

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ESTUDIO DE LA POLIMERIZACIÓN DE FENOLES
UTILIZANDO PEROXIDASAS PRESENTES EN RÁBANO
COMÚN (*Raphanus sativus var sativus*), CON APLICACIÓN
EN LA BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS RESIDUALES
DE UNA EMPRESA TEXTILERA**

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

Ingeniera en Biotecnología

ELABORADO POR:

PATRICIA MARIBEL GUTIÉRREZ SALAZAR

SANGOLQUÍ, 13 de Abril del 2011

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Patricia Maribel Gutiérrez Salazar

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. Rafael Vargas

SECRETARIO ACADÉMICO

Dra. Laura López

Sangolquí, 13 de Abril del 2011

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Señorita **PATRICIA MARIBEL GUTIÉRREZ SALAZAR** como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología.

Sangolquí, 13 de Abril del 2011

Dra. Blanca Naranjo
DIRECTOR

Ing. Mariela Vera
CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

PATRICIA MARIBEL GUTIÉRREZ SALAZAR

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “ESTUDIO DE LA POLIMERIZACIÓN DE FENOLES UTILIZANDO PEROXIDASAS PRESENTES EN RÁBANO COMÚN (*Raphanus sativus var sativus*), CON APLICACIÓN EN LA BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS RESIDUALES DE UNA EMPRESA TEXTILERA”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 13 de Abril del 2011

PATRICIA GUTIÉRREZ

AUTORIZACIÓN

PATRICIA MARIBEL GUTIÉRREZ SALAZAR

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “ESTUDIO DE LA POLIMERIZACIÓN DE FENOLES UTILIZANDO PEROXIDASAS PRESENTES EN RÁBANO COMÚN (*Raphanus sativus var sativus*), CON APLICACIÓN EN LA BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS RESIDUALES DE UNA EMPRESA TEXTILERA”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 13 de Abril del 2011.

PATRICIA GUTIÉRREZ

DEDICATORIA

A mis bisabuelitos Rodolfo (†) y Giota (†),

A mi abuelita Carmen,

a mi mami Narci,

a mis tías Jake y Pauli,

a mis tíos José, Pedro, Paúl y Mijail,

y a Marco.

Ellos son mi inspiración y mi ejemplo de trabajo y humildad.

Patricia Gutiérrez

AGRADECIMIENTO

A Dios por darle ese inmenso corazón a mi abuelita.

A mi abuelita, por su bondad, amor y cuidado, todos mis logros son gracias a ella.

A mis tías y tíos por su paciencia, comprensión y apoyo incondicional.

A mis amigas y amigos, por su cariño.

Un agradecimiento muy especial a mi maestro y amigo Ing. Rafael Espinoza, por su amistad y enseñanzas.

A la Dra. Blanquita Naranjo y a la Ing. Mariela Vera por su colaboración y ayuda.

Al Laboratorio de Investigaciones Aplicadas de la Escuela Politécnica Nacional por su acogida.

Patricia Gutiérrez

INDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	ii
CERTIFICACIÓN	iii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD.....	iv
AUTORIZACIÓN	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
INDICE DE CONTENIDOS	viii
LISTADO DE TABLAS	x
LISTADO DE CUADROS	xii
LISTADO DE FIGURAS	xiii
LISTADO DE ANEXOS	xvi
NOMENCLATURA	xvii
RESUMEN	xviii
ABSTRACT.....	xix
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Formulación del problema	1
1.2. Justificación	1
1.3. Objetivos	3
1.3.1. Objetivo general	3
1.3.2. Objetivos específicos	3
1.4. Marco teórico	4
1.4.1. Contaminación del agua	4
1.4.2. Peroxidasas.....	12
1.5. Hipótesis	29
CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	30
2.1. Ensayo para la obtención del extracto crudo enzimáticamente activo de <i>Raphanus sativus var sativus</i>	30
2.1.1. Extracto de raíz de rábano (<i>Raphanus sativus var sativus</i>).....	30
2.1.2. Extracto de hojas de rábano (<i>Raphanus sativus var sativus</i>)	32
2.2. Ensayo para la determinación de la actividad peroxidásica	34
2.2.1. Cálculo de la actividad peroxidásica.....	35

2.3.	Ensayo para la determinación de la concentración de proteína	35
2.4.	Ensayo para la purificación de baja resolución de las enzimas peroxidásicas activas de rábano.....	36
2.5.	Eliminación enzimática de fenoles en soluciones preparadas en el laboratorio ..	37
2.5.1.	Determinación de la cinética de la enzima.....	37
2.5.2.	Determinación del porcentaje de remoción del fenol	43
2.6.	Determinación de la concentración de fenoles	44
2.7.	Tratamiento enzimático de fenoles en efluentes de una empresa textilera.....	45
2.7.1.	Destilación del agua de la textilera	45
2.7.2.	Cuantificación de fenoles en el agua de la textilera.....	46
2.7.3.	Remoción de fenoles en el agua de la textilera	46
CAPITULO 3. RESULTADOS.....		47
3.1.	Obtención del extracto crudo	47
3.2.	Purificación enzimática de baja resolución	54
3.3.	Eliminación enzimática de fenoles	55
3.3.1.	Cinética de las peroxidasas de rábano (<i>Raphanus sativus var sativus</i>)	56
3.3.2.	Curva de Calibración para la determinación de fenoles.....	62
3.3.3.	Porcentaje de remoción de fenoles en agua sintética	64
3.3.4.	Destilación del agua de la textilera y cuantificación de fenoles	73
3.3.5.	Porcentaje de remoción de fenoles en efluentes de una empresa textilera	74
CAPITULO 4. DISCUSIÓN		76
4.1.	Obtención del extracto crudo.....	76
4.2.	Purificación enzimática de baja resolución	78
4.3.	Eliminación enzimática de fenoles	79
4.3.1.	Cinética de las peroxidasas de rábano (<i>Raphanus sativus var sativus</i>)	81
4.3.2.	Porcentaje de remoción de fenoles a escala de laboratorio.....	84
4.3.3.	Porcentaje de remoción de fenoles en efluentes de una empresa textilera	85
CAPITULO 5. CONCLUSIONES		87
CAPITULO 6. RECOMENDACIONES		88
CAPITULO 7. BIBLIOGRAFÍA		89

LISTADO DE TABLAS

Tabla 3.1 Valores de actividad enzimática, concentración de proteína y actividad específica de los extractos de rábano (<i>Raphanus sativus var sativus</i>).....	47
Tabla 3.2 Valores de actividad enzimática, concentración de proteína y actividad específica de los: extractos de raíz sin decolorar y decolorado con 0,5g de carbón a pH 5,67 y, extractos de hoja, sin decolorar y decolorado con 5 g de carbón a pH 6,43.....	48
Tabla 3.3 Valores de actividad enzimática, concentración de proteína y actividad específica de los: extractos de raíz de <i>Raphanus sativus var sativus</i> sin decolorar y decolorado con 0,5 y 0,2 g de carbón a pH 5,67.....	50
Tabla 3.4 Valores de actividad enzimática, concentración de proteína y actividad específica de los: extractos de raíz <i>Raphanus sativus var sativus</i> sin decolorar y decolorado con 0,2 g de carbón a pH 5,67 y 7.3.....	50
Tabla 3.5 Valores de actividad enzimática, concentración de proteína y actividad específica de los: extractos de hoja de <i>Raphanus sativus var sativus</i> sin decolorar y decolorado con 0,5 y 0,2 g de carbón a pH 6,43.....	51
Tabla 3.6 Valores de actividad enzimática, concentración de proteína y actividad específica de los: extractos de hoja de <i>Raphanus sativus var sativus</i> sin decolorar y decolorado con 0,2 g de carbón a pH 6,43 y 7.3.....	51
Tabla 3.7 Análisis estadístico de los ensayos de medición de la actividad enzimática en los diferentes extractos de raíz de rábano.	53
Tabla 3.8 Análisis estadístico de los ensayos de medición de actividad enzimática en los diferentes extractos de hoja de rábano.	53
Tabla 3.9 Análisis estadístico de los ensayos de medición de proteína en los extractos de raíz de rábano.....	54
Tabla 3.10 Análisis estadístico de los ensayos de medición de proteína en los extractos de hoja de rábano.	54
Tabla 3.11 Tabla de purificación de peroxidasas de <i>Raphanus sativus var sativus</i>	54
Tabla 3.12 Análisis estadístico de los ensayos de medición de AE y [P] en el extracto madre y en el extracto purificado.	55
Tabla 3.13 Velocidades iniciales de las reacciones enzimáticas, se analizan diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno y fenol.	56
Tabla 3.14 Valores de $V_{m\acute{a}x}$ ap y K_{Fenol} ap, evaluados con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno.	59
Tabla 3.15 Valores de $K_{H_2O_2}$ ap, evaluados a diferentes concentraciones de fenol.....	62
Tabla 3.16 Valores promedio de las pendientes, intersecciones y R^2 de las curvas de calibración con su respectivo análisis estadístico	63

Tabla 3.17 Porcentajes de remoción de fenol a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno y fenol.	65
Tabla 3.18 ANOVA de las pruebas de remoción de fenol.	70
Tabla 3.19 DHS de Tukey para las concentraciones de peróxido de hidrógeno.	71
Tabla 3.20 DHS de Tukey para las concentraciones de fenol.	71
Tabla 3.21 Grupos Tukey de la comparación de tratamientos, con nivel de confianza 95%, ordenados en forma descendente.	73
Tabla 3.22 Concentración de fenol en el estándar, agua de la textilera y agua de la textilera fortificada.	74
Tabla 3.23 Valores de concentración de fenol y porcentaje de remoción de 5 tratamientos realizados al agua de una empresa textilera, con concentración de peróxido 5mM y 398,105 U de peroxidasa de <i>Raphanus sativus var sativus</i>	74
Tabla 3.24 Resumen de la estadística descriptiva de los ensayos de remoción de fenoles en el agua de la textilera.	75

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Características del fenol	7
Cuadro 1.2 Toxicidad del fenol	8
Cuadro 1.3 Enzimas y sus aplicaciones en el tratamiento de aguas residuales	10
Cuadro 1.4 Peso molecular y contenido de carbohidratos de las peroxidasas obtenidas de nabo y brócoli.....	16
Cuadro 1.5 pH óptimo de tres peroxidasas.	22

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Clasificación de Industrias por sus vertimientos.....	5
Figura 1.2 (a) Grupo hemo tipo b; Diferentes estados de coordinación del hierro: (b) Hierro pentacoordinado, el ligando axial es el N ^ε _{His} . (Nitrógeno ε de la His proximal), (c) Hierro hexacoordinado, los ligandos axiales son: (1) el N ^ε _{His} y un OH, (2) el N ^ε _{His} y una molécula de H ₂ O ₂ , y (3) el N ^ε _{His} y un O.....	13
Figura 1.3 Estructura tridimensional de la HRP C	15
Figura 1.4 Aminoácidos cercanos al centro activo de la HRP C	16
Figura 1.5 Estructura esencial de centro activo de la HRP C	17
Figura 1.6 Mecanismo de reacción general de las peroxidasas	18
Figura 1.7 Diagrama del mecanismo de polimerización del fenol	19
Figura 1.8 Inhibición por exceso de sustrato	20
Figura 1.9 Esquema para el aislamiento y purificación de peroxidasas.	25
Figura 1.10 Formación del tetraguayacol	26
Figura 2.1 Balance de masa del proceso de obtención del extracto de raíz de rábano. ..	31
Figura 2.2 Balance de masa del proceso de decoloración del extracto de raíz de <i>Raphanus sativus var sativus</i> , a pH 5.67 y con 0,5 g de carbón activado en polvo.	32
Figura 2.3 Balance de masa del proceso de obtención del extracto de hoja de rábano (<i>Raphanus sativus var sativus</i>).	33
Figura 2.4 Balance de masa del proceso de decoloración del extracto de hoja de rábano (<i>Raphanus sativus var sativus</i>), a pH 6,43 con 5 g de carbón activado en polvo.....	34
Figura 2.5 Precipitación de la enzima con sulfato de amonio al 90%.	36
Figura 2.6 Balance de masa del proceso de purificación de baja resolución de las peroxidasas presentes en el extracto crudo de raíz de <i>Raphanus sativus var sativus</i>	37
Figura 2.7 Representación gráfica de 1/V _o en función de 1/[A] a diferentes concentraciones fijas de B, para un mecanismo bisustrato ordenado.....	40
Figura 2.8 Representaciones gráficas secundarias obtenidas a partir de los gráficos primarios de 1/V _o en función de 1/[A], a diferentes concentraciones fijas de B, en un mecanismo cinético bisustrato ordenado	41
Figura 2.9 Representación gráfica de 1/V _o en función de 1/[B] a diferentes concentraciones fijas de A, para un mecanismo bisustrato ordenado.....	42
Figura 2.10 Representaciones gráficas secundarias obtenidas a partir de los gráficos primarios de 1/V _o en función de 1/[B], a diferentes concentraciones fijas de A, en un mecanismo cinético bisustrato ordenado	43

Figura 2.11 Destilación (a) Muestra de agua de una textilera fortificada con fenol para alcanzar una concentración de 3 mg.L ⁻¹ ; (b) Muestra de agua residual de una textilera y, (c) Muestra de una solución de fenol cuya concentración es 3 mg.L ⁻¹	46
Figura 3.1 Comparación de la actividad enzimática y la actividad específica de los extractos de <i>Raphanus sativus var sativus</i> (raíz y hoja).	48
Figura 3.2 Actividad enzimática, concentración de proteína y actividad específica de los: extractos de raíz sin decolorar y decolorado con 0,5 g de carbón a pH 5,67 y, extractos de hoja, sin decolorar y decolorado con 5 g de carbón a pH 6,43.....	49
Figura 3.3 Actividad enzimática de los extractos de raíz de rábano sin decolorar y decolorados.	50
Figura 3.4 Actividad enzimática de los extractos de hoja de rábano sin decolorar y decolorados.	52
Figura 3.5 Comparación de la AE de los extractos de raíz y hoja de <i>Raphanus sativus var sativus</i> sin decolorar y decolorados.	52
Figura 3.6 Comparación de las velocidades iniciales en función de la concentración de fenol a diferentes concentraciones fijas de peróxido de hidrógeno. Modelo Michaelis-Menten.	57
Figura 3.7 Velocidades iniciales, en función de la concentración de fenol a concentraciones inhibitorias de peróxido de hidrógeno (10 y 100 mM). Modelo Michaelis-Menten.	57
Figura 3.8 Gráfico de los dobles recíprocos: 1/V _o vs 1/[Fenol] a diferentes concentraciones fijas de peróxido de hidrógeno, para un mecanismo cinético bisustrato ordenado.....	58
Figura 3.9 Constantes de afinidad aparentes del fenol en función de la concentración de peróxido de hidrógeno.	59
Figura 3.10 Velocidades máximas aparentes en función de la concentración de peróxido de hidrógeno.	59
Figura 3.11 Comparación de las velocidades iniciales, en función de la concentración de peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones fijas de fenol. Modelo Michaelis-Menten.	60
Figura 3.12 Gráfico de los dobles recíprocos: 1/V _o vs 1/[H ₂ O ₂] a diferentes concentraciones fijas de fenol, para un mecanismo cinético bisustrato ordenado.....	61
Figura 3.13 Constantes de afinidad aparentes del peróxido de hidrógeno en función de la concentración de fenol	62
Figura 3.14 Curvas de calibración de fenol	63
Figura 3.15 Polímeros de fenol obtenidos con concentración de peróxido 5mM y concentración de fenol 4mM.	65
Figura 3.16 Porcentajes de remoción de fenol en función de la concentración de peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones fijas de fenol.	66

Figura 3.17 Porcentaje de remoción de fenol en función de la concentración de fenol a diferentes concentraciones fijas de peróxido de hidrógeno.	67
Figura 3.18 Medias marginales estimadas del porcentaje de remoción de fenol en función de la concentración de peróxido de hidrógeno.	68
Figura 3.19 Medias marginales estimadas del porcentaje de remoción de fenol en función de la concentración inicial de fenol.	68
Figura 3.20 Medias marginales estimadas del porcentaje de remoción de fenol en función de la concentración de peróxido de hidrógeno y su interacción con las concentraciones de fenol.	69
Figura 3.21 Medias marginales estimadas del porcentaje de remoción de fenol en función de la concentración de fenol y su interacción con las concentraciones de peróxido de hidrógeno.	70
Figura 3.22 Comparación de las medias de los porcentajes de remoción de los 25 tratamientos (interacciones concentración de peróxido–concentración de fenol) aplicados para la eliminación de fenoles.	72
Figura 3.23 Comparación de las concentraciones de fenol del agua de la textilera sin tratar y tratada con concentración de peróxido 5mM y 398,105 U de peroxidasa <i>Raphanus sativus var sativus</i>	75
Figura 4.1 Ciclo catalítico de la peroxidasa de <i>Raphanus sativus var sativus</i>	79

LISTADO DE ANEXOS

Anexo A. Tablas de los límites permisibles de descarga de efluentes al sistema de alcantarillado, a un cuerpo de agua (dulce y salada).	102
Anexo B. Balances de masa del proceso de decoloración del extracto de raíz de rábano	105
Anexo C. Balances de masa del proceso de decoloración del extracto de hoja de rábano.	107
Anexo D. Tabla de la concentración Final (% saturación a 0 °C) de solución de sulfato de amonio.....	109
Anexo E. Resumen estadísticos de los ensayos de la cinética enzimática, para cada concentración de peróxido de hidrógeno y fenol.....	110
Anexo F. Gráficas secundarias para determinar la $V_{m\acute{a}x}$ y la K_{Fenol}	113
Anexo G. Gráficas secundarias para determinar la $V_{m\acute{a}x}$ y la $K_{H_2O_2}$	114
Anexo H. Valores de las 10 curvas de calibración de fenol.	115
Anexo I Gráficas de control.....	116

NOMENCLATURA

[A]:	concentración del compuesto A	K_A :	constante de afinidad del compuesto A
Act. Esp.:	actividad específica	K_B :	constante de afinidad del compuesto B
AE:	actividad enzimática	K_{Fenol} :	constante de afinidad del fenol
AH·:	radical fenoxi	$K_{\text{H}_2\text{O}_2}$:	constante de afinidad del peróxido de hidrógeno
AH ₂ :	compuesto fenólico	K_M :	constante de afinidad o de Michaelis
ap:	aparente	Kg:	kilogramo
[B]:	concentración del compuesto B	L:	litro
CM:	carboximetil	mg:	miligramo
DBO:	Demanda Bioquímica de Oxígeno	min:	minuto
DEAE:	dietilaminoetil	mL:	mililitro
DO:	absorbancia	nm:	nanómetro
DQO:	Demanda Química de Oxígeno	[P]	concentración de proteína
DHS:	Diferencia Significativa Honesta	pH:	potencial de hidrógeno
E _i :	compuesto I	rpm:	revoluciones por minuto
E _{ii} :	compuesto II	SBP	peroxidasa de nabo (soybean peroxidase)
E _{iii} :	compuesto III	USEPA:	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
[Fenol]:	concentración de fenol	μL :	microlitro
g:	gramo	V _o :	velocidad inicial
GP:	grado de purificación	V _{máx} :	velocidad máxima
IPCS:	Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas	%:	porcentaje
[H ₂ O ₂]:	concentración de peróxido de hidrógeno		
HRP:	peroxidasa de rábano picante (horseradish peroxidase)		

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo buscar una solución para eliminar fenoles de aguas contaminadas, a través del uso de peroxidasas de rábano común (*Raphanus sativus var sativus*). Éstas enzimas catalizan la polimerización de compuestos fenólicos en presencia de peróxido de hidrógeno y, forman polímeros insolubles que se pueden remover por filtración.

En el experimento se prepararon extractos de hoja y de raíz de *Raphanus sativus var sativus* y se determinó la actividad peroxidásica de los dos extractos, para seleccionar el de mayor actividad. El extracto de raíz de rábano fue el que presentó mayor actividad, aproximadamente 85,93% más actividad que el extracto de hoja de rábano.

Con el extracto de raíz de *Raphanus sativus var sativus*, se realizó la purificación de baja resolución con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) al 90% de saturación. El grado de purificación alcanzado fue de 4,6 veces con un rendimiento del 81,41%; la AE y la Act. Esp. de las enzimas purificadas fue de 4409,216 U.mL⁻¹ y 513,895 U. mg⁻¹, respectivamente.

Se investigó la cinética de las peroxidasas de *Raphanus sativus var sativus* y se determinó que los valores de la constante de afinidad para el fenol (K_{Fenol}) y el peróxido de hidrógeno (K_{H₂O₂}) son 0,527 y 2,7576 mM, respectivamente. Las peroxidasas presentaron valores de velocidad máxima de 0,459 mM min⁻¹ para el fenol y 0,4768 mM min⁻¹ para el peróxido de hidrógeno.

