medio ambiente, sino también a la recuperación de energía y productos de estos efluentes.

Mediante este enfoque, las aguas residuales se consideran como un material para el proceso biotecnológico que puede generar energía y productos de valor agregado, desempeñando un papel primordial en control de la contaminación ambiental (Moraes y col., 2015; Solomon y col., 2011). Por ejemplo, una tecnología prometedora se enfoca en aprovechar la energía producida por ciertos microorganismos a partir de la oxidación anaeróbica de los compuestos orgánicos biodegradables, produciendo lo que se conoce como pilas de combustible microbianas. Varios de estos sistemas se están aplicando en el tratamiento de aguas residuales y para la valorización de productos de valor agregado como biofloculantes, bioplásticos, biosurfactantes, hidrógeno, metano e incluso electricidad (Moraes y col., 2015).

Es por todo lo mencionado anteriormente que este trabajo tiene como objetivo principal evaluar la bioactividad y toxicidad de la vinaza y el licor negro, así como de la lignina purificada a partir del licor negro. La bioactividad fue evaluada a través de ensayos de actividad antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria y antioxidante.

2. Marco metodológico.

2.1. Muestras.

2.1.1. Licores Negros (LN, LN10% y LN33%).

Las muestras de LN, a ambas concentraciones de sólidos disueltos (10% y 33% [p/v]) provienen de la planta Smurfit-Mocapel, localizada en la autopista San Felipe – Morón, Yaracuy, Venezuela. Las características fisicoquímicas de las muestras de licor negro usadas en este estudio se describen en la Tabla 1.

2.1.2. Lignina Precipitada (Lig10 y Lig33).

La Lignina se obtuvo de las muestras de Licor Negro al 10% y 33% de sólidos disueltos utilizando una modificación del método de Levanova (1992). Para ello se tomaron 10 ml de LN y se filtraron al vacío con un filtro Whatman N° 1 y diámetro 9,0 cm, con 10 ml de NaOH 0,1 N, se recogió el filtrado y se le agregaron 20 ml de NaOH 0,5% (p/v). La mezcla se incubó 1 h a 100°C en baño de María. Luego, se centrifugó a 3.000 rpm por 10 min. El sobrenadante se acidificó hasta pH 3 gota a gota, con agitación constante con ácido acético (CH₃COOH) al 20% (v/v). Posteriormente se centrifugaron las muestras a 3.000 rpm por 10 min. El pellet fue lavado con H₂O MQ caliente y se centrifugó nuevamente a 3.000 rpm por 10 min. El pellet obtenido se resuspendió con H₂O MQ y se vació en cápsulas de petri para colocarse a secar en una estufa a una temperatura no superior a 50°C durante aproximadamente 24 h. Las muestras de Lignina precipitada e Indulín C (análogo comercial de la Lignina) se prepararon a una concentración de 0,2% (p/v).

Tabla 1. Características fisicoquímicas de las muestras de Licor Negro usadas en este estudio.

Parámetro	Licor Negro	Vinaza
pH	12,5±0,3	3,9±0,2
Densidad (g/ml)	1,033±0,001	
Conductividad Eléctrica (mS)	29±1	15±1
Sólidos Totales (mg/l)	94.609±1.215	63.000±432
Sólidos Volátiles (mg/l)	31.188±1.036	48.000±245
Sólidos Fijos (mg/l)	58.411±1.765	15.000±320
Fenoles (mg/l)	9.350±655	1.800±123
DBO (mg/l)	1.866±294	11.256±298
DQO (mg/l)	75.000-11.000±2.395	58.195±278

2.1.3. Vinaza.

La muestra de Vinaza fue obtenida en la Destilería Campo Elías (Ejido, Edo. Mérida), donde se utiliza como materia prima la melaza, que es un producto secundario de la producción de azúcar, a una temperatura media de extracción de 70°C. Las características fisicoquímicas de las muestras de Vinaza se describen en la Tabla 1. Para usar las muestras de vinaza en los ensayos de toxicidad y bioactividad la misma se diluyó 1/100.

2.2. Reactivos.

Los reactivos Agar Tripticasa Soya, Caldo Tripticasa Soya, Caldo Dextrosa Soboreaud, Extracto de Levadura y Agar Dextrosa Soboreaud fueron proveídos por HiMedia Laboratories Limited; mientras que el Ketokenasol, Dimetilsulfóxido (DMSO), Caféina, NADH, NBT, PMS, H₂O₂, Deoxirribosa, Ácido Tiobarbitúrico (TBA), EDTA, Quercitina, Melatonina, ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)], Trolox, Cloruro de Hierro, BHT, SDS, 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP), Sulfato de Amonio ferroso, Xylenol Orange, Ácido Úrico y Vitamina C fueron proveídos por Sigma. Los reactivos NaOH, Ácido acético, NaCl, KCl, Na₂PO₄, Glucosa, Tryptosa, Extracto de Levadura, Persulfato de Potasio, Etanol, Ácido Acético, Cloruro de Manganeso, Ácido sulfúrico, Metanol grado HPLC, FeCl₂, Ácido Lipoico y Ácido Tricloroacético (ATA), y Extracto de Hígado fueron proveídos por Merck. El Suero fetal bovino, Trietanolamina y Hemina por GIBCO BRL.

2.3. Medios de cultivo

2.3.1. Medio LIT Suplementado (100 ml): se agregaron 10 ml de medio base 10X, 5 ml de suero fetal bovino, 0,5 ml de Hemina y 84,5 ml de H₂O MQ. Posteriormente, se le agregaron 0,2 ml del antibiótico Gentamicina (40 mg).

2.3.2. Medio Base 10X: compuesto por NaCl 4%, KCl 0,4%, Na₂PO₄ 2%, Glucosa 0,5%, Tryptosa 5%, Extracto de Levadura 5%, Extracto de Hígado 5%. Se ajustó el pH a 2 unidades y se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión por 15 min. Luego se almacenó a 4°C.