Las concentraciones de sustratos que permiten alcanzar el 90% de remoción de fenoles (p<0,5), con 398,105 U de peroxidasa de rábano común a pH 7,4 y temperatura ambiente, fueron: 5 mM para el peróxido de hidrógeno y 0,5 mM para el fenol. Los resultados muestran que las peroxidasas de *Raphanus sativus var sativus* remueven eficientemente fenoles de agua sintética con altas concentraciones de fenol. Sin embargo la descontaminación del agua de la textilera no fue posible por la baja concentración de fenoles en dichas aguas, a pesar que sobrepasan los límites permisibles establecidos en el TULAS.

ABSTRACT

This research was aimed at seeking a solution to remove phenols from water contaminated, using a common radish peroxidase (*Raphanus sativus var sativus*), these enzymes catalyze the polymerization of phenolic compounds in the presence of hydrogen peroxide and form insoluble polymers that can be removed by filtration.

Extracts were prepared from leaf and root of *Raphanus sativus var sativus* and peroxidase activity was determined in the two extracts to select the most active. The horseradish root extract was the one which showed higher activity, about 85.93% more activity than the radish leaf extract.

The purification of low resolution with ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄), 90% of saturation, was performed with the root extract of *Raphanus sativus var sativus*. The purification's degree achieved was 4.6 times with a yield of 81.41%; the AE and the Esp. Act. of purified enzymes was 4409.216 U.mL⁻¹ and 513.895 U.mg⁻¹, respectively.

We investigated the kinetics of peroxidases from *Raphanus sativus var sativus* and found that the values of the affinity constant for phenol (K_{Fenol}) and hydrogen peroxide (K_{H₂O₂}) are 0.527 and 2.7576 mM, respectively. Peroxidases showed values of maximum reaction rate of 0.459 mM.min⁻¹ for phenol and 0.4768 mM.min⁻¹ for hydrogen peroxide.

The concentrations of substrates that can achieve 90% removal of phenols (p < 0.5), with 398.105 U of common radish peroxidase at pH 7.4 and room temperature were: 5 mM hydrogen peroxide and 0.5 mM for phenol. The results show that the common radish peroxidases efficiently removed phenols from synthetic wastewater with high concentrations of phenol. The decontamination of water from the textile was not possible because of the low concentration of phenols in this water; even though, it exceeds the permissible limits established by the TULAS.

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1. Formulación del problema

Los fenoles son compuestos químicos, ampliamente utilizados en la industria farmacéutica, papelera, de plásticos, textilera, de refinamiento de petróleo, entre otras. Su extendido uso los ha convertido en contaminantes comunes, presentes en muchas corrientes de aguas residuales. La agencia de protección medio ambiental de los Estados Unidos (USEPA), considera once compuestos fenólicos como contaminantes prioritarios: pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 2,4-diclorofenol, 2-clorofenol, fenol, 4,6-dinitro-2-metilfenol, 2,4-dinitrofenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, 4-cloro-3-metilfenol y 2,4-dimetilfenol (Silva, 2000). Los fenoles requieren una relevante atención en el estudio de la contaminación del ambiente, debido a su toxicidad y prevalencia en agua y suelo.

Existen varios procesos disponibles para la eliminación de fenoles, las desventajas que presentan estos tratamientos como: costos elevados, alto consumo de energía, producción de biomasa, generación de productos secundarios tóxicos, alteración del ambiente, entre otras, hacen que se busquen nuevas alternativas. El proceso enzimático se presenta como una buena opción y, se ha desarrollado en las últimas dos décadas, principalmente con el uso de enzimas extraídas de plantas y microorganismos.

1.2. Justificación

El tratamiento enzimático de compuestos fenólicos es un tema de actualidad en varios países de la región hispanoamericana. En México se experimentó con las peroxidasas de nabo (*Brassica napus*) y se evaluó varios métodos de inmovilización enzimática para destoxificar soluciones fenólicas, con resultados mayores al 96% de remoción (Ortega, 2001); también en otra investigación desarrollada en el mismo país se analizó las peroxidasas del chayote (hortaliza trepadora perteneciente a la familia de

las curcubitáceas oriunda de Centro América) inmovilizadas en el soporte orgánico poliestireno-divinilbenceno funcionalizado con triglicina y activado con 1,1'-carbonil-diimidazol, con resultados positivos para la descontaminación de aguas con compuestos fenólicos (Villegas-Rosas, 2003).

En el año 2008 en España se realizó un trabajo sobre un biorreactor para la eliminación enzimática de fenol, en el que se utilizó peroxidasas libres e inmovilizadas. Además se probaron diferentes soportes para la inmovilización, con el fin de mejorar económicamente el proceso y hacerlo factible para su uso a escala industrial (Pramparo, 2008).

En el Ecuador existen trabajos relacionados con el tratamiento de fenoles, como la aplicación de ozono para la degradación del fenol en aguas del río Machángara y en aguas residuales de una industria de pinturas (Carrión, 2004); también se investigó el efecto de la radiación ionizante de un haz de electrones acelerados en la degradación de fenoles en aguas contaminadas de la ciudad de Quito (Jaramillo, 2004). Hasta la fecha en nuestro país no aparecen investigaciones documentadas relacionadas con el tratamiento enzimático de compuestos fenólicos presentes en aguas residuales, a pesar de ser un tema de gran interés social, económico y ambiental.

Con este trabajo se pretende establecer un método enzimático de remoción de fenoles, aplicable a las aguas residuales de una empresa textilera.

Las enzimas aptas para el tratamiento de fenoles son las peroxidasas (E.C. 1.11.1.7¹), que catalizan la oxidación de compuestos fenólicos en presencia de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y, generan radicales libres que reaccionan entre sí para formar polímeros fenólicos. Estos son insolubles y fácilmente eliminables por filtración.

La eliminación de fenoles con peroxidasas no provoca la formación de productos secundarios tóxicos, no es peligrosa ni produce alteraciones ecológicas (Ortega, 2001). Además los polímeros fenólicos producto de la polimerización

¹ Números EC (Enzyme commission numbers), son un esquema de clasificación numérica para las enzimas, basado en las reacciones que catalizan. En este caso 1=oxidoreductasa; 11=peróxido de hidrógeno como aceptor de H⁺; 1=peroxidasa; 7=donador (compuestos aromáticos) (Moss, 1997).

enzimática pueden usarse en recubrimientos, laminados, compuestos de madera, reveladores de color y materiales de grabados. Los fenoles polimerizados también podrían tener aplicaciones en la industria de detergentes (Akkara et al., 2002). También se pueden utilizar en la fotolitografía y recubrimientos electromagnéticos, se los considera polímeros conductores (Pardilla, 2007).

Dados los resultados positivos obtenidos por las peroxidasas de otras fuentes, se esperaría que la peroxidasa de una fuente vegetal con alta disponibilidad y fácil producción en nuestro país, como es el caso del rábano común (*Raphanus sativus var sativus*), cuya producción anual registrada por el Ministerio de agricultura, ganadería acuicultura y pesca, es aproximadamente de 330 toneladas, también pueda proporcionar buenos resultados en la remoción de compuestos fenólicos.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Estudiar la polimerización de fenoles utilizando peroxidasas presentes en rábano común (*Raphanus sativus var sativus*), con aplicación en la biorremediación de aguas residuales de una empresa textilera.

1.3.2. Objetivos específicos

- Purificar con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) las peroxidasas presentes en el extracto de rábano y determinar su actividad enzimática con peróxido de hidrógeno y guayacol como sustratos.
- Desarrollar a escala de laboratorio la validación de un método enzimático para la polimerización de fenoles presentes en el agua residual de la Empresa Textil Ecuador.
- Determinar los parámetros cinéticos y el rendimiento de la remoción enzimática de fenoles en soluciones estándar.

- Determinar el porcentaje de remoción de fenoles en aguas residuales de la Empresa Textil Ecuador.

1.4. Marco teórico

1.4.1. Contaminación del agua

El agua es un recurso natural indispensable para el desarrollo de la vida y, su disponibilidad ha sido afectada por la contaminación, que se genera por la adición de materia orgánica, microorganismos, hidrocarburos, desperdicios industriales, productos utilizados en la agricultura, productos químicos domésticos y desechos radioactivos, a los ríos y lagos (Lomeli y Tamayo, 2009).

La contaminación no sólo afecta a las aguas dulces superficiales, también degrada los recursos hídricos subterráneos. En Europa, durante las últimas décadas se ha visto un progreso significativo en el tratamiento de aguas servidas y efluentes industriales. Actualmente, el tratamiento de aguas residuales y su recuperación es obligatoria (Pramparo, 2008).

En Ecuador, cada persona dispone de 12 mil m³ de agua al año, seis veces más que en la costa peruana. No obstante, aún estamos lejos de encontrar iniciativas para el tratamiento de las aguas contaminadas: en Bolivia y Perú solo el 20% de las aguas servidas cuentan con tratamiento y en Ecuador apenas el 10% (Oxfam, 2009).

La Asamblea General de las Naciones Unidas proclamó el año 2003 como el Año Internacional del agua dulce, para llamar la atención del mundo hacia la crisis que rodea a este recurso natural. La contaminación del agua está intrínsecamente conectada con las actividades humanas, sin embargo la humanidad pone su atención en mejorar las tecnologías de tratamiento de aguas residuales; por lo tanto, los enfoques se centran en una sola pieza y dejan de percibir el problema de la contaminación del agua como un problema mundial que se debe prevenir y, controlar a tiempo.

1.4.1.1. Efluentes industriales

Son aguas residuales provenientes de los procesos industriales, evacuadas en los alrededores de las industrias. La composición de los líquidos residuales varía con el tipo de industria y tipo de proceso que llevaría a cabo (Ecopreneur, 2010).

La clasificación de las industrias de acuerdo con la calidad de sus vertimientos (Figura 1.1) es útil para determinar cuáles son ambientalmente más importantes en un área determinada y, establecer el tipo de tratamiento a aplicar (Mayr, *et al.*, 2002).

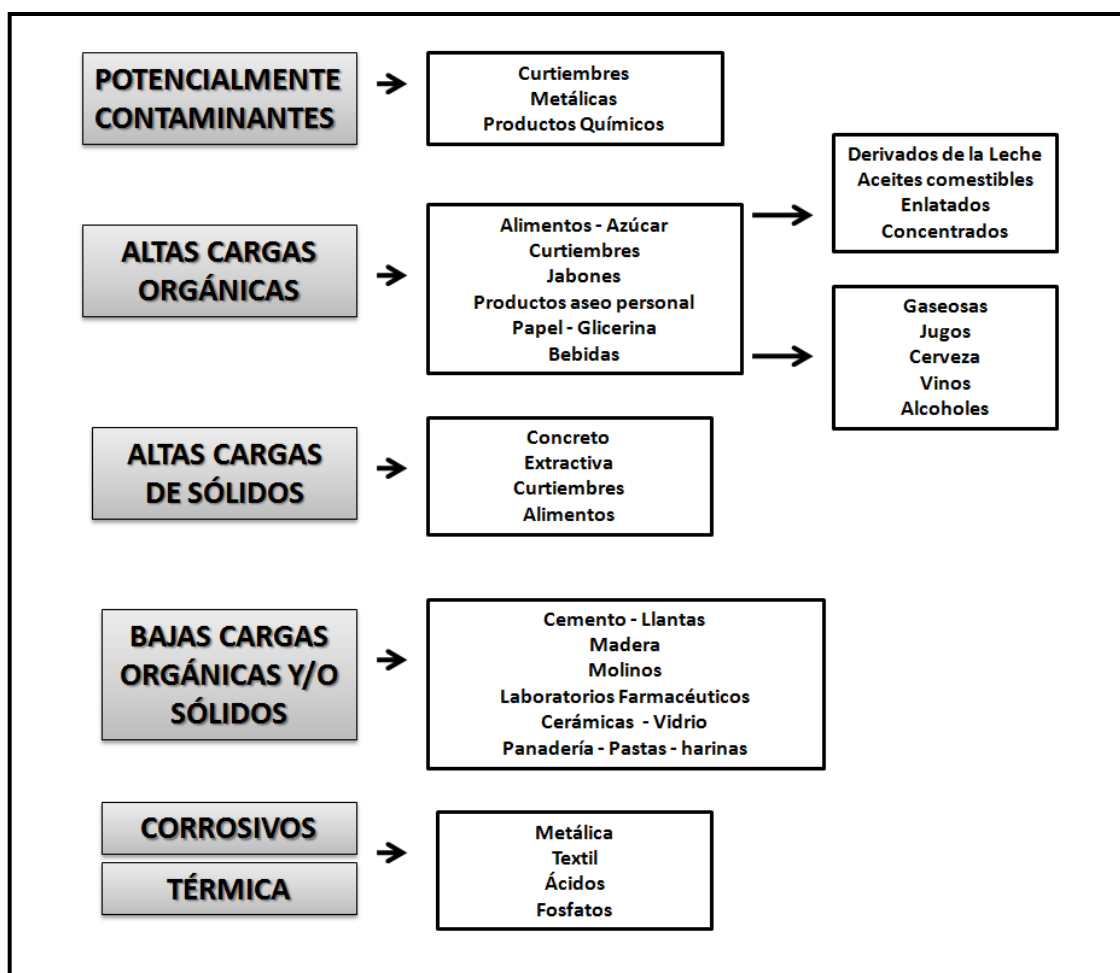


Figura 1.1 Clasificación de Industrias por sus vertimientos (Mayr, *et al.*, 2002).

A pesar de la indiscutible importancia económica, las industrias presentan problemas significativos de contaminación al ambiente, debido a que generan grandes volúmenes de efluentes que contienen principalmente compuestos orgánicos persistentes.

tes no biodegradables, estos contaminantes refractarios permanecen en el ambiente y, causan un desequilibrio ecológico.

1.4.1.1.1. Efluentes de la industria textil

El impacto ambiental de los efluentes líquidos del proceso de elaboración textil es muy variado, por la gran variedad de materias primas, reactivos y métodos de producción. En los efluentes se pueden encontrar sales, ácidos, almidones, peróxidos, pigmentos, dispersos, enzimas, colorantes, metales y otros compuestos químicos y orgánicos de variada estructura, que provienen de las distintas etapas del proceso global (PRODIA, 1999).

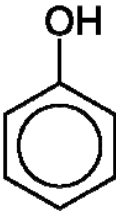
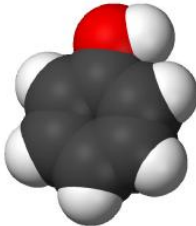
Algunas de las características de los efluentes de las industrias textiles son:

- Color variable intenso
- pH entre 8 a 11, cuando existe recuperación de sosa cáustica, sino mayor de 12.
- DBO₅ mayor de 500 mg.L⁻¹.
- Temperatura mayor de 35 °C.
- Presencia de metales y fenoles debido a los colorantes usados.
- El aporte de efluentes más significativo es el originado en la preparación de la tela, luego el que proviene de las máquinas de teñir, resultando el aporte de caudales de los demás procesos poco significativos con respecto a los anteriores.

1.4.1.2. Contaminación por fenoles

Los fenoles son compuestos orgánicos cuya estructura consiste de un anillo aromático unido a un grupo funcional hidroxilo. Los fenoles sencillos son líquidos o sólidos, de olor característico, poco hidrosolubles y muy solubles en solventes orgánicos (Sánchez y López, 2008). El compuesto más representativo de este grupo es el fenol (C₆H₆O) ver Cuadro 1.1.

Cuadro 1.1 Características del fenol.

	
Nombre IUPAC	Fenol
Número CAS	[108-95-2]
Número RTECS	SJ3325000
Propiedades Físicas	
Estado de agregación	Sólido
Apariencia	Blanco - incoloro
Olor	Dulce, alquitranado
Densidad	1.07 g.cm ⁻³
Masa molar	94.11g.mol ⁻¹
Punto de fusión	40.5 °C
Punto de ebullición	181.7 °C
Punto de inflamación	82 °C
pH	4.8 – 6.0 al 5% en agua
Propiedades Químicas	
Acidez (pKa)	9.95
Solubilidad en agua	8.3g por 100ml (20 °C)
Movimiento dipolar	1.7 D
Toxicidad	
R23	Tóxico por inhalación
R24	Tóxico en contacto con la piel
R25	Tóxico por ingestión
R34	Provoca quemaduras

Fuente: Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas (IPCS)

El fenol se forma naturalmente durante la descomposición de sustancias proteicas, pero la mayor parte del fenol presente en el medio ambiente es de origen antropogénico. Este compuesto químico de alta toxicidad es muy utilizado a nivel industrial, a continuación se presenta algunas de sus aplicaciones:

- Fabricación de resinas fenólicas en industria plástica.
- Fabricación de desinfectantes (derivados clorados del fenol).
- Fabricación de herbicidas, insecticidas y fungicidas (cresoles).
- Constituyente de pinturas germicidas y agentes de impregnación de maderas (pentaclorofenol).
- Antioxidantes en las industrias del caucho (metilfenoles)
- Reactivo de síntesis orgánicas: ácido salicílico, fenoltaleína, ácido pícrico, benceno, clorofenoles, ciclohexanol y diversas drogas farmacológicas.
- En la industria textil, para los procesos de: tintura, desgomado e impermeabilización de seda, mercerizado e impresión de telas (Atanor, 2010).

Se ha estudiado la toxicidad del fenol en el hombre, mamíferos, microorganismos (bacterias, hongos, protozoarios y algas) y en numerosos vertebrados e invertebrados acuáticos (Ver Cuadro 1.2). Los estudios realizados en animales, han demostrado que la exposición continua de la piel al fenol genera cáncer, sin embargo no existe información acerca de la generación de cáncer en humanos a causa del contacto con fenol, aunque sí se lo reconoce como un promotor de tumores (INCHEM).

Cuadro 1.2 Toxicidad del fenol.

Organismo	Vía	Valores de toxicidad
Hombre	-	1 g
Ratas	oral	DL ₅₀ 414-530 mg.Kg ⁻¹
	Dérmico	DL ₅₀ 670 mg.Kg ⁻¹
Conejos	Oral	DL ₅₀ 400-600 mg.Kg ⁻¹
	Dérmico	DL ₅₀ 850 mg.Kg ⁻¹
Gatos	Oral	DL ₅₀ 100 mg.Kg ⁻¹
Perros	Oral	DL ₅₀ 500 mg.Kg ⁻¹
Crustáceos y peces	-	EC ₅₀ 3-7 mg.L ⁻¹
Bacterias	-	EC ₅₀ 244-1600 mg.L ⁻¹

Fuente: INCHEM

1.4.1.3. Normativa para agua residuales industriales en Ecuador

La acción ambiental en nuestro país se inició con la creación del Ministerio del Medio Ambiente del Ecuador, el 4 de octubre de 1996 mediante Decreto Ejecutivo No. 195 publicado en el Suplemento-Registro Oficial No. 40 del 4 de Octubre de 1996.

Actualmente la Ley de Gestión Ambiental establece que la Autoridad Ambiental Nacional la ejerce el Ministerio del Ambiente (MAE), quien gestiona la prevención y el control de la contaminación ambiental, en lo relativo al recurso agua, en base al Texto Unificado de Legislación Secundaria (TULAS), expedido mediante Decreto Ejecutivo No.3399 publicado en el Registro Oficial No. 725 de 16 de diciembre de 2002.

La Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes, se encuentran en el Libro VI, Anexo 1 del TULAS; en ella se establece que el límite permisible de descarga de compuestos fenólicos en aguas residuales es 0.2mg.L^{-1} , tal concentración es aplicable a efluentes cuyo destino sea un sistema de alcantarillado, un cuerpo de agua dulce o un cuerpo de agua salada. Los valores de los límites máximos permisibles presentados en las Tablas No 11, 12 y 13 del Libro VI, Anexo 1 del TULAS (Anexo A), corresponden a promedios diarios de descarga.

1.4.1.4. Tratamientos para la eliminación de fenoles

La eliminación de los fenoles es difícil, debido a su estabilidad y solubilidad en agua. Por lo que el fenol se ha constituido como el compuesto modelo para la evaluación de las propuestas de nuevos procesos de descontaminación.

Existe una extensa variedad de tratamientos desarrollados para la eliminación de compuestos fenólicos, entre los que se encuentran:

- Tratamientos físicos como: adsorción sobre carbón activado (Rodríguez, 2003), extracción con solventes (Savides, 1983) y uso de membranas (Bódalo, *et al.*, 2007).

- Tratamientos químicos como: incineración (Petunchi y Rodríguez, 2003), oxidación con agua supercrítica (Thornton y Savage, 1992), oxidación con aire húmedo (WAO) (Eftasias, 2002), oxidación catalítica con aire húmedo (CWAO) (Eftasias, 2002), tratamiento electroquímico (Iniesta, 1999), oxidación con peróxido de hidrógeno y ozono (Ramírez, 2002), oxidación catalítica (Castro, 2009), oxidación fotocatalítica heterogénea (Rodríguez, 2003), proceso Fenton homogéneo y heterogéneo (Aguayo, 2008).
- Tratamientos biológicos (Díaz, 2005 y McAllister et al., 1996).

1.4.1.4.1. Tratamiento Enzimático

A partir de 1970 se han usado enzimas de plantas y microorganismos para catalizar la oxidación de fenoles. En el Cuadro 1.3 se presentan algunas enzimas y sus aplicaciones en el tratamiento de aguas residuales.

Cuadro 1.3 Enzimas y sus aplicaciones en el tratamiento de aguas residuales.

Enzima	Fuente	Aplicación
Peroxidasa	<i>Armoracia rusticana</i> <i>Artromyces ramosus</i> Plantas	Degradación de fenol, anilina y clorofenol Degradación de poliaromáticos, fenoles y herbicidas. Polimerización de ácido húmico Descontaminación del agua
Cloroperoxidasa	<i>Caldariomyces funago</i>	Oxidación de compuestos fenólicos. Biosensores para detección de clorofenoles
Lignina peroxidasa	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> <i>Chrysonilia sitophila</i>	Degradación de compuestos aromáticos Descontaminación de efluentes Kraft
Manganeso peroxidasa	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> <i>Nematolona frowardii</i> <i>Phebia radiata</i> <i>Lentinula edodes</i>	Degradación de ligninas, fenoles, pentaclorofenol y colorantes Degradación de ligninas Degradación de clorofenoles

Tirosinasa	Sigma <i>Agaricus bisporus</i>	Biosensor de fenol, degradación de fenoles y aminas, oxidación de catecol y polimerización de compuestos fenólicos Oxidación de catecol
Lacasa	<i>Pyricularia oryzae</i> <i>Trametes versicolor</i> <i>Cerrena unicolor</i> <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> Plantas	Degradación de colorantes Degradación de efluentes de textileras y de clorofenoles Degradación de 2,4-diclorofenol Degradación de benzopirenos Clorofenoles
Catecol dioxigenasa	<i>Comamonas testosteroni</i>	Oxidación de clorofenol
Fenoloxidasas	<i>Gloeophyllum trabeum</i> <i>Trametes versicolor</i> <i>Thermoascus aurantiacus</i>	Descontaminación de efluentes Kraft

Fuente: Duran y Esposito, 2000.

Las ventajas del método enzimático son: no forma productos secundarios tóxicos, no es costoso, presentan una gran especificidad por los compuestos fenólicos, es fácil de manipular, no es peligroso y además no provoca alteraciones ecológicas (Ortega, 2001). La especificidad de las enzimas evita reacciones indeseables e innecesarias que incrementan el consumo de reactivos y así aumenta el costo del tratamiento, esta es una gran ventaja sobre algunos tratamientos químicos convencionales.

A diferencia de los tratamientos biológicos las enzimas son aplicables a una extensa gama de compuestos; actúan en presencia de sustancias tóxicas para los microorganismos; poseen un amplio rango de pH y temperatura; no necesitan aclimatación y no generan biomasa y, necesitan procesos de control más simples (Nicell *et al.*, 1993). En comparación con los tratamientos físicos y químicos, su funcionamiento no es corrosivo y reduce el consumo de compuestos oxidantes.

El tratamiento enzimático de compuestos fenólicos tiene una desventaja importante: el relativamente corto tiempo de vida catalítica de la enzima, que puede ser causado por la inactivación de la peroxidasa (Biswas, 1999).

1.4.2. Peroxidasas

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7) son oxidorreductasas² que se encuentran distribuidas en el reino vegetal, los tejidos animales y microorganismos. Catalizan la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando la capacidad oxidante del peróxido de hidrógeno. De entre ellas la extraída de la raíz del rábano picante (HRP) es la más usada.

Las peroxidasas son utilizadas en laboratorios clínicos y en la industria. Así, los ensayos para la determinación y cuantificación de metabolitos como glucosa, ácido úrico, colesterol o triglicéridos en fluidos biológicos usan peroxidasas como enzima acoplada. También se aplican en inmunoensayos para la detección de virus conocidos como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) causante del SIDA o herpesvirus (Rodríguez-López *et al.*, 2002).

Las enzimas peroxidásicas se emplean como biocatalizadores para la generación de productos de interés biotecnológico e industrial como resinas fenólicas, adhesivos, antioxidantes, antiestáticos y protectores de radiación magnética, colorantes alimentarios y componentes bioactivos de detergentes (Rodríguez-López *et al.*, 2002).

La Comisión Científica de la Unión Europea ha definido a las peroxidasas como una de las proteínas con mayor interés biotecnológico para el siglo XXI, por su aplicación en la conservación del ambiente. En esta línea estas enzimas pueden sustituir a algunos reactivos y catalizadores químicos usados hoy en día en cierto tipo de industrias, además facilitan la remoción de compuestos orgánicos contaminantes.

1.4.2.1. Características generales

La primera peroxidasa fue aislada de una planta de higo en 1936; posteriormente se han aislado y purificado otras peroxidasas, de las cuales las más investigadas han sido la HRP y la peroxidasa de nabo (SBP) (Tabatabaei Yazdi *et al.*, 2000).

² Catalizan reacciones de oxidorreducción, es decir, transferencia de hidrógeno (H), oxígeno (O), o electrones (e⁻) de un sustrato a otro.

Las peroxidasas son glucohemoproteínas con actividad catalítica. En su centro activo presentan un grupo hemo tipo b que contiene un ión de hierro en cuya coordinación participan los cuatro nitrógenos pirrólicos y el nitrógeno ϵ del anillo imidazólico de una histidina axial denominada histidina proximal; el sexto ligando varía a lo largo del ciclo catalítico como se muestra en la Figura. 1.2 (Ruíz, 1998).

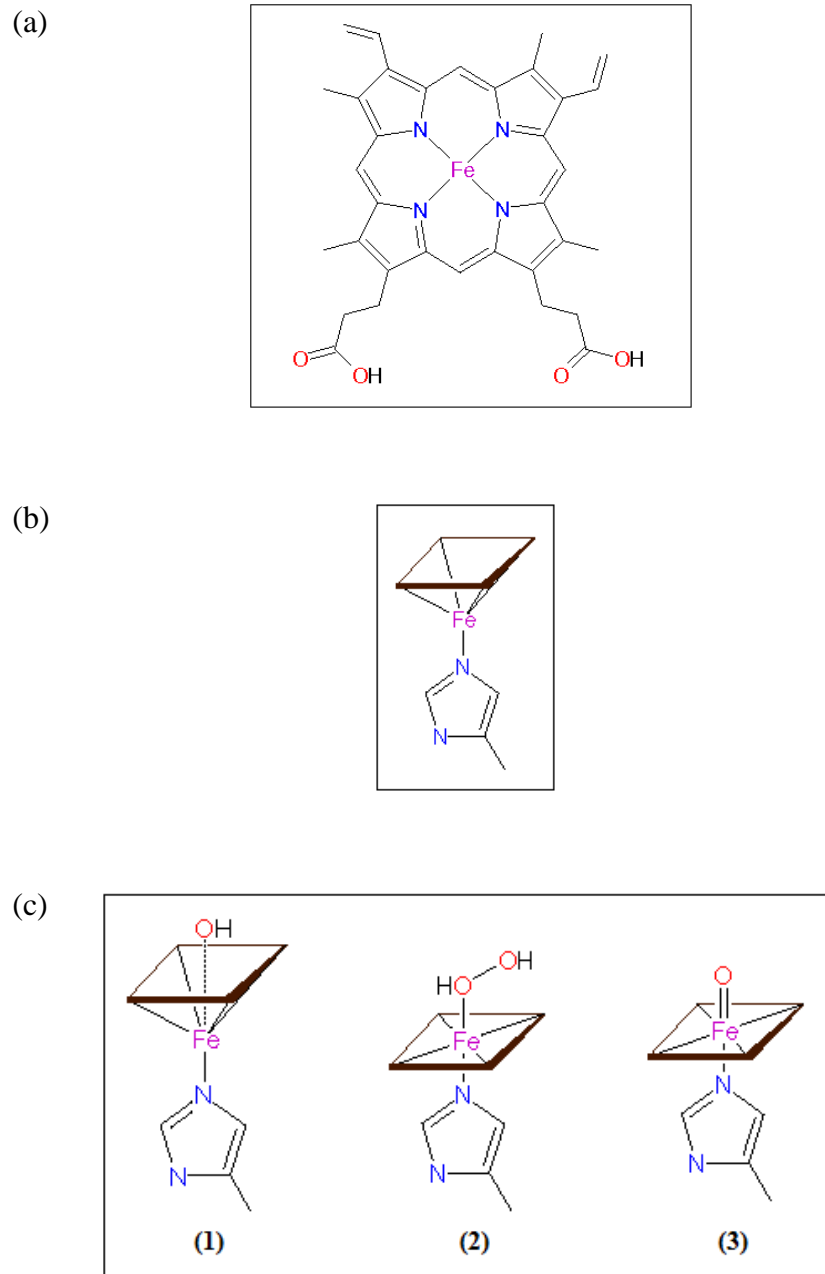


Figura 1.2 (a) Grupo hemo tipo b; Diferentes estados de coordinación del hierro: (b) Hierro pentacoordinado, el ligando axial es el $N^{\epsilon}_{\text{His}}$. (Nitrógeno ϵ de la His proximal), (c) Hierro hexacoordinado, los ligandos axiales son: (1) el $N^{\epsilon}_{\text{His}}$ y un OH, (2) el $N^{\epsilon}_{\text{His}}$ y una molécula de H_2O_2 , y (3) el $N^{\epsilon}_{\text{His}}$ y un O (Welinder, 1992).

Las isoperoxidasas de plantas pueden ser subdivididas en tres subgrupos: ácidas, neutras y básicas, de acuerdo a su movilidad electroforética³ (Jouilia *et al.*, 2008). En base a diferencias en la estructura primaria, las superfamilia de peroxidadas de plantas se dividen en tres clases: Clase I, enzimas intracelulares en plantas, bacterias y levaduras; Clase II, enzimas extracelulares de hongos y; Clase III, enzimas de secreción en plantas, dentro de este grupo se incluyen la peroxidasa de rábano picante (*Armoracia rusticana*) (HRP) y la peroxidasa de *Arabidopsis thaliana* (Higara *et al.*, 2001 y Jouilia *et al.*, 2008).

Las peroxidadas Clase III tienen importantes roles en las funciones celulares de las plantas, α -oxidación de ácidos grasos en semillas y hojas de frijol, biosíntesis de lignina; biosíntesis de los polímeros de la pared celular; cicatrización y regeneración de tejido vegetal, posiblemente participa en el catabolismo de auxinas y en la defensa contra el ataque de patógenos, metabolismo de hormonas y respuesta al estrés, metabolismo de ácido indolacético (IAA). La función fisiológica de las peroxidadas no se conoce en su totalidad, debido a las múltiples formas de enzima que existen en diversas plantas (Tabatabaei Yazdi *et al.*, 2000).

Al comparar las peroxidadas bacterianas, fúngicas y de plantas se puede comprobar que, a pesar de que la identidad de secuencia es inferior al 20%, el plegamiento global y la organización de la estructura secundaria están conservados, los dos dominios estructurales (dominio proximal y distal) se mantienen. Todas están compuestas por 10-11 α -hélices unidas por lazos con escasas estructuras β . Algunos residuos de prolina y glicina implicados en el plegamiento de la cadena principal están conservados por razones estructurales, al igual que sucede con un puente de hidrógeno que conecta los dos dominios (Ruíz, 1998).

Las peroxidadas presentan dos iones calcio, cada uno de ellos se encuentra en un dominio diferente. El ión calcio del dominio proximal está fuertemente unido, mientras que el distal parece estarlo más débilmente por su cercanía a la superficie molecular y exposición al solvente (Ruíz, 1998). En la Figura 1.3 se muestra la representación tridimensional de la HRP C, la isoenzima más estudiada del rábano

³ La movilidad electroforética es la velocidad de migración de una partícula cuando se aplica un campo eléctrico, su signo es igual a la carga de la partícula.

picante; el grupo hemo (de color rojo) está localizado entre el dominio distal y proximal, cada dominio contiene un átomo de calcio (esferas de color azul); las hélices α y las láminas β de la enzima se presentan de color morado y amarillo, respectivamente (Veitch, 2004).

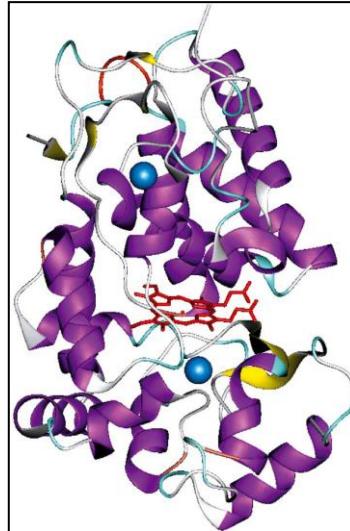


Figura 1.3 Estructura tridimensional de la HRP C (Veitch, 2004).

Los carbohidratos forman parte de la estructura de las peroxidasas y, son importantes en la solubilidad y eficacia de estas enzimas. El contenido total de carbohidratos en la HRP C depende de la fuente de la enzima y los valores típicos están entre el 18 y el 22% (Veitch, 2004).

En 2008 Duarte-Vázquez *et al.* aislaron las isoformas de las peroxidasas más importantes en nabo (peroxidasa de nabo soluble y peroxidasa de nabo unida a membrana) y brócoli para determinar su peso molecular y contenido de carbohidratos, de acuerdo a los resultados el peso molecular y el contenido de carbohidratos de una isoperoxidasa soluble de nabo y otra de brócoli fueron muy similares (Cuadro 1.4); sin embargo el peso molecular de la isoperoxidasa unida a membrana fue menor y no se detectó la presencia de carbohidratos.

Cuadro 1.4 Peso molecular y contenido de carbohidratos de las peroxididasas obtenidas de nabo y brócoli.

Peroxidasa	Peso molecular (KDa)	Carbohidratos (%)
Nabo soluble	36	9
Nabo unido a membrana	20	-
Brócoli	45	16

Fuente: Duarte – Vázquez, 2008.

A partir del análisis estructural del centro activo de las diferentes peroxididasas cristalizadas hasta la fecha, se han podido identificar una serie de residuos implicados en la ruptura heterolítica del peróxido de hidrógeno y en la estabilización de los diferentes estados de oxidación del hierro a lo largo del ciclo catalítico. Estos residuos se encuentran localizados por encima y por debajo del plano que ocupa el grupo hemo, en los denominados respectivamente lados distal y proximal en referencia a las dos histidinas axiales, una de las cuales actúa como quinto ligando del hierro (Ruíz, 1998). En la Figura 1.4 el grupo hemo y el hierro se presentan de color rojo, la His 170 es la histidina proximal que está unida al hierro.

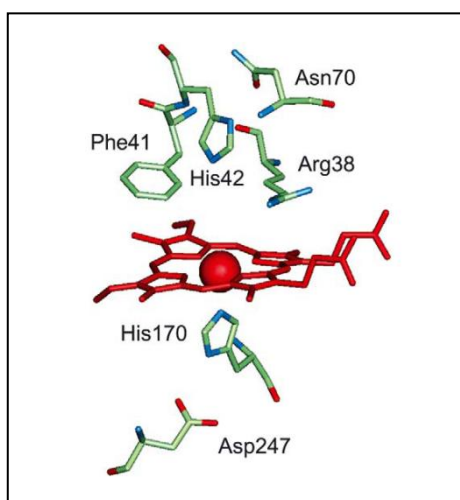


Figura 1.4 Aminoácidos cercanos al centro activo de la HRP C (Veitch, 2004).

El lado proximal del hemo presenta dos residuos invariables en todas las peroxidasas: una histidina axial y un aspartato (His 170 y Asp 247 en la HRP C) (Ruíz, 1998 y Veitch, 2004). La histidina es el ligando proximal del hierro y se encuentra unida a la cadena lateral del aspartato por un puente de hidrógeno (Figura. 1.5). Esta interacción proporciona al residuo de histidina el carácter aniónico imprescindible para la estabilización de los elevados estados de oxidación del hierro (Goodin y Mcree, 1993). En el lado proximal de todas las peroxidasas también se puede observar un residuo aromático que varía en las tres clases de peroxidasas. Este residuo es un triptófano en las de la Clase I y una fenilalanina en las de las clases II y III, con la excepción de la ARP y CIP (peroxidasa de *Arthromyces ramosus* y *Coprinus cinereus*) que presenta una leucina en dicha posición (Ruíz, 1998).

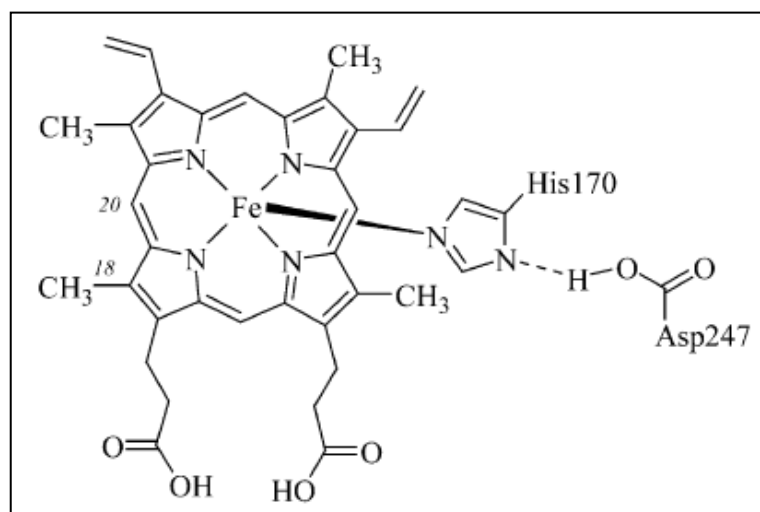


Figura 1.5 Estructura esencial de centro activo de la HRP C (Veitch, 2004).

Los residuos del lado distal cumplen una doble función. Conjuntamente con los del lado proximal participan en la estabilización de los estados de oxidación del hierro en los compuestos I y II de la enzima, e intervienen directamente en la interacción con el peróxido de hidrógeno (Ruíz 1998). Al igual que en el lado proximal, dos residuos aparecen conservados en todas las peroxidasas: una histidina distal y una arginina distal (His 42 y Arg 38 en la HRP C; ver Figura 1.4).

1.4.2.2. Mecanismo de reacción

Las peroxidasas oxidan una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos, siguiendo un mecanismo bisustrato ordenado, donde participan dos sustratos y se obtienen dos productos.

Las peroxidasas catalizan reacciones de peroxidación, como se muestra en el siguiente esquema:

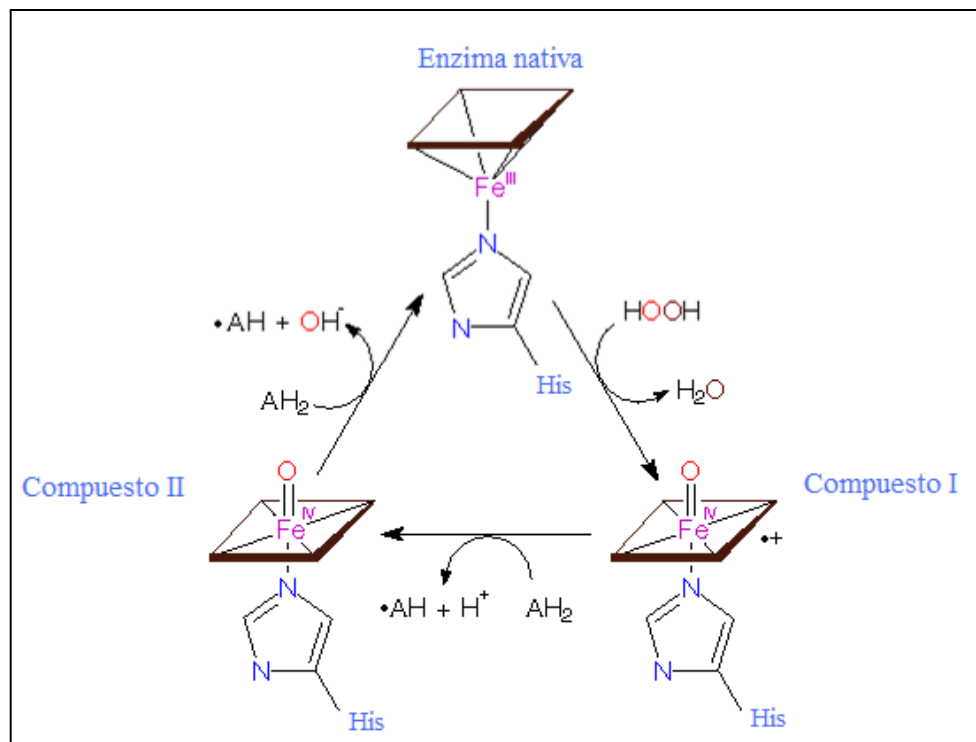
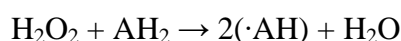


Figura 1.6 Mecanismo de reacción general de las peroxidasas (Welinder, 1992).