2.3.3. Suero Fetal Bovino (SFB) inactivado: el producto comercial inactivado, se activó mediante un calentamiento en baño de maría a 50°C por 10 min.

2.3.4. Solución de Hemina: se colocaron en un vaso 2,5 ml de H₂O MQ más 2,5 ml de Trietanolamina 5%, se mezcló bien y se agregaron 20 mg de Hemina. Se agitó y se filtró con un filtro Millipore de 0,22 µm. Esta solución se guardó en la nevera a 4°C.

2.4. Cepas Utilizadas.

Las cepas bacterianas *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), se mantienen en el cepario del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (Mérida, Venezuela); mientras que las cepas *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*, fueron obtenidas en el Instituto Hospital Universitario de la Universidad de Los Andes (IHULA) del Estado Mérida (Venezuela).

También se usaron cepas de las levaduras *Candida albicans* y *Candida krusei*, y las cepas de parásitos *Leishmania mexicana* AZV y *Trypanosoma cruzi* PM, las cuales se mantienen en el cepario del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes (Mérida, Venezuela). Por último, se usaron larvas del crustáceo *Artemia salina*, los cuales son pequeños crustáceos pertenecientes a la clase Branchiopoda y orden Phyllopoda, obtenidas a través de la eclosión de huevos descascarados (Brine Shrimp Eggs, 1989 San Francisco Bay Brand, INC).

2.5. Ensayos de actividad antibacteriana y antifúngica.

Primero se realizó un preinóculo con asa de cada una de las cepas en 1 ml de caldo Trypticasa de Soya al 4,0% (p/v) para las cepas bacterianas, y en 1 ml de Caldo Dextrosa Saboureaud al 4,0% (p/v) para cepas de levaduras. Estos preinóculos se incubaron durante 24 h a 37°C.

Luego, se procedió a preparar el Agar Blando mezclando el preinóculo anterior con 2 ml de Agar Trypticasa Soya al 3,5% (p/v) para las cepas bacterianas y con 2 ml de Agar Dextrosa Saboureaud al 3,5% (p/v) para las levaduras. Después, se vació la mezcla en una placa de Petri con una base de Agar Trypticasa Soya (para las bacterias) y Agar Dextrosa Saboureaud (para las levaduras). Se dejó secar y se procedió a sembrar en placa, con la ayuda de una cuadrícula, 5 µl de cada muestra en estudio y los diferentes controles. Estas placas se incubaron a 37°C por 24 h y se observaron los resultados. Los resultados se consideran positivos cuando se observa un halo de inhibición que

puede ir de turbio a traslúcido, y negativo cuando no se observan halos de inhibición.

2.6. Ensayos de Bioactividad con parásitos.

Los parásitos se usaron en fase exponencial de crecimiento en medio LIT suplementado. La cantidad óptima de parásitos se encontró entre 3x10⁶ a 4x10⁶ p/ml, contados en la cámara de Neubauer. Se emplearon tres distintas cantidades del compuesto de prueba, según se describe en la Tabla 2.

En todos los casos se incubó el medio LIT estéril y junto con los parásitos durante 4 horas a 26°C. Posteriormente, se adicionaron cada una de las muestras a las que se les quiere evaluar la actividad antiparasitaria, según los volúmenes indicados en la Tabla 2. Posteriormente, se incubaron a 26°C y se evaluaron los parámetros de mortalidad, tamaño y cantidad de las rosetas, mediante la utilización de un microscopio objetivo invertido a las 24, 48 y 72 horas, según la metodología de Vargas (1999).

Tabla 2. Estructura de los Ensayos para Evaluar la Actividad Antiparasitaria de las Muestras de Licor Negro, Vinaza y Lignina precipitada.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Volumen de medio LIT estéril (µl)	105	85	60
Volumen de Parásitos en medio LIT (µl)	40	40	40
Volumen de la muestra (µl)	5	25	50

2.6. Estudio de la capacidad antioxidante.

2.6.1. Estudio de la Capacidad Antioxidante sobre el Anión Superóxido.

Para la generación del anión superóxido oxígeno molecular es oxidado al anión superóxido (O₂^{•-}) gracias a la interacción que ocurre entre el PMS y el NADH. Una vez generado el O₂^{•-}, éste es capaz de reducir al NBT y detectarse el cambio de absorbancia a 560 nm (Rice-Evans y col., 1991). Se desarrolló un microensayo adaptando el método descrito por Rice-Evans *et al.*, (1991). La mezcla de reacción contenía un volumen de muestra a analizar de 20 µL, 50 µL de NADH 120 mM, y 50 µL de NBT 0,1 mM. Después de una incubación a temperatura ambiente durante 10 min, la reacción fue iniciada por la adición de 15 µL de PMS 40 mM. Posteriormente, fue registrado el cambio en absorbancia a 560 nm durante los primeros 3 min de la reacción.

2.6.2. Estudio de la Capacidad Antioxidante sobre el Radical Hidroxilo.

Fue utilizado el método de la desoxirribosa descrito por Halliwell y col. (1987), en el que el radical hidroxilo es generado por medio de la Reacción de Fenton, en la cual el ion ferroso oxida al peróxido de hidrógeno para formar la especie OH•. En presencia del radical hidroxilo, la desoxirribosa es fragmentada hasta Malondialdehído (MDA) que forma un complejo detectable a 532 nm con el Ácido Tiobarbitúrico (TBA). Para una mezcla que contenía 0,1 ml de desoxirribosa 28 mM, se agregaron 0,5 ml de buffer fosfato 40 mM (pH 7,4), 0,1 ml de FeCl₃ 1 mM, 0,1 ml de EDTA 1,04 mM, 0,1 ml de H₂O₂ 1mM, y 0,1 ml de vitamina C 1 mM, además de 200 µL de cada una de las muestras a ser analizadas. La mezcla fue incubada durante 1 h a 37°C, se le agregaron 0,5 ml de TBA 1% en 0,05 M de NaOH y 0,5 ml de ácido tricloroacético 2,8% (v/v), y se dejó reaccionar durante 10 min a 100°C. Fue leído el cambio de absorbancia a 532 nm.