En el ciclo catalítico presentado en la Figura 1.6, la enzima nativa (E) es oxidada por peróxido de hidrógeno formando el Compuesto I (Ei). Esto implica una reacción de óxido-reducción de dos electrones en la que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es reducido a agua (H_2O) y la enzima es oxidada. Un equivalente de oxidación reside en el hierro en forma de un intermediario oxoferril ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) y el otro, en la mayoría de las peroxidasas, reside en la porfirina (en forma de radical cationico π de la porfirina, representado en la Figura 1.4 como $\cdot+$). A continuación, el Compuesto I puede oxidar un sustrato (AH_2) mediante una reacción de transferencia electrónica en la

que se forma el radical del sustrato correspondiente ($\cdot\text{AH}$). La enzima queda como Compuesto II (Eii) con un centro $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ coordinado con la porfirina que ha recuperado su electrón. Finalmente, el $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ del Compuesto II es reducido a la forma férrica (Fe^{3+}) de la enzima nativa mediante la sustracción de un electrón de otra molécula de sustrato, liberando un segundo radical libre ($\cdot\text{AH}$) (Samuelson *et al.*, 2001).

La reacción enzimática general se presenta a continuación:



Los radicales libres formados durante el ciclo catalítico se unen formando cadenas de polímeros con baja solubilidad y que tienden a precipitar en la solución. En la remoción de fenol, los radicales formados son radicales fenoxil que pueden acoplarse entre sí para generar diversos oligómeros y polímeros (Figura 1.7).

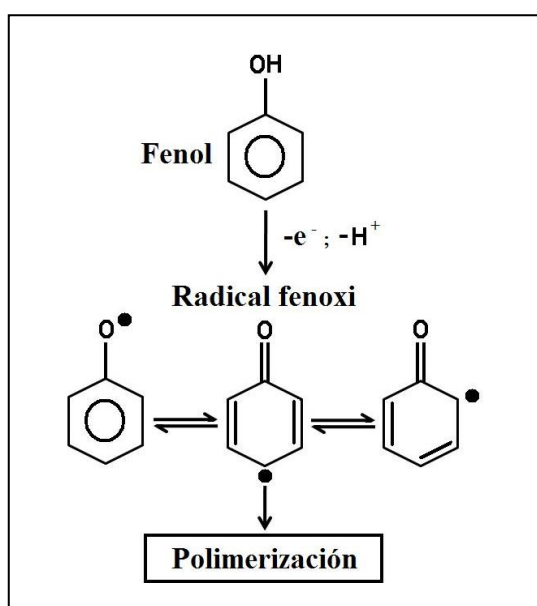
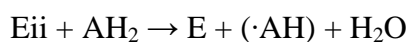
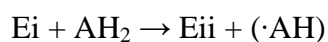
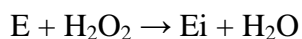
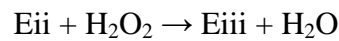


Figura 1.7 Diagrama del mecanismo de polimerización del fenol (Lapiente, 2000).

A pesar que las reacciones:



Dominan la mezcla líquida de enzima, peróxido de hidrógeno y fenol, pueden ocurrir reacciones secundarias responsables de la inactivación e inhibición de la enzima. Arnao *et al.* (1990) citado por Biswas (1999) reportó la formación del Compuesto III de la peróxidasa (Eiii), generado por el exceso de peróxido de hidrógeno que produce la oxidación del Compuesto II (Eii), de acuerdo a la siguiente ecuación:



El Compuesto III es equivalente a la oxi-ferro o superoxi-ferri forma de la enzima. El retorno a la enzima nativa es extremadamente lento, por lo tanto una vez en la forma Eiii, la enzima es incapaz de llevar a cabo la oxidación de compuestos aromáticos (Arnao *et al.*, 1990 citado por Biswas, 1999).

La inhibición de la peroxidasa por el exceso de peróxido de hidrógeno, es una inhibición por exceso de sustrato, en donde a una concentración dada de enzima, la velocidad inicial de reacción aumenta con el incremento de la concentración inicial de sustrato, hasta un valor límite (velocidad máxima) y, a concentraciones mayores de sustrato, la velocidad inicial es menor que el valor máximo (Chávez *et al.*, 1990). La representación gráfica de la inhibición por exceso de sustrato se muestra en la Figura 1.8.

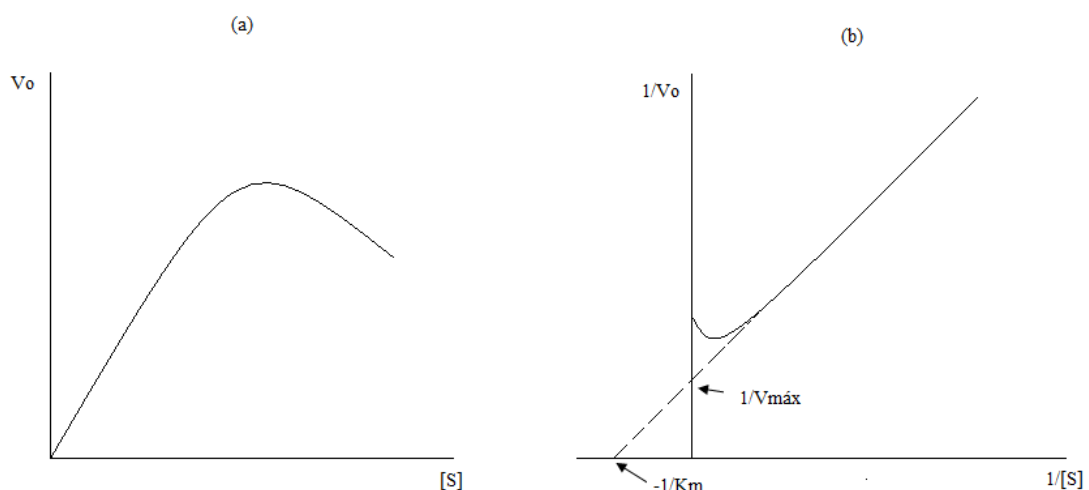


Figura 1.8 Inhibición por exceso de sustrato (Chávez *et al.*, 1990). (a) Dependencia de V_o vs $[S]$ (Michaelis-Menten). (b) Gráfico de los dobles recíprocos $1/V_o$ vs $1/[S]$ (Lineweaver-Burk).

1.4.2.3. Isoformas de peroxidasas

Las isoenzimas son enzimas que difieren en la secuencia de aminoácidos y que catalizan la misma reacción, pero individualmente pueden mostrar diferencias en sus propiedades físico-químicas y cinéticas. En cuanto al número de isoenzimas se encuentran diferencias entre la gran variedad de plantas e incluso en una misma.

Para la detección de isoenzimas se utilizan técnicas variadas entre ellas la electroforesis en sus diversas modalidades debido a las diferentes migraciones de las enzimas frente a un campo eléctrico.

Del rábano picante (*Armoracia rusticana*) se han aislado 15 isoenzimas: HRP A1–A3 (ácidas), B1–B3 y C1–C2 (neutras) y D y E1-E6 (básicas). Para la purificación de las isoformas de HRP se han analizado los puntos isoeléctricos de cada una (Veitch, 2004).

Evans (1967) utilizó electroforesis en gel de almidón para identificar 12 isoenzimas de la planta de tomate (*Lycopersicon esculentum*), de las cuales 9 son aniónicas y 3 catiónicas. Cuatro de los principales peroxidasas se aislaron y purificaron parcialmente, con acetona y precipitaciones de sulfato de amonio; además se empleó cromatografía en DEAE y CM-celulosa.

1.4.2.4. Factores que influyen sobre la actividad peroxidásica

1.4.2.4.1. Efecto del pH sobre la actividad peroxidásica

El pH afecta la actividad enzimática si tenemos en cuenta su influencia sobre los procesos de unión del sustrato y su transformación catalítica.

Se ha demostrado que no hay coincidencia en el pH óptimo de las peroxidasas de diversas fuentes vegetales cuando se emplea el guayacol como donador de hidrógeno. Sin embargo, la mayoría de las peroxidasas son activas en un rango de pH relativamente amplio (3-12), lo que puede deberse a la presencia de diferentes isoenzimas las cuales tienen cada una un pH óptimo para realizar su función catalítica.

A continuación se presenta los siguientes pH óptimos para peroxidasas de diferentes fuentes (Marquéz, 1997):

Cuadro 1.5 pH óptimo de tres peroxidasas.

Peroxidasa	pH
POD Aniónica de Tomate	5.5
POD Coliflor	6.5
HRP	7.0

Fuente: Marquéz, 1997.

Según Floris *et al.* (1984) el efecto del pH sobre la actividad peroxidásica de *Euphorbia characias* depende del tampón utilizado, así en tampón acetato de sodio y con o-dianisidina como sustrato, el pH óptimo es 5.75.

1.4.2.4.2. Efecto de la Temperatura sobre la actividad peroxidásica

Según Yamamoto *et al.*, (1962) la complejidad de la inactivación de las peroxidasas es debida a la presencia de diferentes especies isoenzimáticas, por ejemplo la peroxidasa del maíz consta de fracciones resistentes y lábiles al calor, donde el 5% de la actividad total pertenece a la fracción resistente al calor la que requiere un tratamiento adicional para ser inactivada. Además, Winter (1969) estudió las peroxidasas de varios vegetales y encontró que muchas de ellas contienen isoformas resistentes y sensibles al calor.

La peroxidasa es una de las enzimas más termoestables de las plantas y bajo ciertas condiciones de tratamiento con calor puede retener la actividad durante el almacenaje (Lee *et al.*, 1984). Estos autores al estudiar la peroxidasa de coliflor determinaron que la temperatura óptima era de 40°C y que la actividad disminuía drásticamente a temperaturas superiores hasta llegar al 50% a 48°C y aproximadamente 0% a 60°C, por lo que llegaron a la conclusión de que la enzima de la coliflor es termolábil.

El estudio de la inactivación térmica de la peróxidasa de remolacha indica que la enzima es estable a 50°C y solo un 5% de la actividad se reduce después de 30 minutos (Rudrappa *et al.*, 2005). La peroxidasa de alcachofa es estable a temperaturas de 65 °C aproximadamente durante más de 24 horas (Rodríguez-López *et al.*, 2002).

La peróxidasa de nabo cuando se calienta a 60° C durante 25 minutos, retiene aproximadamente el 90 % de su actividad original, incluso después de un tratamiento más drástico (80° C, 25 minutos) muestra actividad. De acuerdo con estos resultados la enzima con actividad peroxidásica de nabo parece ser más termorresistente que la peroxidasa purificada de col de Bruselas, así como preparaciones comerciales de peroxidasa de rábano picante, las cuales son totalmente inactivadas después de 10 minutos de calentamiento a 80 °C (García *et al.*, 2003).

Se han postulado muchas hipótesis para explicar la termorresistencia de las peroxidasas. Algunos trabajos han demostrado que las cadenas de carbohidratos unidas a la molécula de proteína incrementan su estabilidad térmica. Por otro lado, en estudios preliminares de dispersión dinámica de la luz se encontró que la peroxidasa es una proteína con alta tendencia a formar agregados, dichos agregados le confieren o incrementan su termoestabilidad (Duarte-Vázquez *et al.*, 2003).

1.4.2.4.3. Otros factores que influyen la actividad peroxidásica

Además del pH y la temperatura, existen otros factores que alteran la actividad enzimática, tales como las radiaciones electromagnéticas, la humedad, la concentración de sustrato, la presencia de activadores, los metales pesados, entre otros.

Güngör en el 2008 realizó una investigación de la influencia de los metales pesados sobre la actividad enzimática de la papa alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus* L.). Evaluó el efecto in vitro de metales pesados como: hierro (Fe^{2+} y Fe^{3+}), cobalto (Co^{2+}), estroncio (Sr^{2+}), zinc (Zn^{2+}), mercurio (Hg^{2+}), níquel (Ni^{2+}), aluminio (Al^{2+}) y plomo (Pb^{2+}) y descubrió que ciertas concentraciones de dichos metales inhiben la actividad peroxidásica hasta en un 50 %.

1.4.2.5. Fuentes de obtención

Las peroxidases se encuentran distribuidas en animales (ratas, conejos, cerdos), plantas superiores (rábano picante, mango, arroz, soya, piña, pera, papa, tabaco, maíz, maní, caña de azúcar, tomate, remolacha, nabo), levaduras, hongos y bacterias. En los mamíferos se halla principalmente en leucocitos, hígado, útero, leche y tiroides; por tanto la enzima puede ser aislada de diferentes fuentes. Las peroxidases de diversas fuentes han sido investigadas y se encuentran registradas en bases de datos virtuales⁴.

Las especies vegetales más ricas en peroxidases son las higueras y el rábano picante, las enzimas con actividad peroxidásica se encuentran principalmente en la savia y en la raíz, respectivamente (Marquéz, 1997).

1.4.2.6. Métodos de aislamiento y purificación

Los métodos de aislamiento y purificación que aparecen en la literatura varían en dependencia de la fuente y localización de las enzimas.

En general los métodos de aislamiento y purificación de peroxidases siguen el esquema presentado en la Figura 1.9.

⁴ Las bases de datos existentes en la web son: Peroxidasebase y Brenda.

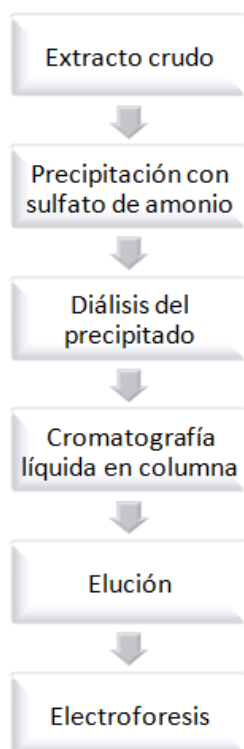


Figura 1.9 Esquema para el aislamiento y purificación de peroxidasas.

La peroxidasa del látex de *Euphorbia characias* ha sido aislada y purificada hasta la homogeneidad utilizando precipitación salina con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE-celulosa (dietilaminoetil celulosa), hidroxilapatita y SP-sephadex (Floris *et al.*, 1984).

La cromatografía de interacciones hidrofóbicas fue el método utilizado por Lee *et al.* (1984) para la separación de tres isoenzimas de coliflor empleando una columna cromatográfica con fenil-Sepharosa CL 4B.

El procedimiento de purificación de peroxidasas de rábano picante incluye precipitación en sulfato de amonio y cromatografía sobre columnas de CM-celulosa y DEAE-celulosa (Shannon *et al.*, 1966).

Marquéz (1997) para purificar peroxidasa de rábano picante (HRP) utilizó sulfato de amonio al 90% en la precipitación de la enzima. También empleó cromatografía de intercambio iónico en CM-celulosa y en DEAE-celulosa y,

cromatografía de afinidad con Concanavalina A-Sepharosa 4B (Con A). Además realizó un análisis electroforético con electroforesis de disco en geles de poliacrilamida.

En relación con las isoenzimas existen investigaciones muy variadas en dependencia de la fuente vegetal y los métodos de purificación empleados.

1.4.2.7. Métodos de determinación de actividad peroxidásica

La actividad peroxidásica se determina generalmente por métodos espectrofotométricos, que emplean diferentes combinaciones de tampones y sustratos, variando las condiciones de ensayo en cuanto a temperatura, volumen, concentraciones y pH.

El sustrato primario más empleado es el peróxido de hidrógeno y, los sustratos secundarios utilizados son: guayacol (2-metoxifenol), o-dianisidina (4-(4-amino-3-methoxyphenyl)-2-methoxyaniline) y ABTS (ácido 2,2'-Azino-bis-[3-Etilbenzotiozol-6-Sulfónico]). El sustrato oxidable más usado es el guayacol, que es oxidado a un complejo coloreado de tetraguayacol en presencia de peroxidasa (Santiago *et al.*, 2009). El tetraguayacol desarrolla un color pardo (rojo ladrillo) cuya absorbancia se mide a 470 nm (Figura 1.10).

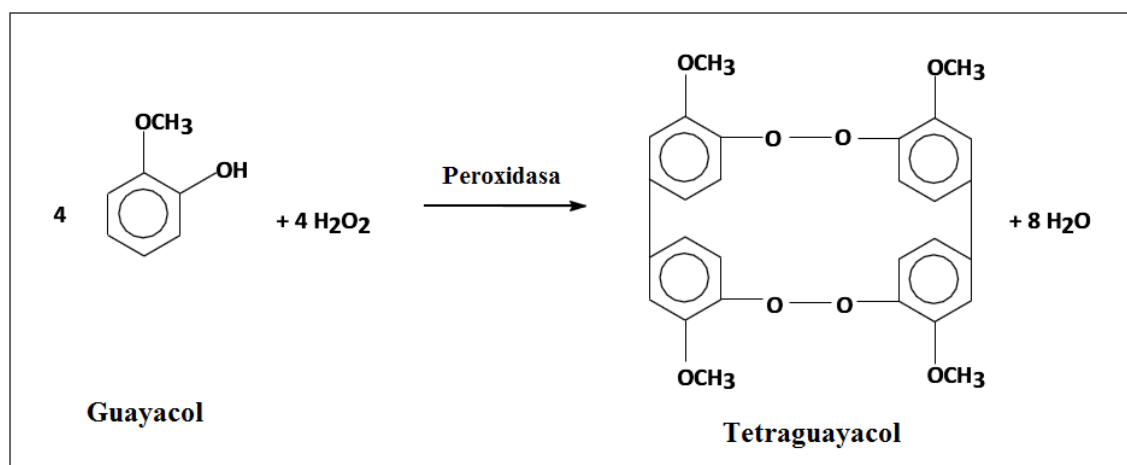


Figura 1.10 Formación del tetraguayacol (Santiago *et al.*, 2009).

Los tampones que se emplean son: acetato de sodio pH 5.4 (Shannon *et al.*, 1966) Tris -HCl a pH 7.0 (Pascual *et al.*, 1983), fosfato de sodio a pH 7.4 (Pramparo, 2008).

Shannon *et al.* (1966) plantearon que la actividad peroxidásica se mide por seguimiento espectrofotométrico del cambio de la absorbancia a 460 nm debido a la oxidación de la o-dianisidina en presencia de peróxido de hidrógeno y enzima. La mezcla de reacción empleada contiene o-dianisidina 0.5%, peróxido de hidrógeno 1 mol.L⁻¹, tampón acetato de sodio pH 5.4 y la enzima.

Pascual *et al.*, (1983) citado por Marquéz (1997), para determinar la actividad peroxidásica empleó un método continuo donde los sustratos son: el guayacol y el peróxido de hidrógeno; el tampón que usó es Tris-HCl 0.01 mol.L⁻¹, pH 7.0. La velocidad de la reacción de oxidación del guayacol por la enzima, en presencia de peróxido de hidrógeno, se determinó en un espectrofotómetro, registrándose los valores de absorbancia a 470 nm (zona del espectro donde absorbe el guayacol oxidado de coloración pardo). La variación de densidad óptica se tomó durante 3 minutos en intervalos de 15 segundos.

Cuando el sustrato a emplearse es el fenol, la actividad peroxidásica se determina con la aplicación de 4-aminoantipirina, este compuesto es un cromógeno que reacciona con los polímeros del fenol y, hace que la solución adquiera un color rojizo que absorbe la luz a una longitud de onda de 510 nm (Pramparo, 2008).

1.4.2.7.1. Cálculo de la actividad enzimática.

Una unidad de actividad enzimática (AE) se define como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de guayacol oxidado en 1 minuto, referido a 1 mL de preparado enzimático (Actividad enzimática) o 1 mg de proteína (Actividad específica) (Marquéz, 1997). La AE también se define como la cantidad de enzima que convierte 1 mol de peróxido de hidrógeno por minuto a pH 7,4 y 25 ° C (Pramparo, 2008).

Para el cálculo de la actividad enzimática se aplica la siguiente fórmula:

$$AE = \frac{\Delta DO_{470nm}}{\Delta t} \times \frac{1}{k} \times \frac{1}{d} \times \frac{1}{Ve} \times Vc \times dil$$

Donde:

AE: actividad enzimática expresada en UI ($\mu\text{moles.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$)

Ve: volumen de enzima (mL)

Vc: volumen de cubeta (mL)

dil: dilución

d: espesor de la cubeta (1 cm)

k: coeficiente de extinción

El coeficiente de extinción o absortividad es una medida de la cantidad de luz absorbida por unidad de concentración, a una longitud de onda dada. El coeficiente de extinción del guayacol es $5570 \times 10^{-6} \text{ L}.\mu\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ a 470 nm y el coeficiente de extinción del fenol es $6 \text{ L}.\mu\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ a 510 nm.