2.6.3. Método de la Actividad Antioxidante (AOA).

El valor de AOA fue determinado usando el método de Koracevic y col. (2001). En este método una solución estandarizada de Fe-EDTA reacciona con el peróxido de hidrógeno, produciendo la formación del radical hidroxilo. Este radical libre degrada el benzoato, resultando en la liberación de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esta reacción fue monitoreada espectrofotométricamente, y la inhibición del desarrollo de color en presencia de antioxidante es definida como AOA, en comparación con ácido úrico como estándar.

2.6.4. Método del ABTS⁺: Ensayo de Decoloración en solución etanólica.

El ABTS fue disuelto en agua a una concentración de 7 mM. El catión radical ABTS (ABTS⁺) fue producido por la reacción de la solución stock de ABTS 7 mM con persulfato de potasio a una concentración final de 2,45 mM (en agua), en oscuridad durante 12-16 h antes de su uso. Para el estudio de compuestos fenólicos, la solución de ABTS⁺ fue diluida con etanol hasta una absorbancia de 0,70 (±0,02) a 734 nm y 30°C. Se tomaron 10 µl de compuestos a ensayar (Lig 10%, Lig 33% e Indulín C, 3 mg/ml; Quercitina y Ácido Úrico, 1 µM, LN10% y LN33%, 0,09%; Vinaza, dilución 1/10) y se colocaron en la cubeta del espectrofotómetro con 1,0 ml de la solución de ABTS⁺. Entonces fueron medidos los valores de densidad óptica a 734 nm 1 min y 6 min después de la mezcla. Se usó como estándar una solución de 8 mM de Trolox, la cual fue diluida para obtener concentraciones finales de 1, 2, 4 y 8 µM, en buffer PBS 5 mM (pH 7,4) (el cual es usado para antioxidantes en plasma y para el patrón). Se calculó el porcentaje de disminución de color (o de secuestro del catión radical ABTS) a 734 nm después de 6 min de reacción y se realizó una gráfica del porcentaje de disminución de color en función de las diferentes concentraciones del estándar (Trolox), y se reportó el valor de actividad antioxidante total equivalente

de trolox (TEAC) de las muestras problemas en comparación con la ecuación de la recta obtenida con este gráfico. El valor de TEAC para una muestra dada sería el equivalente en concentración de Trolox que produce el mismo porcentaje de disminución de color. Todas las determinaciones fueron llevadas a cabo por lo menos tres veces, para cada una de las muestra y soluciones estándar.

2.7. Análisis estadístico.

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado aplicando los test o pruebas paramétricas, para el análisis de distribución normal o diferencias significativas entre los grupos de muestra. Se empleó el sistema cuantitativo mediante el uso de técnicas estadísticas, empleándose el análisis de la varianza por medio de la prueba ANOVA *post hoc* Scheffé (Sote 2005; Devore 2008).

3 Resultados y Discusión.

3.1. Actividad antimicrobiana del Licor Negro, Vinaza y Lignina Precipitada.

La actividad antimicrobiana del Licor Negro, Vinaza y Lignina precipitada fue estudiada sobre varias cepas patógenas de bacterias y levaduras. El estudio consistió en evaluar la inhibición del crecimiento de los diferentes microorganismos en presencia o ausencia de cada una de las muestras, en comparación con compuestos químicos cuya actividad antimicrobiana y antimicótica ya ha sido ampliamente estudiada. Los resultados se presentan en la Tabla 3. Se observa que todas las muestras estudiadas presentaron actividad inhibitoria definida contra *Shigella dysenteriae* y *Staphylococcus aureus*, mientras que el licor negro a concentraciones de 10 y 33% de sólidos disueltos tienen actividad cuestionable contra *Escherichia coli* (ECEP) y *Escherichia coli* (ECEI). Las muestras de lignina obtenidas del licor negro a 10 y 33% de sólidos disueltos presentaron actividad cuestionable contra *Escherichia coli* (ECEP), y actividad inhibitoria definida contra *Escherichia coli* (ECET). En el caso de la vinaza, la misma mostró actividad inhibitoria definida contra *Escherichia coli* (ECEI), *Shigella dysenteriae* y *Staphylococcus aureus* (Tabla 3). Ninguna de las muestras estudiadas mostró actividad antibacteriana contra *Salmonella typhimurium* (Tabla 3).

En lo que se refiere a la actividad antimicótica, todas las muestras presentaron actividad inhibitoria definida contra *Candida albicans*, mientras que solo los extractos de lignina mostraron actividad inhibitoria del crecimiento contra *Candida krusei* (Tabla 3). El Indulín C mostró actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* (ECET), *Escherichia coli* (ECEI), *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

Se ha reportado previamente la actividad antimicrobiana de la lignina y el licor negro. Por ejemplo, Klein y col. (2019) realizaron estudios de actividad antimicrobiana de los revestimientos de poliuretano a base de lignina, confirmando la capacidad de la lignina Kraft contra microorganismos especiales tales como *S. aureus*, y que

los derivados de Trifenilmetano (verde brillante, violeta cristal) aumentaron significativamente este efecto antimicrobiano.

Por otra parte, Maulidiyah y col. (2018) evaluaron la actividad antibacteriana contra 4 especies de bacterias (*E. coli*, *S. aureus*, *S. typhi*, y *Xanthomonas oryzae*) mostrando una buena actividad antibacteriana para cada prueba con diámetros de halos de inhibición de ± 20 nm, concluyendo que los compuestos derivados de lignina pueden ser usados como antibacterianos naturales y Kosíková (1994) probaron la actividad antimicótica de varios tipos de lignina, así como muestra de lignina modificadas por oxidación, demostrando una mayor actividad de las muestras naturales de aquellas modificadas por oxidación contra *C. tropicalis*, *Trichosporon cutaneum* y *C. albicans*.

Se considera que la lignina es una enorme fuente natural de agentes antimicrobianos debido a su composición fenólica polimérica con 11 monómeros de grupos fenólicos, con una alto contenido de ácidos cumárico y ferúlico (Dizhbite y col., 2004; Espinoza-Acosta y col., 2016). De los estudios llevados a cabo de la actividad antimicrobiana de la lignina se ha concluido que su poder antimicrobianos depende de la fuente de origen, método de extracción, concentración en el medio de cultivo, estructura química y tipo de microorganismo (Espinoza-Acosta y col., 2016).

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de las Muestras de Licor Negro, Vinaza y Lignina Precipitada.

Microorganismo	Extractos								
	L1	L3	Li1	Li3	Vi	In	Am	Sul	Ket
<i>Escherischia coli</i> (ECEP)	+	+	+	+	-	-	-	++	-
<i>Escherischia coli</i> (ECET)	-	-	+++	++	-	++	-	++	-
<i>Escherischia coli</i> (ECEI)	+	+	++	++	++	++	-	++	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	-	++	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	-
<i>Candida albicans</i>	++	++	++	++	++	++	-	-	+
<i>Candida krusei</i>	-	-	++	++	-	-	-	-	++

(-) Actividad no detectable; (+) Actividad cuestionable; (++) Actividad inhibitoria definida entre 1-2 mm; (+++) Actividad inhibitoria definida entre 3-6 mm. L1, Licor negro 10% (p/v); L3, Licor negro 33% (p/v); Li1, Lignina precipitada proveniente de la muestra de L1; Li3, Lignina precipitada proveniente de la muestra de L3; Vi, Vinaza; In, Indulín C; Am, Ampicilina; Sul, Sultamicina; Ket, Ketokenasol. Las muestras L1 y L3 se diluyeron hasta una concentración de 0,09% (p/v); las muestras Li1, Li3 e In, se prepararon a una concentración de 0,2% (p/v); Am, Sul y Ket, a una concentración de 1 mM.

En cuanto a la actividad antimicrobiana del licor negro, Dizhbite y col. (2004) demostraron que el licor negro producido a partir de bagazo y tallos de algodón fue efectivo contra bacterias gran positivas (*Bacillus subtilis* y *Bacillus mycoides*), pero no contra bacterias gran negativas (*E. coli*) y hongos filamentosos (*Aspergillus niger*). Durmaz y col. (2015) usaron el licor negro Kraft a varias concentraciones como protector de la madera contra agentes biológicos, tanto las muestras de madera de prueba como las de control se probaron para determinar la resistencia a los hongos de la pudrición parda *Coniophora puteana* y *Poria placenta*. Seis semanas de exposición a los hongos de pudrición parda, *C. puteana* y *P. placenta*, resultaron en una notable pérdida de peso de las muestras control comparadas con muestras de prueba. Después de seis semanas de exposición a ambos hongos, la pérdida de peso de las muestras de control fue más de 25%, mientras que la pérdida de peso de las muestras de prueba fue inferior al 3%. Estos resultados indican que el licor negro mejora la durabilidad de la albura de pino silvestre. Se puede afirmar que los carbohidratos productos de degradación, resinas y ácidos grasos, extractos y los materiales inorgánicos en el licor negro utilizado en el proceso mostraron inhibición de la actividad fúngica.

En las Tablas 4 y 5 se presentan los resultados de la evaluación de la actividad antiparasitaria de las muestras en estudio, la cual fue evaluada sobre varias cepas patógenas de parásitos humanos, específicamente, *Tripanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana*. El estudio consistió en evaluar la inhibición del crecimiento de los diferentes microorganismos en presencia o ausencia de cada una de las muestras a estudiar, a diferentes concentraciones de las muestras problema. Además, a diferencia del caso de la evaluación de la actividad antimicrobiana, se evaluaron parámetros cualitativos como la presencia y tamaño de las rosetas.

Se puede observar en las Tablas 4 y 5 que las muestras de vinaza no tienen efecto sobre *T. cruzi*, pero que logran inhibir 50% el crecimiento de *L. mexicana* a las 48h, con rosetas moderadas de tamaño mediano. En lo que se refiere a las muestras de licor negro, lignina e indulín C, todas logran inhibir entre 50 y 75% (dependiendo de la muestra) la supervivencia de los parásitos en estudio, con una cantidad de rosetas escasa y moderada, y de tamaño pequeño a mediano (Tablas 4 y 5). Llama la atención que la muestra de lignina obtenida a partir del licor negro a 33% de sólidos disueltos inhibió por completo la formación de rosetas, tanto para *T. cruzi* como *L. mexicana* (Tablas 4 y 5). No existe hasta la fecha reportes en la literatura acerca de la actividad antiparasitaria de muestras de licor negro o lignina, siendo los resultados encontrados en este trabajo el primer reporte de este tipo de actividad en estos compuestos.

Tabla 4. Actividad anti *Trypanosoma cruzi* de las muestras de Licor Negro, Vinaza y Lignina precipitada.

Muestra	Sobrevivencia		Cantidad de rosetas		Tamaño de las rosetas	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Vi	V	V	mod	mod	med	med
L3	V	25%	esc	esc	peq	peq
L1	V	50%	mod	mod	med	med
Li3	V	25%	SR	SR	SR	SR
Li1	V	25%	mod	mod	med	med
In	V	50%	mod	mod	med	med

(esc) escasa, (mod) moderada, (ab) abundante, (peq) pequeña, (med) mediana, (gd) grande, (SR) sin rosetas, (V) todos vivos. El porcentaje se refiere al porcentaje de sobrevivencia. Vi, vinaza; L1, Licor negro 10% (p/v); L3, Licor negro 33% (p/v); Li1, Lignina precipitada proveniente de la muestra de LN10; Li3, Lignina precipitada proveniente de la muestra de LN33; In, indylín C. Las muestras L1 y L3 se diluyeron hasta una concentración de 0,09% (p/v); las muestras de Li1, Li3 e Indulín C, se prepararon a una concentración de 0,2% (p/v); la vinaza se diluyó 1/100.