1.4.2.8. Métodos de ensayo para la determinación del control de cada etapa de la purificación de la enzima

Durante toda la purificación es necesario detectar la presencia de la enzima en forma activa. Pero además, como la enzima está acompañada de una gran variedad de moléculas proteicas, se hace imprescindible la evaluación de la cantidad de proteína en cada una de las etapas.

Existen diversos métodos para determinar la proteína total (Lowry, Biuret, Bradford, entre otros) y, la selección de uno de ellos depende muchas veces, de las características del material de partida (Chávez *et al*, 1990). Uno de los métodos más utilizados para la determinación de concentración de proteína, es el método de adsorción UV a 280 nm, el mismo que permite cuantificar las proteínas totales en una muestra de acuerdo con la Ley de Lambert-Beer, debido a que las proteínas muestran un fuerte grado de absorción a 280 nm en UV, principalmente debido a sus residuos de triptófano y tirosina, que permanecen constantes (Battaner, 1993).

La determinación tanto de la actividad enzimática como de la concentración de proteína [P] se convierten en ensayos importantes durante la purificación y permiten evaluar la eficiencia, mediante tres parámetros de control:

1. Actividad específica (Act. Esp.)- Es la actividad enzimática por la cantidad de proteína presente en cada etapa (Chávez *et al*, 1990).

$$Act. esp. = \frac{AE}{[P]}$$

2. Rendimiento.- Se refiere a la cantidad de enzima obtenida en cada etapa y está dado por la actividad enzimática total (Chávez *et al*, 1990).

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{AE \text{ total (Etapa } n)}{AE \text{ total (Etapa 1)}} \times 100$$

3. Grado de purificación (GP).- Indica cuantas veces se purifica la enzima y es un indicador de la eficiencia del proceso. Se determina relacionando la actividad específica de una etapa cualquiera, con la actividad específica de la primera etapa (Chávez *et al*, 1990).

$$GP = \frac{Actividad \text{ específica (Etapa } n)}{Actividad \text{ específica (Etapa 1)}}$$

Los parámetros descritos indican, que tan efectivo ha sido el método de purificación empleado en la eliminación de contaminantes, sin que la enzima sufra cambios que afecten su funcionalidad.

1.5. Hipótesis

El extracto de rábano (*Raphanus sativus*) es fuente de peroxidasas enzimáticamente activas, capaces de remover los compuestos fenólicos de aguas contaminadas.

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOS

La investigación de laboratorio se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio de Investigaciones Aplicadas (LIA) de la Escuela Politécnica Nacional (0°12'38"S78°29'20"O), ubicada en la ciudad de Quito.

2.1. Ensayo para la obtención del extracto crudo enzimáticamente activo de *Raphanus sativus var sativus*

El material vegetal fresco se recogió el 22 de Junio del 2010 a las 7:30 am en la huerta de la Señora Sandra Inaquiza, ubicada entre la Av. Pablo Guarderas y Jaime Roldós Aguilera, de la Ciudad de Machachi, Cantón Mejía, Provincia de Pichincha. Los rábanos (*Raphanus sativus var sativus*) recolectados fueron llevados al Laboratorio de Investigaciones Aplicadas, para preparar el extracto crudo enzimáticamente activo.

2.1.1. Extracto de raíz de rábano (*Raphanus sativus var sativus*)

Como primer paso las raíces fueron lavadas y secadas. Luego se cortaron y homogeneizaron, en licuadora, con fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4) 0.1 M, durante tres minutos, con intervalos de 30 segundos, a temperatura ambiente. El homogenizado obtenido se mantuvo a 4 °C durante 24 horas. Se filtró el preparado refrigerado con gasa, para eliminar los residuos vegetales. La parte líquida se centrifugó a 4000 rpm en una centrifuga refrigerada, marca Eppendorf modelo 5810R, durante 20 minutos, a 4 °C. El sobrenadante se lo mantuvo en refrigeración a 4 °C. En la Figura 2.1 se muestra el balance de masa del proceso de obtención del extracto de raíz de rábano.

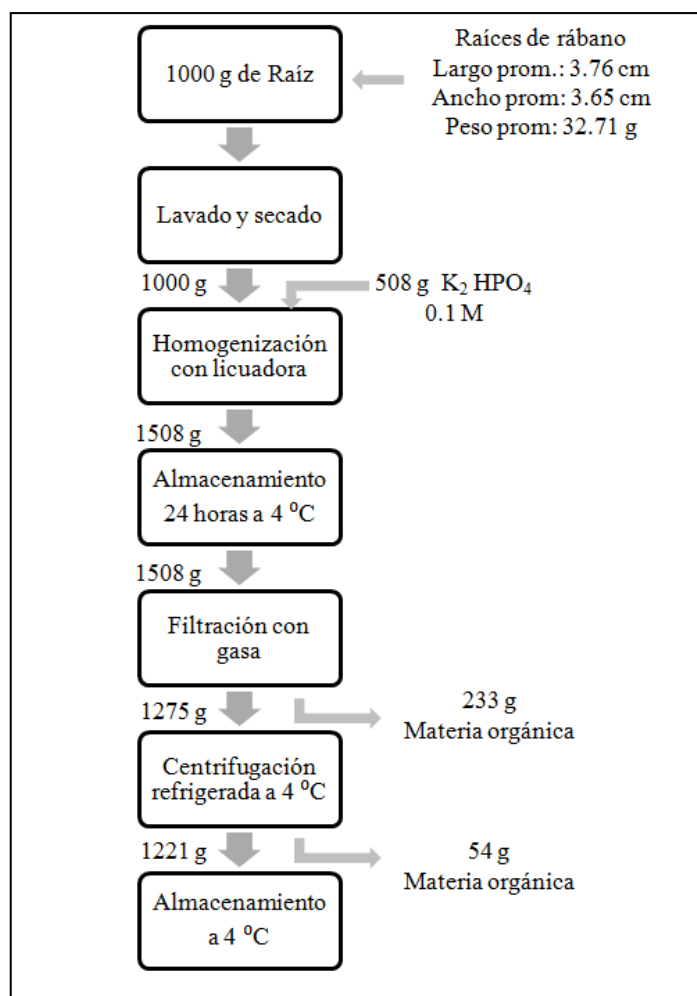


Figura 2.1 Balance de masa del proceso de obtención del extracto de raíz de *Raphanus sativus var sativus*.

El extracto fue decolorado con carbón activado en polvo, se evaluaron 2 cantidades de carbón 0,5 y 0,2 g. El pH fue otro parámetro evaluado, se decoloró el extracto a su pH original (5,67) y a un pH de 7.3, con una cantidad de 0,2 g de carbón activado en polvo, en los dos casos. En todos los ensayos se usó 50 mL de extracto crudo de raíz de rábano. El proceso de decoloración del extracto sin variar el pH y con 0,5 g de carbón se detalla en la Figura 2.2. En el Anexo B se presentan los balances de masa del proceso de decoloración con 0,2 g de carbón a pH 5,67 y con 0,2 g de carbón a pH 7.3.

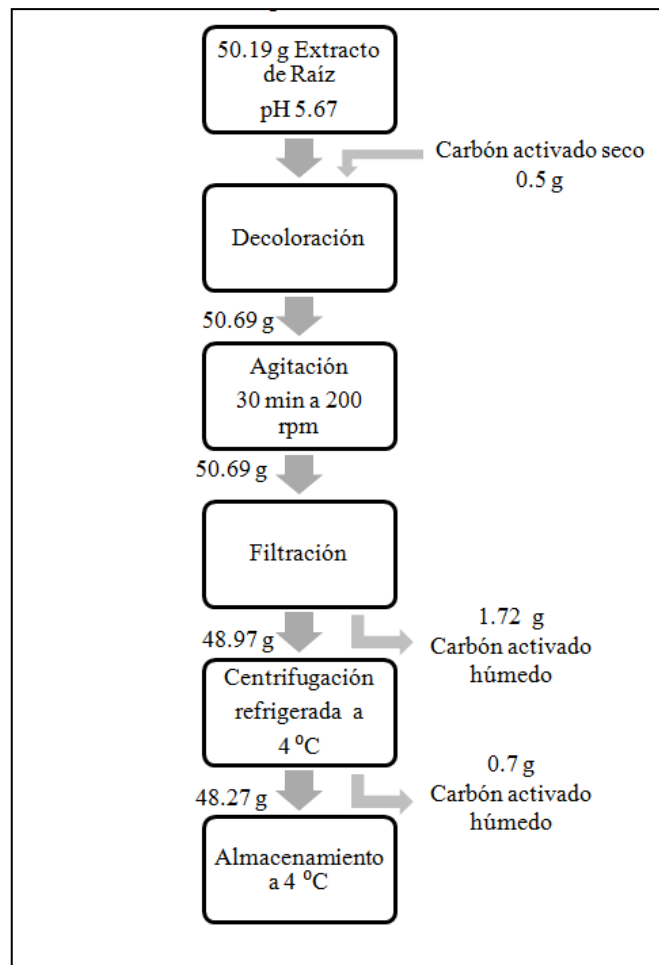


Figura 2.2 Balance de masa del proceso de decoloración del extracto de raíz de *Raphanus sativus var sativus*, a pH 5.67 y con 0,5 g de carbón activado en polvo.

2.1.2. Extracto de hojas de rábano (*Raphanus sativus var sativus*)

Las hojas fueron lavadas y secadas; se homogeneizaron en licuadora con solución 0.1 M de fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4). El preparado obtenido se mantuvo en refrigeración durante 24 horas. El preparado refrigerado se filtró con gasa; la parte líquida se centrifugó en una centrifuga refrigerada, marca Eppendorf modelo 5810R, a 4000 rpm, durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se almacenó en refrigeración a 4 °C. En la Figura 2.3 se presenta el balance de masa del proceso para la obtención del extracto de hojas de rábano.

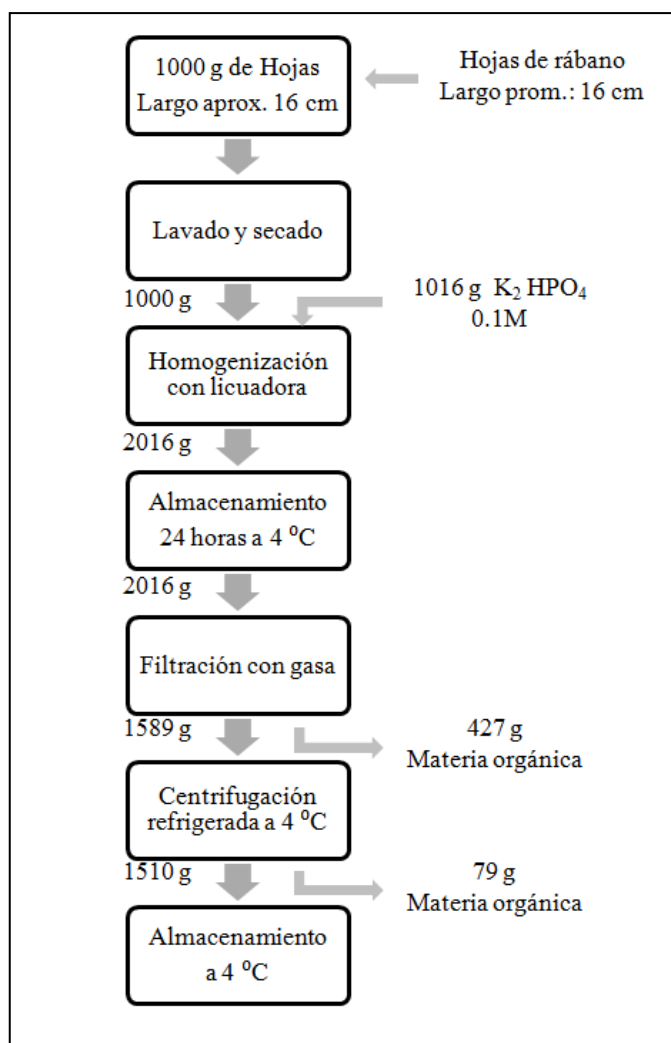


Figura 2.3 Balance de masa del proceso de obtención del extracto de hoja de *Raphanus sativus var sativus*.

El extracto de hoja al igual que el extracto de raíz de rábano fue decolorado con carbón activado en polvo, se realizaron ensayos de decoloración con: 5 g de carbón activado a un pH del extracto de 6,43 y, con 0,2 g de carbón se realizaron decoloraciones al pH original del extracto de 6,43 y a pH 7,3. El volumen inicial del extracto de hoja de rábano para todos los ensayos fue de 50 mL. El proceso de decoloración del extracto sin variar el pH y con 5 g de carbón se presenta en la Figura 2.4. En el Anexo C se muestran los balances de masa del proceso de decoloración con 0,2 g de carbón a pH 6,43 y con 0,2 g de carbón a pH 7.3.

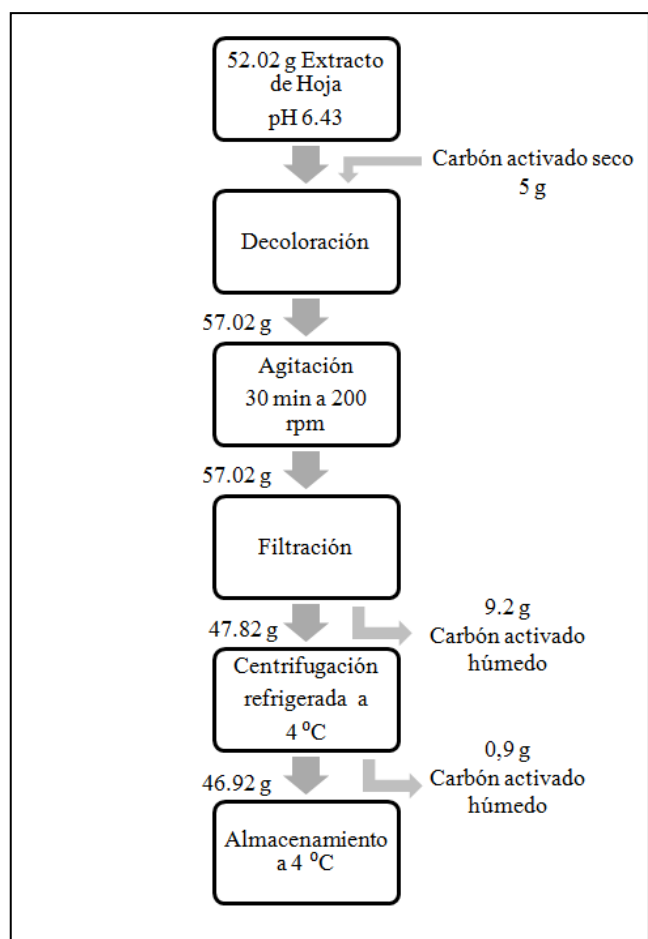


Figura 2.4 Balance de masa del proceso de decoloración del extracto de hoja de *Raphanus sativus var sativus*, a pH 6,43 con 5 g de carbón activado en polvo.

2.2. Ensayo para la determinación de la actividad peroxidásica

Se empleó el método descrito por Pascual *et al.*, (1983) citado por Marquéz (1997) que utiliza como sustratos guayacol y peróxido de hidrógeno. Las condiciones del ensayo fueron: 1.0 mL Tris-(HCl) 0.01 mol.L⁻¹, pH 7.0; 0.75 mL de guayacol 100 mmol.L⁻¹; 0.02 mL de H₂O₂ 30 mmol.L⁻¹; 0.1 mL de solución de enzima HRP; a temperatura ambiente.

Las lecturas de absorbancia se realizaron en espectrofotómetro UV-VIS, marca SHIMADZU modelo UV-240, a 470 nm, en cubetas de 1 cm de paso de luz cada 5 segundos durante 1 minuto a temperatura ambiente.

2.2.1. Cálculo de la actividad peroxidásica

Se aplicó la siguiente fórmula:

$$AE = \frac{\Delta DO_{470nm}}{\Delta t} \times \frac{1}{k} \times \frac{1}{d} \times \frac{1}{Ve} \times Vc \times dil$$

Donde :

AE : actividad enzimática expresada en UI ($\mu\text{moles.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$)

Ve : volumen de enzima (mL)

Vc : volumen de cubeta (mL)

dil: dilución

d: espesor de la cubeta (1 cm)

k : coeficiente de extinción μmolar del tetraguayacol oxidado a λ 470 nm, es igual a ($5570.10^{-6} \text{ L.}\mu\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

2.3. Ensayo para la determinación de la concentración de proteína

La determinación de la concentración de proteínas se realizó midiendo la absorbancia de los extractos a 280 nm, se utilizó un coeficiente de extinción arbitrario igual a la unidad (Scopes, 1987 citado por Márquez, 1997). Cuando las lecturas de la absorbancia sobrepasaron el valor de 1.000, se realizaron diluciones de los extractos.

Para el cálculo de la concentración de proteína se emplea la siguiente fórmula:

$$[P] = DO_{280} \times \frac{F}{L \times E}$$

Donde:

[P] = concentración de proteína

DO_{280} = absorbancia medida a 280 nm

F = factor de dilución

L = longitud de la celda

E = Coeficiente de extinción (1)

2.4. Ensayo para la purificación de baja resolución de las enzimas peroxidásicas activas de rábano

Se seleccionó el extracto con mayor actividad peroxidásica para continuar con la purificación de la enzima.

Para la purificación de las peroxidases de *Raphanus sativus var sativus* con sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), se añadió la cantidad de sal necesaria para alcanzar en el extracto el 90% de saturación, de acuerdo a la tabla de saturación del sulfato de amonio (ver Anexo D). Se agregó lentamente la sal sobre el extracto, con agitación continua (en un período de 15 minutos). La mezcla se mantuvo en reposo y refrigeración a 4°C durante 24 horas (ver Figura 2.5); luego se centrifugó a 4000 rpm, durante 30 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió y dializó en agua destilada hasta eliminar el exceso de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.



Figura 2.5 Precipitación de la enzima con sulfato de amonio al 90%.

Para comprobar que se ha eliminado todo el sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se usó cloruro de bario (BaCl_2), el mismo que forma un precipitado blanco (sulfato de bario) cuando reacciona con el sulfato. En la Figura 2.6 se detalla en proceso de purificación de las peroxidases de rábano.

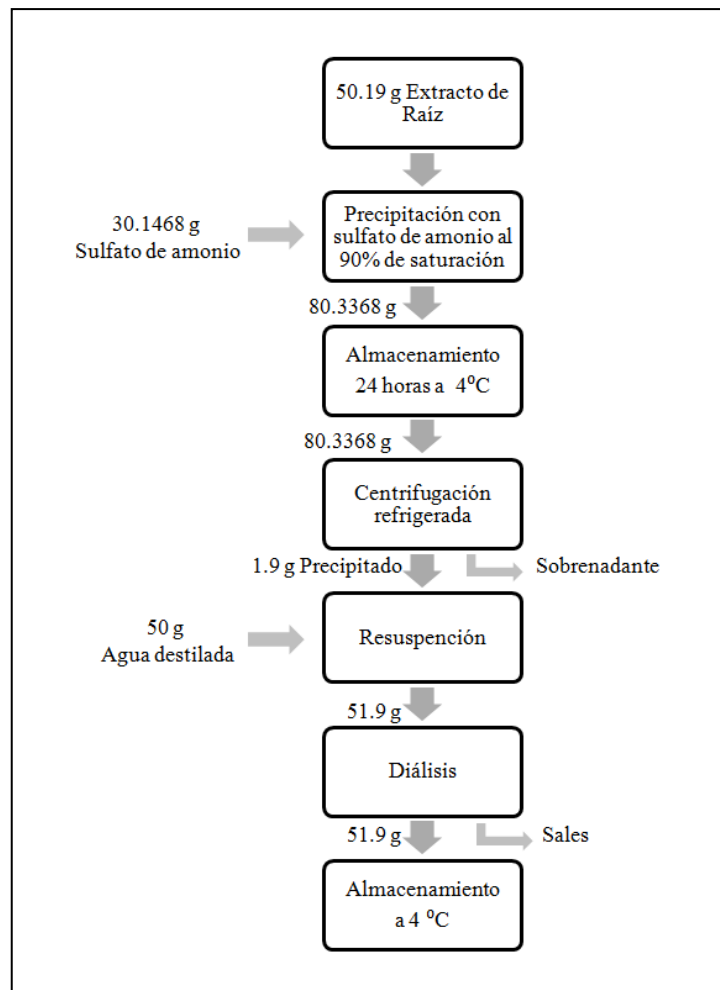


Figura 2.6 Balance de masa del proceso de purificación de baja resolución de las peroxidasas presentes en el extracto crudo de raíz de *Raphanus sativus var sativus*.