En lo que se refiere a la inhibición de formación de rosetas por parte de la lignina proveniente del licor negro al 3% de sólidos disueltos, se cree que esta capacidad de formación de rosetas se debe a la acción de una serie de proteínas conocidas como lectinas. Boyd y Sapeigh (1954) introdujeron el termino lectina para definir a las hemaglutininas provenientes de plantas, pero debido al poco conocimiento de las funciones fisiológicas de las lectinas, el término no tuvo buena aceptación. Posteriormente, el término lectina se amplió para incluir proteínas de cualquier fuente que se unen a carbohidratos (Goldstein 1980). La definición de lectinas que se mantiene hasta la actualidad es que son glicoproteínas, de origen no inmunológico, capaces de reconocer azúcares o glicoconjugados de manera específica (Hartmut 1988).

La propiedad aglutinante de las lectinas abarca células rojas de humanos y animales, y otros tipos celulares como linfocitos, plaquetas, células malignas y espermatozoides. También pueden aglutinar bacterias, levaduras, protozoarios y algunos virus. Entre los microorganismos patógenos al hombre donde se han identificado lectinas se encuentran las especies de *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Entamoeba*, *Gradia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, entre otras. La interacción entre el parásito y la célula huésped es un proceso complejo que involucra varios pasos, múltiples receptores y ligandos complementarios entre ambos tipos de células (parásito-huésped) (Kalantari y col., 2019). Bonay y col., (1995) identificaron proteínas que unen carbohidratos (conocidas como CBPs) en *T. cruzi* y propusieron que estas podían ser receptores en los eventos de reconocimiento parásito-huésped. Estas lectinas, también conocidas como adhesinas, se encuentran en la superficie de los parásitos e interactúan con carbohidratos y glicoconjugados de las células blanco, llevando a los microorganismos a colonizar

superficies mucosas y a producir lesiones tisulares (Bonay y col., 1995).

Tabla 5. Actividad anti *Leishmania mexicana* de las muestras de Licor Negro, Vinaza y Lignina precipitada.

Muestra	Sobrevivencia		Cantidad de rosetas		Tamaño de las rosetas	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Vi	V	50%	mod	mod	med	med
L3	V	50%	mod	mod	med	med
L1	V	50%	mod	mod	med	med
Li3	V	75%	SR	SR	SR	SR
Li1	V	75%	esc	esc	peq	peq
In	V	50%	mod	mod	med	med

(esc) escasa, (mod) moderada, (ab) abundante, (peq) pequeña, (med) mediana, (gd) grande, (SR) sin rosetas, (V) todos vivos. El porcentaje se refiere al porcentaje de sobrevivencia. Vi, vinaza; L1, Licor negro 10% (p/v); L3, Licor negro 33% (p/v); Li1, Lignina precipitada proveniente de la muestra de LN10; Li3, Lignina precipitada proveniente de la muestra de LN33; In, indylín C. Las muestras L1 y L3 se diluyeron hasta una concentración de 0,09% (p/v); las muestras de Li1, Li3 e Indulín C, se prepararon a una concentración de 0,2% (p/v); la vinaza se diluyó 1/100.

Este mecanismo de invasión utilizado por algunos microorganismos patógenos, entre ellos las especies de parásitos objetos de este estudio, es uno de los más importantes y ampliamente estudiados. Como se observa en las Tablas 4 y 5, la Lignina purificada de las muestras de Licor Negro al 33% de sólidos disueltos es capaz de inhibir la formación de rosetas o agregados parasitarios.

Esos agregados o rosetas se forman gracias a la acción de las lectinas, debido al reconocimiento de carbohidratos o glicoconjugados en la superficie de las mismas células parasitarias. La inhibición de la formación de rosetas por parte de la Lignina puede traducirse en la capacidad que tiene la Lignina de impedir la invasión de células blanco, posiblemente inhibiendo la interacción entre las lectinas de superficie del parásito y su molécula de carbohidrato blanco, lo que puede servir como una herramienta para combatir las infecciones causadas por *T. cruzi* y *L. mexicana*.

No se han encontrado reportes en la literatura relacionados con la actividad antimicrobiana de la vinaza. Se sabe que las vinazas son ricas en compuestos coloreados que hacen que se considere como un gran contaminante. La mayoría de los compuestos que se detectan en la vinaza son fenólicos y carboxílicos, lo que por lo que se piensa que puede presentar algún tipo de bioactividad, por lo que se recomienda estudios más profundos acerca de la actividad antimicrobiana de este tipo de compuestos.

3.2 Actividad antioxidante del Licor Negro, Vinaza y Lignina precipitada.

Para estudiar y verificar la capacidad antioxidante del licor negro, vinaza y lignina precipitada, primero se evaluó el efecto de las muestras sobre el anión superóxido y el radical hidroxilo, y los resultados se presentan en la Tabla 6.

Todas las muestras analizadas tienen la capacidad de disminuir la formación del radical hidroxilo y anión superóxido (Tabla 6). De todas las muestras estudiadas, las ligninas precipitadas presentaron los mayores porcentajes de inhibición de la formación del anión superóxido, siendo estos valores similares a los encontrados para la Lignina purificada comercial, no mayores a los encontrados para la melatonina y quercitina, y superiores a los del ácido lipoico (Tabla 6).

En el caso del radical hidroxilo, las muestras de lignina precipitada tienen porcentajes de inhibición inferiores a la melatonina y quercitina, pero inferiores al ácido lipoico.

Las muestras de lignina precipitada presentaron mayores porcentajes de inhibición en comparación con sus fuentes de origen (LN10 y LN33), y en algunos casos superiores a su análogo el Indulín C, y a la lignina comercial usada en este estudio (Tabla 6). En el caso de la vinaza, presentó un porcentaje de inhibición del anión superóxido sólo superior al del indulín C, y fue el porcentaje de inhibición más bajo en el caso del radical hidroxilo; siendo los porcentajes reportados para ambos radicales estudiados inferiores a los antioxidantes comerciales usados como comparación en el presente estudio (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentajes de Inhibición encontrados para cada una de las Muestras Analizadas en el caso del Anión Superóxido y Radical Hidroxilo.

Muestra	Anión Superóxido	Radical Hidroxilo
Lig 10	51,44±1,29f	33,68±0,91d
Lig 33	51,22±0,48f	33,20±1,33d
LN10	30,69±0,97c	23,28±1,10b
LN33	32,11±0,95d	16,55±1,17a
Vinaza	27,04±0,17b	18,60±0,31a
Lig Aldrich	47,15±2,04e	36,81±1,30e
Indulín C	23,78±0,15a	24,53±1,27b
Melatonina	79,06±0,32h	53,89±1,07f
Quercitina	71,46±0,85g	53,07±1,13f
Ácido Lipoico	33,40±0,73d	27,94±0,98c

Media±Error estándar (n=9). Las medias de la misma columna que comparten la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test de comparación múltiple Newman-Keuls ($p < 0,05$). LN10, Licor Negro al 10% (p/v) (0,09% p/v); LN33, Licor Negro al 33% (p/v) (0,09% p/v); Lig10, Lignina Precipitada a partir de la muestra Licor Negro al 10% (p/v) (3 mg/ml); Lig33, Lignina Precipitada a partir de la muestra Licor Negro al 10% (p/v) (3 mg/ml); Lig Aldrich, Lignina Purificada a partir de la muestra Licor Negro al 10% (p/v) (3 mg/ml).

al 33% (p/v) (3 mg/ml); Ind C, Indulín C (3 mg/ml); Melatonina (1 μ M); Quercitina (1 μ M); Ácido lipoico (1 μ M); Lig Aldrich, Lignina purificada (3 mg/ml).

Por otra parte, se determinó a las muestras estudiadas los valores de AOA y TEAC usando ácido úrico y trolox como estándares, respectivamente. Los valores de AOA encontrados para las muestras de Lignina precipitada fueron superiores a todas las muestras analizadas, incluso superiores a los reportados por los antioxidantes comerciales usados como comparación en este estudio (Tabla 7).

La muestra de vinaza fue la que presentó el menor valor de AOA, incluso inferior al ácido lipoico.

Los valores de AOA de las muestras de lignina son considerados altos cuando se comparan con otras muestras analizadas por este método tales como orina (0,17 mM), saliva (0,84 mM), fluido cerebro-espinal (0,095 mM), humor acuoso ocular (0,061 mM). Sin embargo, no son tan altos como los encontrados para las muestras de suero cuyo valor de AOA es de 2,04 mM (Koracevic y col., 2001).

La muestra de vinaza es la que presenta el menor valor de AOA, siendo entonces considerada como un antioxidante débil según los valores reportados por Koracevic y col. (2001).

Tabla 7. Valores de AOA y TEAC de las muestras de Licor Negro, Lignina precipitada y Vinaza.

Muestra	AOA (mM)	TEAC (μ M)
Lig 10	0,91±0,03g	5,71±0,27d
Lig 33	0,89±0,01f	3,61±0,18b
LN10	0,58±0,01c	2,68±0,05a
LN33	0,58±0,01c	2,80±0,14a
Vinaza	0,14±0,02a	2,30±0,03a
Lig Aldrich	0,82±0,01d	4,34±0,31c
Ind C	0,57±0,02c	4,24±0,13c
Melatonina	0,83±0,02d	8,98±0,42e
Quercitina	0,86±0,03e	10,55±0,23f
Ac. Lipoico	0,31±0,07b	2,78±0,76a

LN10, Licor Negro al 10% (p/v) (0,09% p/v); LN33, Licor Negro al 33% (p/v) (0,09% p/v); Lig10, Lignina Precipitada a partir de la muestra Licor Negro al 10% (p/v) (3 mg/ml); Lig33, Lignina Precipitada a partir de la muestra Licor Negro al 33% (p/v) (3 mg/ml); Ind C, Indulín C (3 mg/ml); Melatonina (1 μ M); Quercitina (1 μ M); Ácido lipoico (1 μ M); Lig Aldrich, Lignina purificada (3 mg/ml). Media±Error estándar (n=6). Las medias de la misma columna que comparten la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test de comparación múltiple Newman-Keuls ($p < 0,05$).

En lo que se refiere a los valores de TEAC, se observa que las muestras de Lignina Precipitada provenientes del Licor Negro al 10% (p/v) de sólidos disueltos tienen un mayor valor de TEAC que todas las muestras problema analizadas (Licor Negro, Vinaza y Lignina Precipitada del LN al 33% de sólidos disueltos), siendo similar a su análogo comercial el Indulín C (Tabla 7). El hecho de que la Lignina precipitada tenga un mayor valor de TEAC que las de Licor Negro puede deberse a que en el proceso de precipitación se ha eliminado cualquier contaminante que pueda interferir en su capacidad antioxidante. Es importante destacar que la Quercitina presenta valores de TEAC superiores a los encontrados para el Trolox, el cual es usado como estándar en este método, comportamiento que ha sido reportado previamente en el trabajo realizado por Binsack y col. (2001), donde se encuentra que la Quercitina es aproximadamente 3,3 veces más potente que el Trolox para secuestrar el catión radical ABTS, mientras que los derivados de quercitina mono y diclorados son 5,8 y 6,1 veces más eficientes que el Trolox, respectivamente (Tabla 7).

Los valores de TEAC son considerados altos según los resultados expuestos por Proteggente y col. (2003), en el cual un valor de TEAC superior a 3,0 mM es considerado alto, y valores por debajo de 3,0 mM son considerados medios-bajos. De este modo, el valor de AAT de $2,30 \pm 0,03$ mM encontrado para la Vinaza es considerado medio-bajo.