Finalmente se midió la actividad enzimática y la concentración de la proteína de la enzima purificada, para lo que se procedió como en 2.2. y 2.3. respectivamente.

2.5. Eliminación enzimática de fenoles en soluciones preparadas en el laboratorio

2.5.1. Determinación de la cinética de la enzima

La peroxidasa presenta reacciones bisustrato por lo que en esta investigación se evalúan dos sustratos: fenol y peróxido de hidrógeno. El método desarrollado se basó en Villalobos y Buchanan (2002), Stanisavljević y Nedić (2004), y Pramparo 2008.

Se preparó soluciones madre de fenol 100 mM y de peróxido de hidrógeno 100 mM. Para determinar la cinética de la enzima se analizaron concentraciones de fenol de 0,5; 1; 2; 3 y 4 mM, preparadas de la solución madre de fenol. Las concentraciones de peróxido evaluadas fueron de 0,5; 1; 2; 5 y 10 mM, preparadas a partir de la solución madre.

En una celda de cuarzo se mezclaron 955 μL de Buffer fosfato de sodio 0,5 M pH 7.4; 1000 μL de solución de fenol; 20 μL de solución de 4-aminoantipirina 12.5 mM; 25 μL de solución de peróxido y, 50 μL de extracto de enzima purificada (270, 82 U de peroxidasa de *Raphanus sativus var sativus*).

Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente y la absorbancia se midió a una longitud de onda de 510 nm, cada 15 segundos durante 3 minutos.

La actividad enzimática se calculó como en 2.2.1., el coeficiente de extinción del fenol empleado fue de $6 \text{ L} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Cada ensayo se repitió 5 veces.

2.5.1.1. Cálculo de los parámetros cinéticos (velocidad máxima y constantes de afinidad)

En condiciones óptimas de medida, previamente establecidas, para cada uno de los sustratos, a temperatura ambiente, pH 7,4 y concentración enzimática constante, se fijó la concentración de un sustrato y se modificó la del otro (ligando variable) y, se observó que el perfil velocidad de reacción inicial *versus* concentración del sustrato variable se ajuste a una cinética *michaeliana*. Para determinar la velocidad máxima y los coeficientes de afinidad se siguió el mecanismo enzimático bisustrato ordenado presentado por Chávez *et al.* (1990); se empleó las ecuaciones de dobles recíprocos en función de cada sustrato como ligando variable a concentraciones fijas del otro sustrato; las representaciones gráficas de estas ecuaciones se presentan en las Figuras 2.7 y 2.8.

La ecuación general del modelo cinético bisustrato ordenado es:

$$\frac{V_o}{V_{m\acute{a}x}} = \frac{[A][B]}{K_A K_B + K_B [A] + [A][B]}$$

Reordenando la ecuación de la velocidad para expresarla en función de A como ligando variable:

$$\frac{V_o}{V_{m\acute{a}x}} = \frac{[A]}{K_A \left(\frac{K_B}{[B]}\right) + [A] \left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right)}$$

La ecuación de dobles recíprocos para [A] como ligando variable a diferentes concentraciones fijas de [B] es:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_A}{V_{m\acute{a}x}} \left(\frac{K_B}{[B]}\right) \frac{1}{[A]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right)$$

Donde:

V_o = velocidad inicial expresada en mM.min⁻¹

$V_{m\acute{a}x}$ = velocidad máxima expresada en mM.min⁻¹

K_A = constante de afinidad del sustrato A

K_B = constante de afinidad del sustrato B

[A] = concentración del sustrato A

[B] = concentración del sustrato B

En la Figura 2.7 las rectas se intersectan a $1/[A] = -1/K_A$ y $1/V_o = 1/V_{m\acute{a}x}$. A medida que la [B] aumenta, las rectas se mueven en sentido horario a partir del punto de intersección. Cuando la [B] es infinitamente grande, la pendiente de recta es cero y el intercepto sobre el eje $1/V_o$ da el valor de $1/V_{m\acute{a}x}$. La variación de velocidad máxima aparente ($V_{m\acute{a}x\ ap}$) y de la constante de afinidad de [A] aparente ($K_{A\ ap}$) con [B] variable está dada por:

$$\frac{1}{V_{m\acute{a}x\ ap}} = \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right)$$

$$\frac{1}{K_{A\ ap}} = -\frac{1}{K_A} \left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right)$$

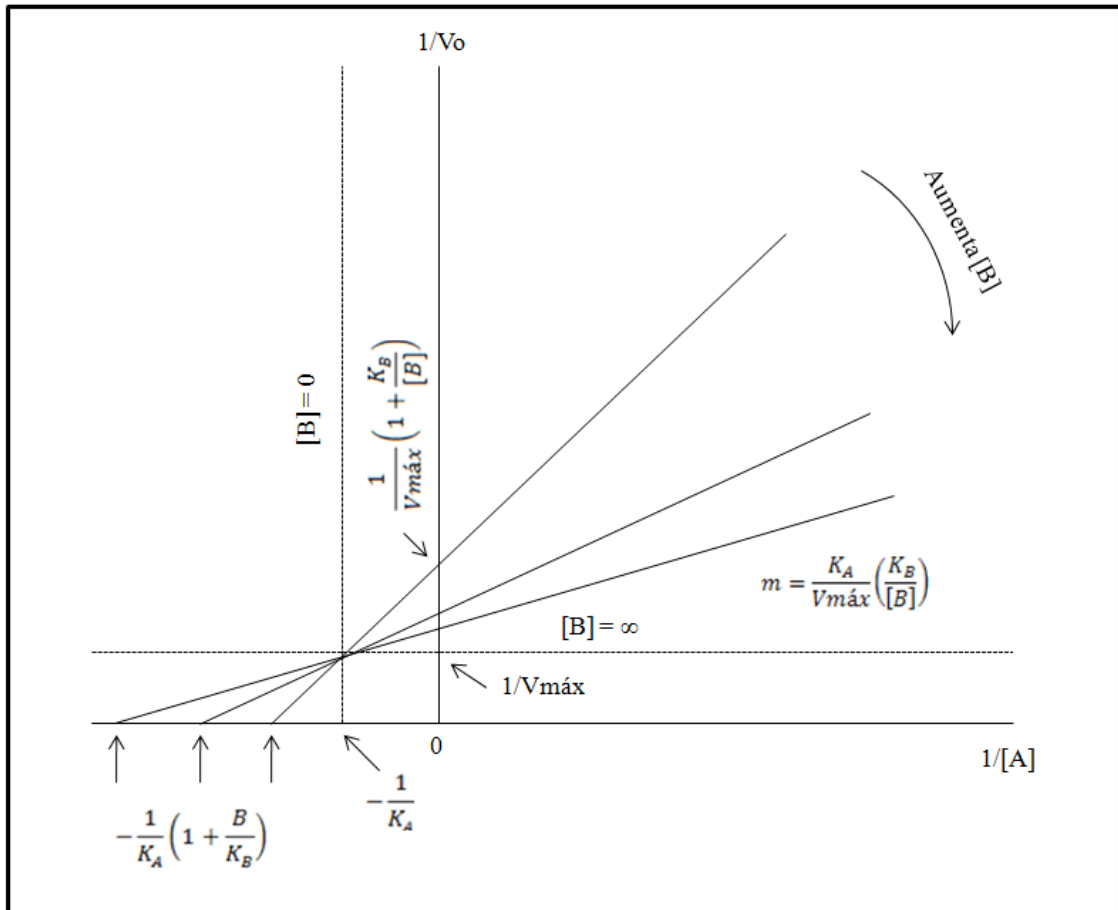


Figura 2.7 Representación gráfica de $1/V_o$ en función de $1/[A]$ a diferentes concentraciones fijas de B , para un mecanismo bisustrato ordenado (Chávez *et al.*, 1990).

Para determinar los valores de $V_{máx}$ y K_A se emplearon dos gráficas secundarias:

1. La representación gráfica de $1/V_{máx}$ ap en función de $1/[B]$, ésta es lineal con una pendiente de $K_B/V_{máx}$ y un intercepto en el eje de $1/V_{máx}$ ap, de $1/V_{máx}$. El intercepto en el eje $1/[B]$ da el valor de $-1/K_B$ (Figura 2.8 a).
2. La representación gráfica de $1/K_A$ ap en función de $[B]$, ésta función es lineal con una pendiente de $1/K_A K_B$ y un intercepto en el eje de $1/K_A$ ap (es decir, cuando $[B] = 0$, K_A ap = K_A). Cuando $1/K_A$ ap = 0, el intercepto en el eje de $[B]$ es igual a $-K_B$ (Figura 2.8 b).

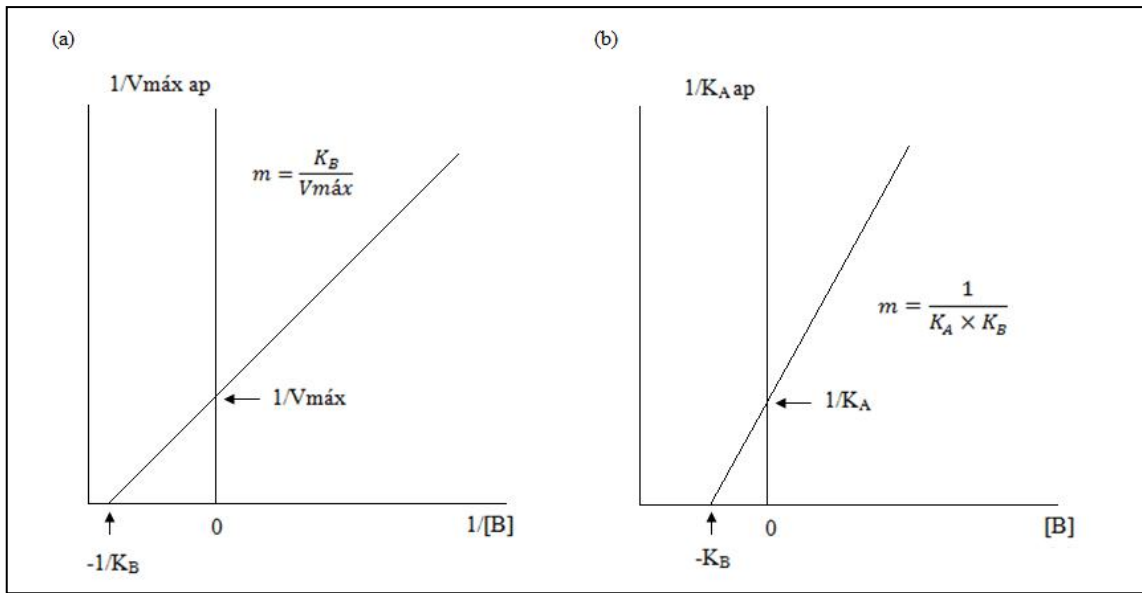


Figura 2.8 Representaciones gráficas secundarias obtenidas a partir de los gráficos primarios de $1/V_o$ en función de $1/[A]$, a diferentes concentraciones fijas de B, en un mecanismo cinético bisustrato ordenado.

- a) Trazado secundario de $1/V_{m\acute{a}x}$ (interceptos en el eje $1/V_o$ en los gráficos primarios), en función de $1/[B]$. b) Trazado secundario de $1/K_A$ ap en función de $[B]$ (Chávez *et al.*, 1990).

Reordenando la ecuación general del mecanismo bisustrato ordenado, para expresarla en función de B como ligando variable:

$$\frac{V_o}{V_{m\acute{a}x}} = \frac{[B]}{K_B \left(1 + \frac{K_A}{[A]}\right) + [B]}$$

Para $[B]$ como ligando variable a diferentes concentraciones fijas de $[A]$ la ecuación de doubles recíprocos es:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_B}{V_{m\acute{a}x}} \left(1 + \frac{K_A}{[A]}\right) \frac{1}{[B]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

Donde:

V_o = velocidad inicial expresada en $\text{mM} \cdot \text{min}^{-1}$

$V_{m\acute{a}x}$ = velocidad máxima expresada en $\text{mM} \cdot \text{min}^{-1}$

K_A = constante de afinidad del sustrato A

K_B = constante de afinidad del sustrato B

[A] = concentración del sustrato A

[B] = concentración del sustrato B

En la Figura 2.9 todas las rectas, independientemente de la [A] (ligando fijo) se interceptan en el eje 1/Vo en un mismo valor de Vmáx, es decir que los valores de Vmáx no están limitados por la [A]. El intercepto en el eje 1/[B], cuando [A]=∞, es igual al valor de -1/K_B; la variación de la constante de afinidad aparente del sustrato B (K_B ap) con [A] está dada por:

$$\frac{1}{K_B \text{ ap}} = \frac{1}{K_B \left(1 + \frac{K_A}{[A]}\right)}$$

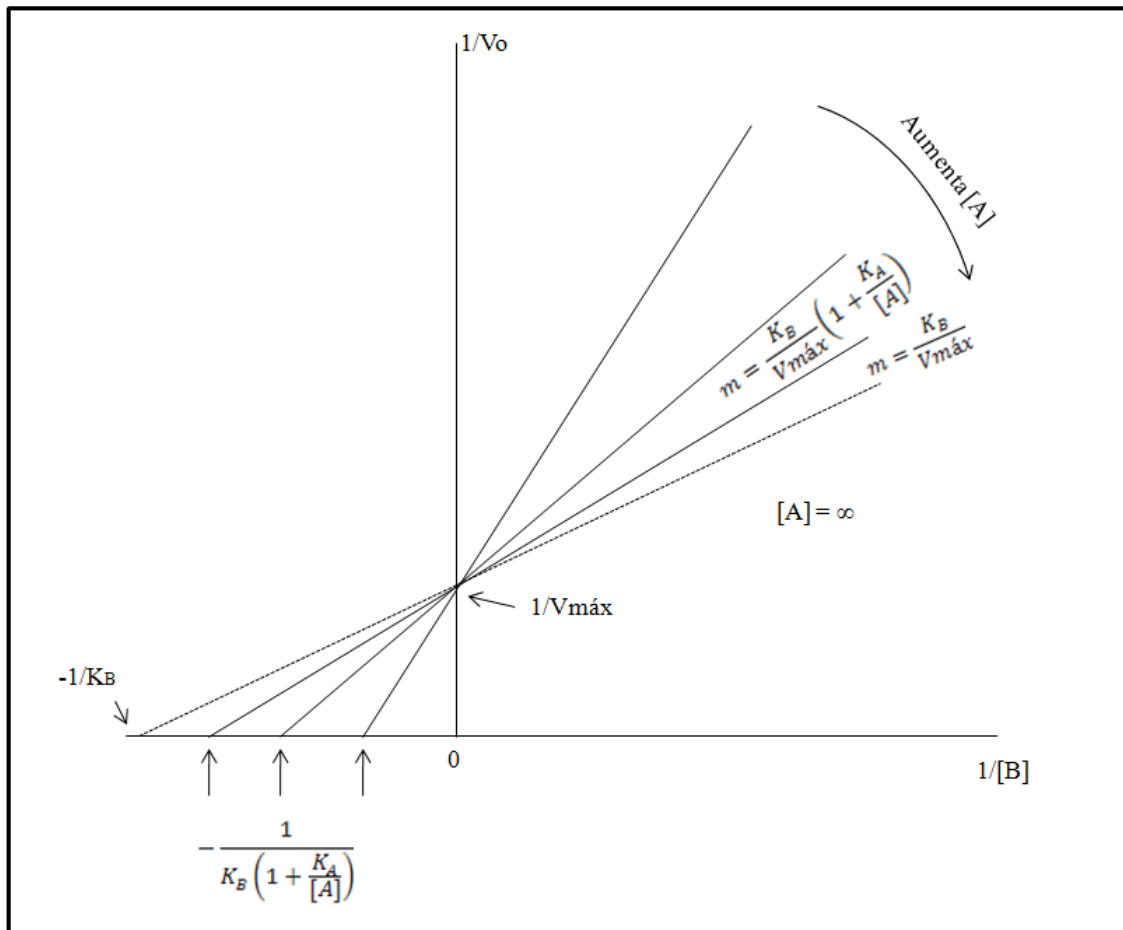


Figura 2.9 Representación gráfica de 1/Vo en función de 1/[B] a diferentes concentraciones fijas de A, para un mecanismo bisustrato ordenado (Chávez *et al.*, 1990).

Los valores de $V_{\text{máx}}$ y K_B se obtienen a partir las siguientes representaciones gráficas secundarias:

1. El gráfico de $K_B \text{ ap}$ en función de $1/[A]$, que es lineal, con una pendiente de $K_A K_B$ y un intercepto sobre el eje de $K_B \text{ ap}$, de K_B . El intercepto sobre el eje $1/[A]$ proporciona el valor de $-1/K_A$ (Figura 2.10 a).
2. El gráfico de la pendiente $1/[B]$ vs. $1/[A]$, que es lineal, con una pendiente igual a $K_B K_A / V_{\text{máx}}$ y un intercepto en el eje de la pendiente, de $K_B / V_{\text{máx}}$ (es decir, cuando $[A]$ es infinitamente grande $K_B \text{ ap} = K_B$ y la pendiente que es igual a $K_B \text{ ap} / V_{\text{máx}}$ a todos los valores de $[A]$ ahora se hace igual a $K_B / V_{\text{máx}}$). Cuando la pendiente $1/[B] = 0$, el intercepto en el eje de $1/[A]$ da el valor de $-1/K_A$ (Figura 2.10 b).

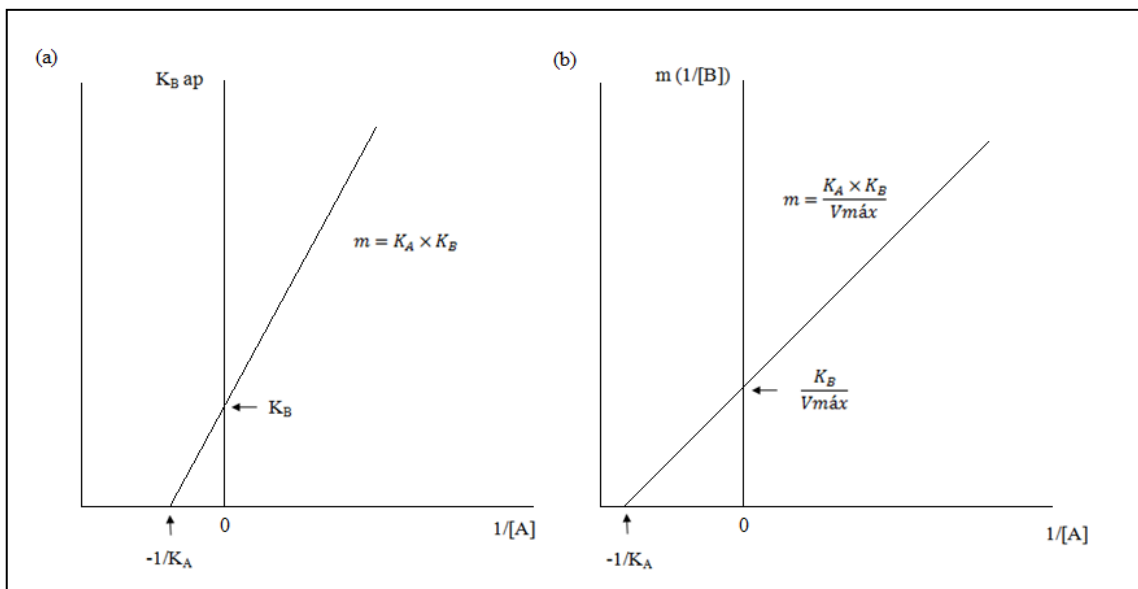


Figura 2.10 Representaciones gráficas secundarias obtenidas a partir de los gráficos primarios de $1/V_0$ en función de $1/[B]$, a diferentes concentraciones fijas de A, en un mecanismo cinético bisustrato ordenado.

a) Trazado secundario de $K_B \text{ ap}$ en función de $1/[A]$. b) Trazado secundario de las pendientes $1/[B]$ en función de $1/[A]$ (Chávez *et al.*, 1990).

Los cálculos para determinar los parámetros cinéticos se realizaron en MS Excel 2007, principalmente se usaron las funciones pendiente e intersección con el eje Y.

2.5.2. Determinación del porcentaje de remoción del fenol

Al igual que en el estudio de la cinética de la enzima, en los ensayos para determinar el porcentaje de remoción se analizaron 5 concentraciones de fenol (0,5; 1; 2; 3 y 4 mM) y 5 concentraciones de peróxido de hidrógeno (0,5; 1; 2; 5 y 10 mM). De acuerdo al diseño experimental establecido, el cual fue un diseño factorial 5x5, se realizaron 8 repeticiones de cada ensayo, con lo que se obtuvo un total de 200 pruebas que fueron ejecutadas de forma aleatoria.