Rajeev y col. (2009) evaluaron la potencial actividad antioxidante de la lignina obtenida del licor negro, un residuo peligroso producto generado durante la extracción de aceite de palma. El potencial antioxidante de la lignina extraída se evaluó disolviendo las muestras extraídas en 2 sistemas de disolventes diferentes. Los resultados revelaron un alto porcentaje de inhibición del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) en la muestra de lignina disuelta en 2-metoxietanol sobre DMSO. La espectrometría reveló que los grupos funcionales de la lignina extraída y la lignina comercial eran muy similares, lo que indica la pureza de la lignina extraída del licor negro. Estos resultados proporcionan una base sólida para futuras aplicaciones de lignina en la industria alimentaria y también ilustran un enfoque ecológico para utilizar licor negro de palma aceitera. Resultados similares fueron obtenidos por González y col. (2016) quienes estudiaron el contenido de fenoles y capacidad antioxidante de las ligninas obtenidas a través de precipitación a pH (2, 5 y 7), a partir del licor negro (LN), se utilizaron ácido sulfúrico y ácido clorhídrico como precipitantes. Para determinar polifenoles se usó el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, y se expresa en mg de ácido gálico equivalentes (GAE)/g muestra. La capacidad antioxidante se evaluó por el Método ABTS, en mM TEAC o capacidad antioxidante equivalente en Trolox. Los resultados reportaron que existe correlación entre la capacidad antioxidante de algunos colorantes naturales y las muestras de lignina obtenidas por precipitación y la muestra del LN.

Faustino y col. (2010) evaluaron la actividad antioxidante de compuestos fenólicos presentes en licores negros industriales obtenidos por dos procesos diferentes usados en Portugal. El contenido total de fenoles se encontró entre 91,6 y 1.099,6 mg GAE/g, mientras que la actividad antioxidante se encontró entre 2,20 y 3,41, mostrando una fuerte actividad antioxidante para todos los casos estudiados.

Este es el reporte en el que se evidencia la actividad antioxidante de la vinaza, aunque la reportada en este trabajo fue menor a la de la lignina precipitada y a los antioxidantes comerciales usados en este trabajo.

4 Conclusiones.

En el presente trabajo se evidenció por primera vez actividad antimicrobiana para las muestras de licor negro y vinaza, así como para las muestras de lignina precipitada, contra importantes microorganismos patógenos humanos tanto bacterias, como hongos y parásitos. Además, todas las muestras estudiadas tienen la capacidad de disminuir la formación del anión superóxido y radical hidroxilo., siendo la Lignina precipitada la que presentó la mayor capacidad antioxidantes de todas las muestras analizadas, independientemente de su procedencia. La vinaza es el antioxidante más débil de todos los ensayados usados en este estudio. Ninguna de las muestras analizadas presentó una capacidad de disminuir la formación del anión superóxido y del radical hidroxilo superior a la Quercitina o la Melatonina. Por otra parte, los valores de AOA presentados por las muestras de Lignina precipitada son considerados elevados cuando se comparan con los reportados en la bibliografía, incluso superiores a los presentados por la Melatonina, Quercitina y Lignina precipitada. Los resultados presentados en este trabajo evidencian la importante bioactividad de aguas residuales como licor negro, vinaza y lignina precipita, permitiendo valorizar productos de desecho altamente contaminantes.

Referencias

- Binsack R, Boersma BJ, Patel RP, Kirk M, White R, Darley-Usmar V, Barnes S, Zhou F, Parks D, 2001, Enhanced Antioxidant Activity After Chlorination of Quercetin by Hypochlorous Acid. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 25(3), 434-443.
- Bonay P, Fresno M, 1995, Characterization of carbohydrate binding proteins in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 270(19), 11062-11070.
- Boyd WC, Slapeigh E, 1954, Antigenic relations of blood group antigen as suggested by test with lectins. *Immunology* 73, 226-231.
- Cavalett O, Junqueira TL, Dias M, 2012, Environmental and economic assessment of sugarcane first generation biorefineries in Brazil. *Clean Technologies and Environmental Policy* 14(3), 399-410.
- Devore JL, 2008, Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias. 7ma ed. México: Cengage Learning, p. 285.

- Dizhbite T, Telysheva G, Jurkjane V, Viesturs U, 2004, Characterization of the radical scavenging activity of lignins- Naturals antioxidants. *Bioresour. Technol.* 95(3), 309-317.
- Durmaza S, Erisirb E, Umit C, Yildiza O, Kurtulusab C, 2015, Using Kraft Black Liquor as A Wood Preservative. *Procedia - Social and Behavioral Sciences* 195, 2177 – 2180.
- Espinoza-Acosta JL, Torres-Chávez PI, Ramírez-Wong B, López-Saiz CM, Montaña-Leyva B, 2016, Antioxidant, antimicrobial and antimutagenic properties of technical lignins and their applications. *BioResources* 11(2), 5452-5481.
- Faustino H, Gil N, Baptista, Duarte AP, 2010, Antioxidant Activity of Lignin Phenolic Compounds Extracted from Kraft and Sulphite Black Liquors. *Molecules* 15, 9308-9322
- Goldstein IJ, 1980, What should be called lectin. *Nature* 285, 66-68.
- González A, Celis MT, Fernández A, Lucena H, Rodríguez-Malaver A, 2016, Capacidad Antioxidante Y Contenido De Fenoles, En Muestras De Lignina Obtenidas Por Precipitación En Medio Ácido A Partir De Licor Negro. *Revista Politécnica, Ecuador*, 38(1), 13-25.
- Gunkel G, Kosmol J, Sobral M, Rohn H, Montenegro S, Aureliano J, 2007, Sugar cane industry as a source of water pollution - Case study on the situation in Ipojuca river, Pernambuco, Brazil. *Water, Air & Soil Pollution* 180(1-4), 261–269.
- Halliwell B, Gutteridge J, Aruoma O, 1987, The deoxyribose method: a simple test-tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem* 165, 215–219.
- Hansen B, Kamm B, Schulze M, 2016, Qualitative and quantitative analysis of lignin produced from beech wood by different conditions of the Organosolv process. *J. Polym. Environ.* 24, 85-94.
- Hartmut F, 1988, *Advances in lectin research 1*, Berlín: Springer-Verlag.
- Jiménez AM, Borja R, Martín A, Raposo F, 2006, Kinetic analysis of the anaerobic digestion of untreated vinasses and vinasses previously treated with *Penicillium decumbens*. *Journal of Environmental Management* 80(4), 303–310.
- Kalantari P, Bunnell SC, Stadecker MJ. *Front*, 2019, The C-type Lectin Receptor-Driven, Th17 Cell-Mediated Severe Pathology in Schistosomiasis: Not All Immune Responses to Helminth Parasites Are Th2 Dominated. *Immunol.* 10:26. doi: 10.3389/fimmu.2019.00026. eCollection.
- Klein S, Alzageem A, Rumpf J, Korte I, Kreyenschmidt J, Schulze M, 2019, Antimicrobial Activity of Lignin-Derived Polyurethane Coatings Prepared from Unmodified and Demethylated Lignins. *Coatings* 9, 494-507.
- Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, Cosic V, 2001, Method for measurement of antioxidant activity in human fluids. *Journal of Clinical Pathology* 54; 356-361.
- Levanova VP, 1992, Ligninase production in agitated conditions by *Phanerochaete chrysosporium*. *FMS Microbiology Letters* 29, 33-36.
- Lora JH, 2008, Industrial commercial lignins: sources, properties and applications. In: *Monomers, polymers and composite from renewable resources*. Belgacem M, Gandini A (eds.). Elsevier, Oxford, UK. pp. 225-241.
- Mansouri N, Salvadó J, 2006, Structural characterization of technical lignins for the production of adhesives: application to lignosulfonate, kraft, soda-anthraquinone, organosolv and ethanol process lignins. *Ind. Crops Prod.* 24(1), 8-16.
- Maulidiyah M, Mardhan FT, Muzuni J, Ansharullah M, Natsir D, Wibowo D, Nurdin M, 2018, Lignin black liquor degradation on oil palm empty fruit bunches using ilmenite (FeO.TiO₂) and its activity as antibacterial. *Journal of Physics: Conf. Series* 1242, 12-23.
- Moraes BS, Zaiat M, Bonomi A, 2015, Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: challenges and perspectives. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 44, 888–903.
- Parnaudeau V, Condom N, Oliver R, Cazevielle P, Recous S, 2008, Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. *Bioresource Technology* 99(6), 1553–1562.
- Paredes D, Alves B, Dos Santos M, 2015, Nitrous Oxide and Methane Fluxes Following Ammonium Sulfate and Vinasse Application on Sugar Cane Soil. *Environmental Science & Technology* 49(18), 11209–11217.
- Ponomarenko J, Dizhbite T, Lauberts M, Viksna A, Dobele G, Bikovens O, Telysheva G, 2014, Characterization of softwood and hardwood lignin kraft lignins with emphasis on their antioxidant activity. *Bioresources* 9, 2051–2068.
- Prado R, Caione G, Campos N, 2013, Filter cake and vinasse as fertilizers contributing to conservation agriculture. *Applied and Environmental Soil Science* 13, 1-8.
- Proteggente AR, Saija A, De Pasquale A, and Rice-Evans C. (2003). The compositional characterization and antioxidant activity of fresh juices from Sicilian sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) varieties. *Free Radical Research* 37(6):681-687.
- Rajeev B, Khalil H, Karim A, 2009, Exploring the antioxidant potential of lignin isolated from black liquor of oil palm waste. *C. R. Biologies* 332, 827–831.
- Re R, Pellegrini N, Protoggnte A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C, 1999, Antioxidant activity in improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Biol Med.* 26, 1231-1237.
- Rice-Evans C, Diplock A, Symons M, 1991, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Techniques in Free Radicals Research*. RH Burdon and PH van Knippenberg. Amsterdam: Elsevier. Vol. 22.
- Salomon KR, Lora E, Rocha M, 2011, Cost calculations for biogas from vinasse biodigestion and its energy Utilization. *Sugar Industry* 136, 217–223.

- Sarkanen S, 1997, Progress Report Means for Producing 100 % Kraft Lignin Based Biodegradable Plastics. University of Minnesota. Pp. 230.256.
- Sláviková E, Kosíková B, 1994, Inhibitory effect of lignins by-products of pulping on yeast growth. *Folia Microbiol.* 39(3), 241-243.
- Sote A, 2005, Principios de Estadística. 2da ed. Caracas: Editorial Panapo de Venezuela; p. 143.
- UNICA [internet], Total Ethanol Production Report 2015/2016, Brazilian Sugarcane Industry Association, Sao Paulo, Brazil, 2016, Available from: <http://www.unicadata.com.br>.
- Vargas Y, 1999, *Trypanosoma cruzi* como blanco de bioensayos para evaluar la toxicidad de productos naturales y sintéticos. Trabajo de Grado para optar al Título de Licenciado en Bioanálisis. Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia, Sección Biotecnología. Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela. 32-34.
- Weng CH, 2018, Water environment protection and contamination treatment. *Environmental Sci Pollut Res Int.* 26(30), 30541-30543.
- Wilkie AC, Riedesel KJ, Owens KJ, 2000, Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. *Biomass & Bioenergy* 19(2), 63–102.
- Ylmén R, Gustafsson AMK, Camerani-Pinzani C, Steenari BM, 2018, Recovery of phosphorous from industrial waste water by oxidation and precipitation. *Environ Technol.* 39(15), 1886-1897.

Recibido: 10 de marzo de 2020

Aceptado: 20 de agosto de 2020

Dávila, Juan: *Farmacéutico, Universidad de Los Andes. MSc en Química de Medicamentos, Sección Biotecnología, Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. Correo electrónico: juandavilaaula@gmail.com*

Sulbarán, Miguel: *Licenciado en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes. MSc en Biología de Microorganismos, Postgrado de Biología de Microorganismos, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes.: biomsm@gmail.com*

Peña, Vera María: *Farmacéutico, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. MSc en Química de Medicamentos, Sección Biotecnología, Postgrado de Química de Medicamentos, Universidad de Los Andes. marifen@hotmail.com*

Pérez-Pérez, Elizabeth: *Licenciada en Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes, Doctora en Biología Celular del Postgrado de Biología Celular de la Universidad de Los Andes.*