Para las pruebas de remoción se colocó en un tubo de ensayo 1400 μL de Buffer fosfato de sodio pH 7,4; 1465 μL de solución de fenol; 37,5 μL de H_2O_2 ; y 73,5 μL de enzima purificada (398,105 U de peroxidasa de *Raphanus sativus var sativus*). La mezcla se homogenizó en un vortex y se dejó en reposo 24 horas; luego se paró la reacción con ácido tricloroacético (TCA) y se procedió a filtrar las muestras con papel filtro NM46d.

En las muestras filtradas se cuantificó la concentración de fenol para determinar el porcentaje de fenol removido (ver numeral 2.6.).

2.6. Determinación de la concentración de fenoles

Los fenoles se determinaron con el método fotométrico directo, descrito por APHA AWA WPCP (1989).

El método consiste en preparar una solución madre de fenol de 500 mg.L^{-1} ; de la cual se prepararon soluciones estándares de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1; 2; 3; 4 y 5 mg.L^{-1} , para la elaboración de la curva de calibración. Como blanco se usó agua destilada. Se empleó un volumen de 5 mL para la cuantificación de fenoles.

La muestra, el blanco y los patrones se trataron de la siguiente manera: se añadió 125 μL de solución de hidróxido de amonio (NH_4OH) 0.5 N y se ajustó el pH a 7.9 ± 0.1 con tampón fosfato (aproximadamente con un volumen de 240 a 260 μL). Para preparar el tampón fosfato se disolvió 10.45 g de fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4)

y 7.23 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) en agua destilada y se aforó hasta 100 mL, el pH debe ser 6.8.

Luego de ajustar el pH a 7.9 se añadió 50 μL de solución 4-aminoantipirina, se mezcló bien, y se añadió 50 μL de solución ferricianuro de potasio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) con agitación continua. Después de 15 minutos se midió la absorbancia de la muestra y los patrones frente al blanco a 500 nm.

Se elaboraron 10 curvas de calibración para calcular los valores promedio de las pendientes y de las intersecciones en el eje Y. Con dichos valores se definió la ecuación para calcular la concentración de fenol.

2.7. Tratamiento enzimático de fenoles en efluentes de una empresa textilera

Las muestras de agua se recolectaron en la Empresa TEXTIL ECUADOR S.A., ubicada en la Av. Pérez Echanique S/N Amaguaña-Ecuador. El muestreo del agua de la textilera se realizó durante 2 horas y se tomaron muestras en frascos ámbar de 1000 mL cada 30 minutos. Las 4 muestras tomadas fueron llevadas al LIA, en donde se mezclaron y homogenizaron. Para conservar las muestras se añadió ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado hasta alcanzar un pH aproximado de 2, las muestras se almacenaron a una temperatura de 4 °C.

2.7.1. Destilación del agua de la textilera

Se midió 500 mL de muestra de agua en un vaso de precipitación, se ajustó el pH a 4 con hidróxido de sodio (NaOH) 2,5 N. Además se preparó 500 mL de una solución estándar de fenol de 3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de concentración y 500 mL de una solución de agua de la textilera fortificada con fenol.

Para la destilación se pusieron 300 mL de cada muestra en balones de 500 mL con núcleos de ebullición y se procedió a destilar las muestras en el equipo armado con anterioridad (Figura 2.11).

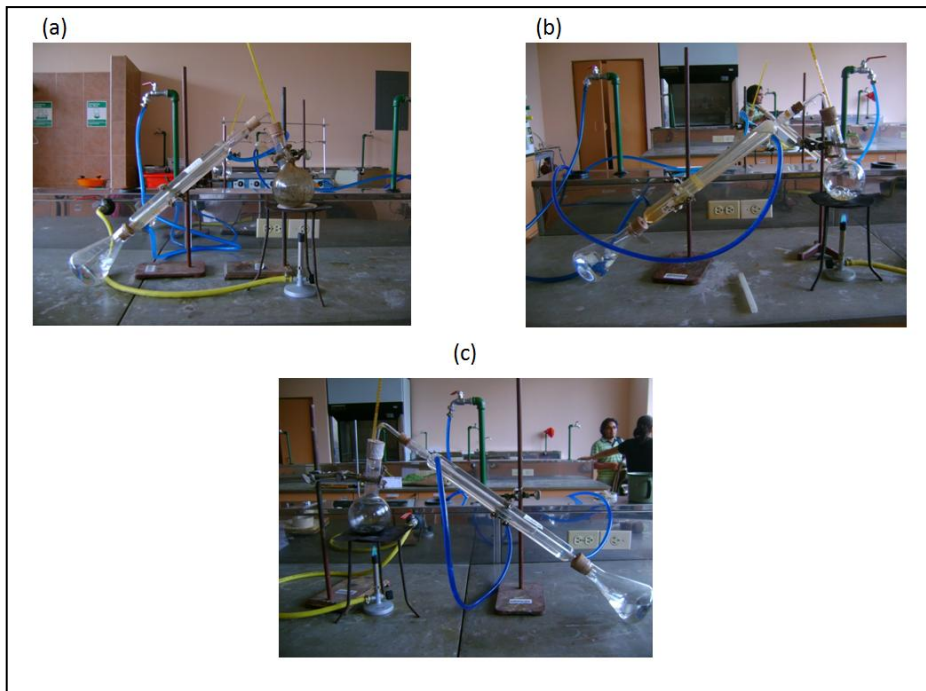


Figura 2.11 Destilación (a) Muestra de agua de una textilera fortificada con fenol para alcanzar una concentración de 3 mg.L^{-1} ; (b) Muestra de agua residual de una textilera y, (c) Muestra de una solución de fenol cuya concentración es 3 mg.L^{-1} .

2.7.2. Cuantificación de fenoles en el agua de la textilera

La cuantificación de fenoles en el agua de la textilera se realizó como en 2.6.

2.7.3. Remoción de fenoles en el agua de la textilera

La remoción de fenoles en el agua de la textilera se llevó a cabo como en 2.5.2.

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1. Obtención del extracto crudo

La actividad enzimática fue determinada en el extracto de hoja de rábano y en el extracto de raíz de rábano, con el fin de seleccionar el extracto que presente la mayor actividad peroxidásica. En la Tabla 3.1 se muestran los resultados de actividad enzimática, concentración de proteína y actividad específica de los extractos; el extracto de raíz de rábano presenta una actividad enzimática (AE) de 5727,504 U.mL⁻¹ y una actividad específica de 126,435 U.mg⁻¹, mientras que el extracto de hoja tiene una AE de 805,745 U.mL⁻¹ y una actividad específica de 4,778 U.mg⁻¹. En cuanto a la [P] el extracto de hoja posee 168,640 mg.mL⁻¹ y el extracto de raíz posee 45,3 mg de proteína por mL de extracto.

Tabla 3.1 Valores de actividad enzimática, concentración de proteína y actividad específica de los extractos de rábano (*Raphanus sativus var sativus*)

Extracto	AE (U.mL⁻¹)	[P] (mg.mL⁻¹)	Act. Esp. (U.mg⁻¹)
De raíz	5727,504	45,300	126,435
De hoja	805,745	168,640	4,778

En la figura 3.1 se puede apreciar que es extracto de raíz presenta mayor actividad enzimática y actividad específica en comparación con el extracto de hoja de rábano. El extracto de raíz posee aproximadamente 85,93% y 96,22% más AE y actividad específica, respectivamente, que el extracto de hoja de *Raphanus sativus var sativus*.

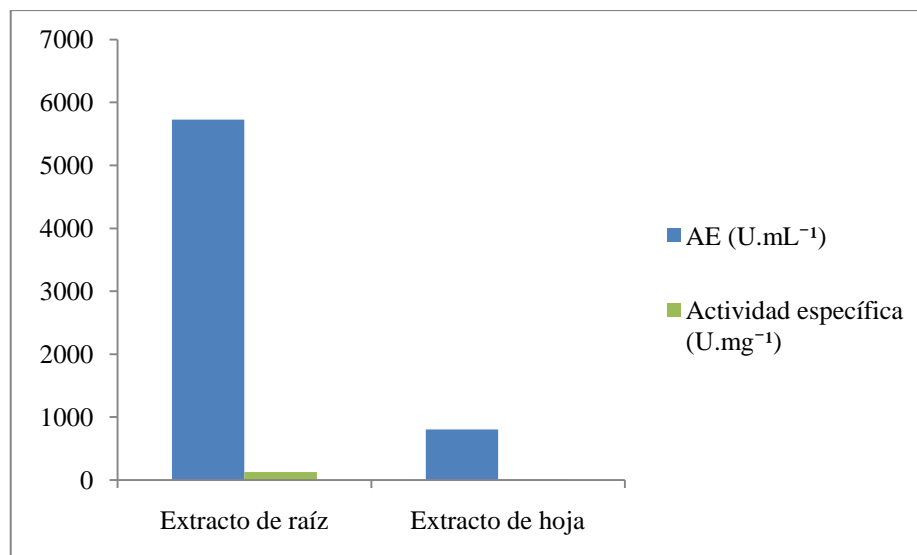


Figura 3.1 Comparación de la actividad enzimática y la actividad específica de los extractos de *Raphanus sativus var sativus* (raíz y hoja).

También se analizaron los extractos antes y después del proceso de decoloración para evaluar la incidencia del carbón activado sobre la actividad de las enzimas. La decoloración disminuye notablemente la AE, en el extracto de raíz se pierde 49,24% de AE y en el extracto de hoja se pierde el 100% (ver Tabla 3.2). La concentración de proteína disminuye en los extractos decolorados: 70,02% en el de raíz y 90,88% en el de hoja. La actividad específica aumenta de 126,435 U.mg⁻¹ a 214,094 U.mg⁻¹ en el extracto de raíz; en el extracto de hoja disminuye a 0.

Tabla 3.2 Valores de actividad enzimática, concentración de proteína y actividad específica de: los extractos de raíz sin decolorar y decolorado con 0,5 g de carbón a pH 5,67 y, extractos de hoja, sin decolorar y decolorado con 5 g de carbón a pH 6,43.

Extracto	AE (U.mL ⁻¹)	[P] (mg.mL ⁻¹)	Act. Esp. (U.mg ⁻¹)
De raíz	5727,504	45,300	126,435
De raíz decolorado	2907,397	13,580	214,094
De hoja	805,745	168,640	4,778
De hoja decolorado	0	15,380	0

En la Figura 3.2 se representa gráficamente la AE, [P] y Actividad específica de los extractos de rábano sin decolorar y decolorados. De forma clara se aprecia la pérdida significativa de AE los extractos decolorados de raíz y hoja.

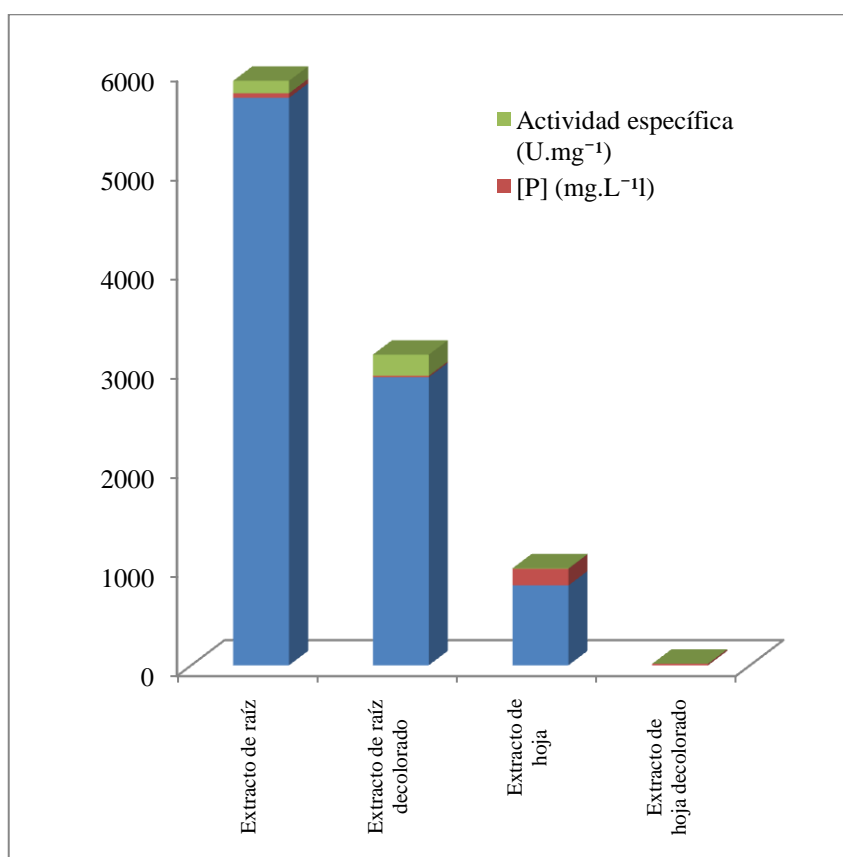


Figura 3.2 Actividad enzimática, concentración de proteína y actividad específica de: los extractos de raíz sin decolorar y decolorado con 0,5 g de carbón a pH 5,67 y, extractos de hoja, sin decolorar y decolorado con 5g de carbón a pH 6,43.

El pH y la cantidad de carbón son factores que fueron evaluados en la decoloración de los extractos, en el extracto de raíz decolorado con 0,5 g de carbón activado se perdió el 49,24% de actividad y con 0,2 g la disminución fue de 43,14%; la proteína disminuyó 70,02 y 79,74%, con 0,5 y 0,2 g respectivamente (ver Tabla 3.3). La actividad específica aumentó tanto en los extractos decolorados con 0,5 y 0,2 g de carbón activado. En la Tabla 3.4 se muestran los valores de AE, [P] y actividad específica de la decoloración del extracto de raíz de rábano, variando el pH del extracto, al decolorar los extractos con 0,2 g de carbón activado a pH 5,67 la actividad enzimática disminuye 43,14% y a pH 7,3 la pérdida de AE equivale al 66,07%.

Tabla 3.3 Valores de actividad enzimática, concentración de proteína y actividad específica de los extractos de raíz de *Raphanus sativus var sativus* sin decolorar y decolorado con 0,5 y 0,2 g de carbón a pH 5,67.

Extracto	AE (U.mL ⁻¹)		[P] (mg.mL ⁻¹)		Act Esp (U.mg ⁻¹)	
	Carbón (0,5 g)	Carbón (0,2 g)	Carbón (0,5 g)	Carbón (0,2g)	Carbón (0,5 g)	Carbón (0,2 g)
De raíz	5727,504	5727,504	45,300	45,300	126,435	126,435
De raíz decolorado	2907,397	3256,553	13,580	9,180	214,094	354,744

Tabla 3.4 Valores de actividad enzimática, concentración de proteína y actividad específica de los extractos de raíz *Raphanus sativus var sativus* sin decolorar y decolorado con 0,2 g de carbón a pH 5,67 y 7.3.

Extracto	AE (U.mL ⁻¹)		[P] (mg.mL ⁻¹)		Act Esp (U.mg ⁻¹)	
	pH 5,67	pH 7,3	pH 5,67	pH 7,3	pH 5,67	pH 7,3
De raíz	5727,504	2632,101	45,300	21,160	126,435	124,390
De raíz decolorado	3256,553	893,034	9,180	8,600	354,744	242,672

En la Figura 3.3 están representados los valores de la AE de los extractos de raíz de *Raphanus sativus*: sin decolorar (pH original del extracto 5,67), decolorado con 0,5 g de carbón activado a pH 5,67, decolorado con 0,2 g de carbón pH 5,67, con pH 7,3 sin decolorar y, decolorado con 0,2 g de carbón pH 7,3. El extracto de raíz sin decolorar con pH 5,67 presenta la mayor AE en comparación con los otros extractos de raíz que han pasado por procesos de decoloración y cambio de pH.

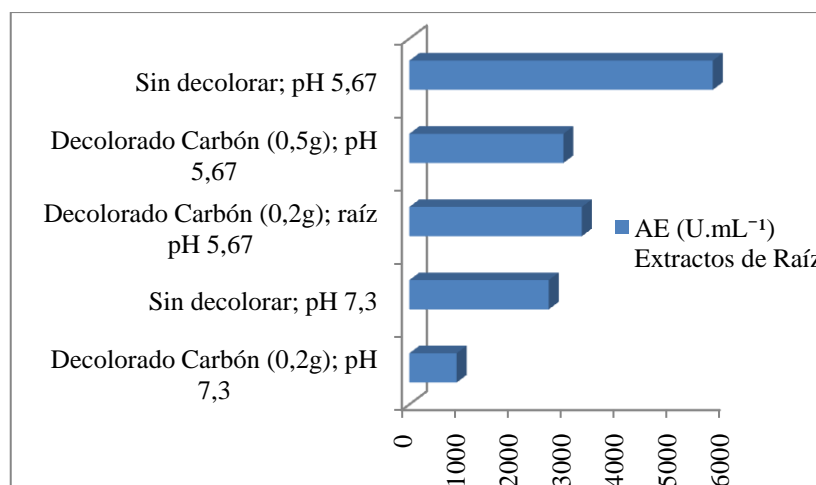


Figura 3.3 Actividad enzimática de los extractos de raíz de rábano sin decolorar y decolorados.

En el extracto de hoja se evaluaron cantidades de 5 y 0,2 g de carbón activado y se obtuvo una disminución del 100 y 7,08% respectivamente (ver Tabla 3.5).

Tabla 3.5 Valores de actividad enzimática, concentración de proteína y actividad específica de los extractos de hoja de *Raphanus sativus var sativus* sin decolorar y decolorado con 0,5 y 0,2 g de carbón a pH 6,43.

Extracto	AE (U.mL ⁻¹)		[P] (mg.mL ⁻¹)		Act Esp (U.mg ⁻¹)	
	Carbón (5 g)	Carbón (0,2 g)	Carbón (5 g)	Carbón (0,2 g)	Carbón (5 g)	Carbón (2 g)
De hoja	805,745	805,745	168,640	168,640	4,778	4,778
De hoja decolorado	0	748,671	15,380	44,380	0	16,870

Los resultados de la variación del pH para decolorar los extractos de hoja de *Raphanus sativus var sativus* se presentan en las Tablas 3.6, el extracto decolorado con 0,2 g de carbón activado a pH 6,43 disminuye 7,08% de AE y el extracto cuyo proceso de decoloración se realizó con 0,2 g de carbón a pH 7,3 perdió aproximadamente 82,60% de AE.

Tabla 3.6 Valores de actividad enzimática, concentración de proteína y actividad específica de los extractos de hoja de *Raphanus sativus var sativus* sin decolorar y decolorado con 0,2 g de carbón a pH 6,43 y 7.3.

Extracto	AE (U.mL ⁻¹)		[P] (mg.mL ⁻¹)		Act Esp (U.mg ⁻¹)	
	pH 6,43	pH 7,3	pH 6,43	pH 7,3	pH 6,43	pH 7,3
De hoja	805,745	567,379	168,640	97,240	4,778	5,835
De hoja decolorado	748,671	98,704	44,380	36,420	16,870	2,710

En la Figura 3.4 donde se representa la actividad enzimática de los extractos de hoja de *Raphanus sativus var sativus* sin decolorar y decolorados, se observa que el extracto de hoja sin decolorar es el que tiene el valor de AE más alto y, que a mayor cantidad de carbón mayor es la pérdida de AE en los extractos.

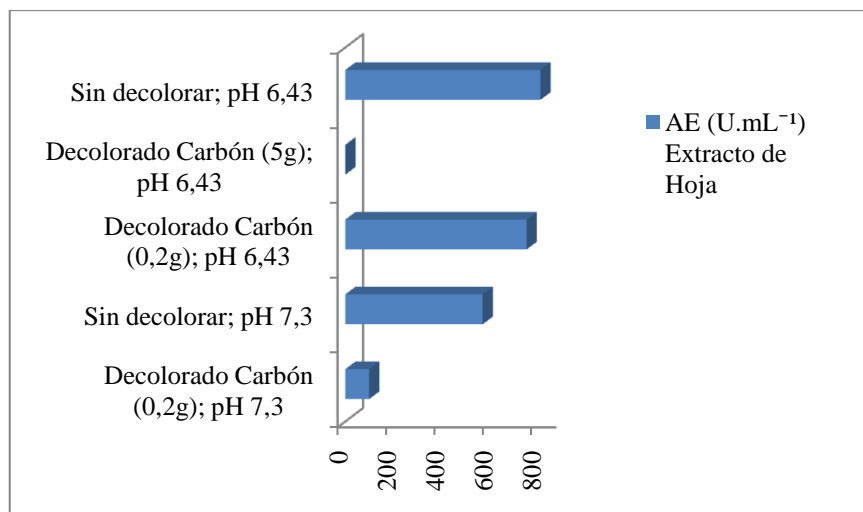


Figura 3.4 Actividad enzimática de los extractos de hoja de rábano sin decolorar y decolorados.

Al comparar la AE de todos los extractos de raíz y de hoja de rábano sin decolorar y decolorados se puede determinar que el extracto que tiene la más alta AE, es el extracto de raíz sin decolorar, con un valor de $5727,504 \text{ U.mL}^{-1}$ (Figura 3.5), por lo que es seleccionado para continuar con el proceso de purificación de la enzima con sulfato de amonio.

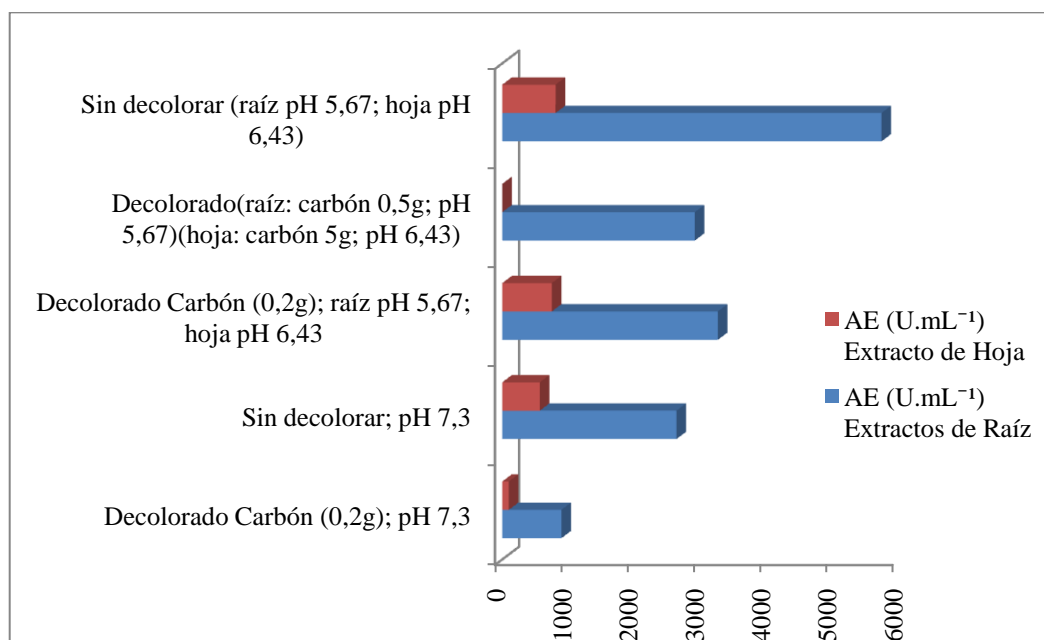


Figura 3.5 Comparación de la AE de los extractos de raíz y hoja de *Raphanus sativus var sativus* sin decolorar y decolorados.

En la Tabla 3.7 y Tabla 3.8 se muestra el análisis estadístico de los ensayos de medición de actividad enzimática de los extractos de raíz y hoja del *Raphanus sativus var sativus*. Para las 5 medidas de actividades enzimáticas obtenidas, se calculó el valor medio, la desviación estándar y los límites inferior y superior en los que la AE promedio posee una confiabilidad de 95%.

Tabla 3.7 Análisis estadístico de los ensayos de medición de la actividad enzimática en los diferentes extractos de raíz de rábano.

Medida estadística	Extracto				
	Raíz	Raíz decolorado Carbón 0,5 g; pH 5,67	Raíz decolorado Carbón 0,2 g; pH 5,67	Raíz pH 7,3	Raíz decolorado Carbón 0,2 g; pH 7,3
Media (U.mL ⁻¹)	5727,504	2907,397	3256,553	2632,101	893,034
Desviación estándar (U.mL ⁻¹)	367,464	69,618	277,864	112,856	65,445
Cuenta	5	5	5	5	5
Límite inferior (95%) (U.mL ⁻¹)	5271,238	2820,955	2911,540	2491,971	811,773
Límite superior (95%) (U.mL ⁻¹)	6183,771	2993,839	3601,566	2772,230	974,295

Tabla 3.8 Análisis estadístico de los ensayos de medición de actividad enzimática en los diferentes extractos de hoja de rábano.

Medida estadística	Extracto				
	Hoja	Hoja decolorado Carbón 5 g; pH 6,43	Hoja decolorado Carbón 0,2 g; pH 6,43	Hoja pH 7,3	Hoja decolorado Carbón 0,2 g; pH 7,3
Media (U.mL ⁻¹)	805,745	0	748,671	567,379	98,704
Desviación estándar (U.mL ⁻¹)	31,404	0	48,361	38,279	7,729
Cuenta	5	5	5	5	5
Límite inferior (95%) (U.mL ⁻¹)	766,751	0	688,623	519,849	89,107
Límite superior (95%) (U.mL ⁻¹)	844,739	0	808,720	614,908	108,301

El análisis estadístico de los ensayos para determinar la concentración de proteína se encuentra detallado en las Tablas 3.9 y 3.10. En las 5 medidas de concentración de proteína conseguidas para cada uno de los extractos, se determinó la media, la desviación estándar y el rango en el que los valores de [P] tienen un 95% de confiabilidad.

Tabla 3.9 Análisis estadístico de los ensayos de medición de proteína en los extractos de raíz de rábano.

Medida estadística	Extractos				
	Raíz	Raíz decolorado Carbón 0,5 g; pH 5,67	Raíz decolorado Carbón 0,2 g; pH 5,67	Raíz pH 7,3	Raíz decolorado Carbón 0,2 g; pH 7,3
Media (mg.mL ⁻¹)	45,300	13,580	9,180	21,160	8,600
Desviación estándar (mg.mL ⁻¹)	1,723	1,023	0,390	1,650	0,490
Cuenta	5	5	5	5	5
Límite inferior (95%) (mg.mL ⁻¹)	43,160	12,309	8,696	19,111	7,992
Límite superior (95%) (mg.mL ⁻¹)	47,440	14,851	9,664	23,209	9,208

Tabla 3.10 Análisis estadístico de los ensayos de medición de proteína en los extractos de hoja de rábano.

Medida estadística	Extractos				
	Hoja	Hoja decolorado Carbón 5 g; pH 6,43	Hoja decolorado Carbón 0,2 g; pH 6,43	Hoja pH 7,3	Hoja decolorado Carbón 0,2 g; pH 7,3
Media (mg.mL ⁻¹)	42,160	15,380	44,380	97,240	36,420
Desviación estándar (mg.mL ⁻¹)	1,282	0,396	0,444	4,160	1,055
Cuenta	5	5	5	5	5
Límite inferior (95%) (mg.mL ⁻¹)	40,568	14,888	43,829	92,074	35,111
Límite superior (95%) (mg.mL ⁻¹)	43,752	15,872	44,931	102,406	37,729

3.2. Purificación enzimática de baja resolución

Los datos obtenidos en la purificación se reflejan en la Tabla 3.11 se aprecia que la precipitación salina con sulfato de amonio disminuye la actividad enzimática en un 18,60%; la proteína disminuye 82,28% y la actividad enzimática aumenta de 111,863 U.mg⁻¹ a 513,895 U.mg⁻¹.

Tabla 3.11 Tabla de purificación de peroxidasa de *Raphanus sativus var sativus*.

Extracto	AE (U.mL ⁻¹)	[P] (mg.mL ⁻¹)	Act. Esp. (U.mg ⁻¹)	Rendimiento (%)	GP (veces)
Madre	5416,397	48,420	111,863	100	1,0
Purificado	4409,216	8,580	513,895	81,41	4,6

Con una saturación del extracto al 90% se obtuvo un aumento del grado de purificación de más de 4 veces respecto al inicial y, el rendimiento de las peroxidasas fue del 81,41%.

En la Tabla 3.12 se puntualizan los valores de la media, la desviación estándar y los límites superior e inferior con un intervalo de confianza del 95%, de las 5 medidas de actividad enzimática y concentración de proteína para las pruebas de purificación de peroxidasas de rábano.

Tabla 3.12 Análisis estadístico de los ensayos de medición de AE y [P] en el extracto madre y en el extracto purificado.

Medida estadística	Extracto madre		Extracto purificado	
	AE (U.mL ⁻¹)	[P] (mg.mL ⁻¹)	AE (U.mL ⁻¹)	[P] (mg.mL ⁻¹)
Media	5416,397	48,420	4409,216	8,580
Desviación estándar	135,682	0,923	158,658	0,829
Cuenta	5	5	5	5
Límite inferior (95%)	5079,343	47,274	4015,087	7,551
Límite superior (95%)	5753,451	49,566	4803,345	9,609

3.3. Eliminación enzimática de fenoles

En la eliminación enzimática se evaluaron diferentes concentraciones de sustrato primario y secundario, para establecer la opción que proporcione el mayor porcentaje de remoción de fenoles. Primero se determinó la cinética de la enzima con la aplicación de los principios cinéticos de Michaelis-Menten y de Lineweaver-Burk y, se calculó dos parámetros de suma importancia en el estudio de las reacciones catalizadas por enzimas: la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) a la que una enzima es capaz de trabajar y las constantes de afinidad (K_M) que nos expresan precisamente la relación de afinidad que tiene una enzima y sus sustratos.

Una vez propuestos los resultados de la cinética de las peroxidasas de *Raphanus sativus var sativus*, se presentan los porcentajes de remoción de fenol, que se analizaron con el programa estadístico SPSS, el que permitió elegir la concentración de peróxido de hidrógeno y fenol con mayor porcentaje de eliminación de fenoles.

3.3.1. Cinética de las peroxididasas de rábano (*Raphanus sativus var sativus*)

Para la cinética de la remoción enzimática del fenol se analizaron velocidades iniciales (V_0) variando las concentraciones de peróxido y fenol, en todos los casos se trabajó con 270,82 U de peroxididasas de *Raphanus sativus var sativus*, a temperatura ambiente y a pH de 7,4. En la Tabla 3.13 se resumen las velocidades iniciales promedio de acuerdo a las concentraciones iniciales de peróxido y fenol.

Tabla 3.13 Velocidades iniciales de las reacciones enzimáticas, se analizan diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno y fenol.

	V_0 (mM.min ⁻¹)				
	[H ₂ O ₂] (mM)				
[Fenol] (mM)	0,5	1	2	5	10
0,5	0,0333	0,0784	0,1089	0,1813	0,1786
1	0,0433	0,0925	0,1348	0,2127	0,2141
2	0,0528	0,1130	0,1631	0,2383	0,2355
3	0,0601	0,1326	0,1850	0,2711	0,2556
4	0,0633	0,1399	0,1913	0,3029	0,2811

El análisis estadístico de las 5 medidas de velocidad inicial obtenidas para cada concentración se detalla en el Anexo E. Ahí se define los valores de la media, la desviación estándar y los límites superior e inferior con un nivel de confianza del 95%, tanto para las 5 concentraciones de peróxido como para las 5 concentraciones de fenol.

En la Figura 3.6 se observa que, a una concentración fija de peróxido, a medida que aumenta la concentración de fenol aumenta la velocidad inicial de la reacción. La concentración de peróxido de hidrógeno 5 mM presenta las más altas velocidades iniciales; las velocidades empiezan a disminuir a una concentración de peróxido de 10 mM, demostrándose una posible inhibición por exceso de peróxido de hidrógeno, para comprobar si existe inhibición se evaluó la concentración de peróxido de 100 mM. Como se ve en la Figura 3.7 a concentración de peróxido 100 mM la velocidad inicial disminuye notablemente confirmando la inhibición por exceso de sustrato.

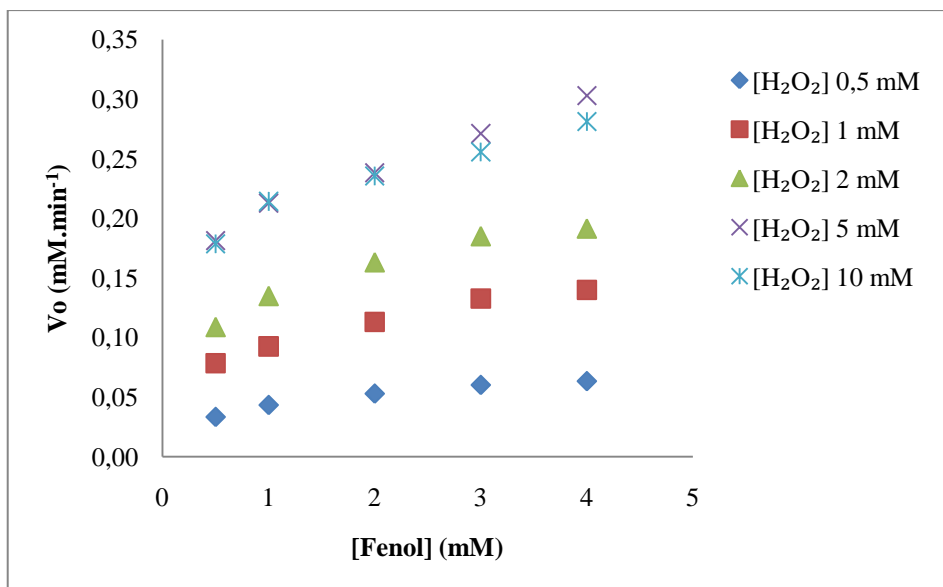


Figura 3.6 Comparación de las velocidades iniciales en función de la concentración de fenol a diferentes concentraciones fijas de peróxido de hidrógeno. Modelo Michaelis-Menten.

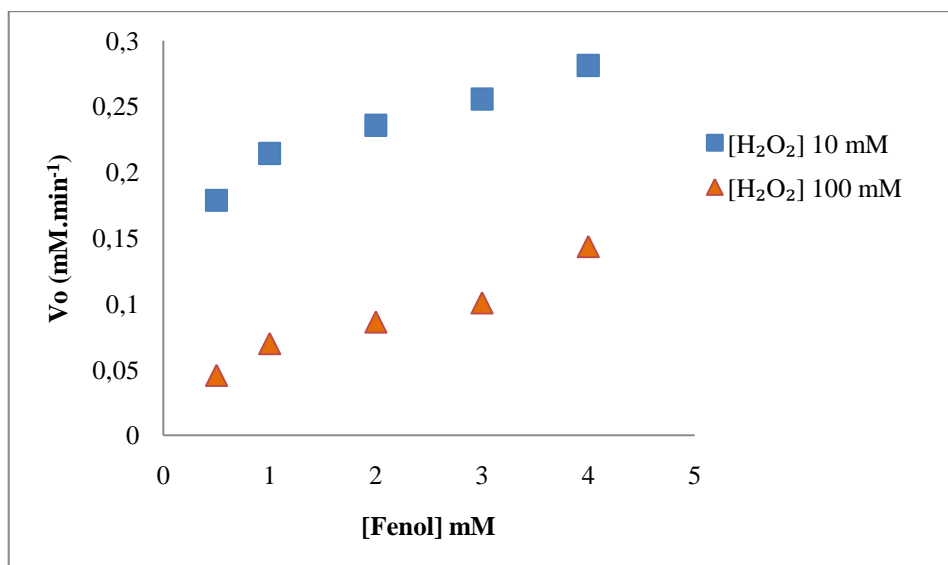


Figura 3.7 Velocidades iniciales, en función de la concentración de fenol a concentraciones inhibitorias de peróxido de hidrógeno (10 y 100 mM). Modelo Michaelis-Menten.

En la Figura 3.8 se muestra la familia de rectas de los dobles recíprocos ($1/V_o$ vs $1/[\text{Fenol}]$) a concentraciones fijas de peróxido de hidrógeno; los interceptos sobre el eje $1/V_o$ dan los valores de los inversos de las $V_{\text{máx}}$ ap para las distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno y, los interceptos sobre el eje de $1/[\text{Fenol}]$

proporcionan los valores de los inversos de las constantes de afinidad aparentes del fenol ($K_{\text{Fenol ap}}$).

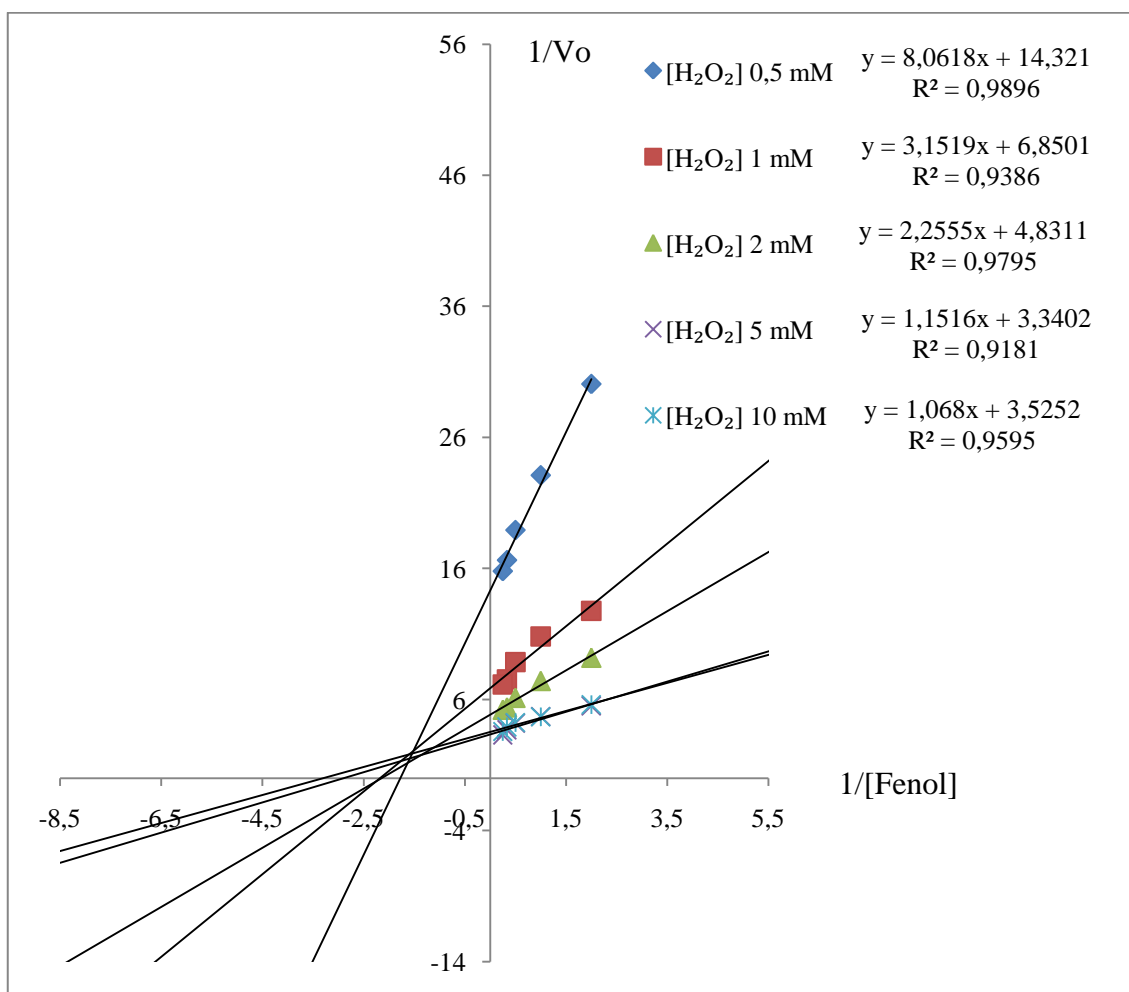


Figura 3.8 Gráfico de los dobles recíprocos: $1/V_o$ vs $1/[Fenol]$ a diferentes concentraciones fijas de peróxido de hidrógeno, para un mecanismo cinético bisustrato ordenado.

Con las ecuaciones de las rectas del gráfico de los dobles recíprocos, se calcularon los valores de $V_{\text{máx ap}}$ y $K_{\text{Fenol ap}}$ para las diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno, los resultados de estos parámetros se presentan en la Tabla 3.14. A medida que la concentración de peróxido aumenta hasta 5 mM, la constante de afinidad del fenol disminuye y la $V_{\text{máx}}$ aumenta. A concentración de peróxido igual o mayor a 10 mM los parámetros cinéticos presentan irregularidades (Figuras 3.9 y 3.10)

Tabla 3.14 Valores de $V_{m\acute{a}x\ ap}$ y $K_{Fenol\ ap}$, evaluados con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno.

$[H_2O_2]$ (mM)	$V_{m\acute{a}x\ ap}$ (mM.min ⁻¹)	$K_{Fenol\ ap}$ (mM)
0,5	0,0698	0,5629
1	0,1460	0,4601
2	0,2070	0,4669
5	0,2994	0,3448
10	0,2837	0,3030

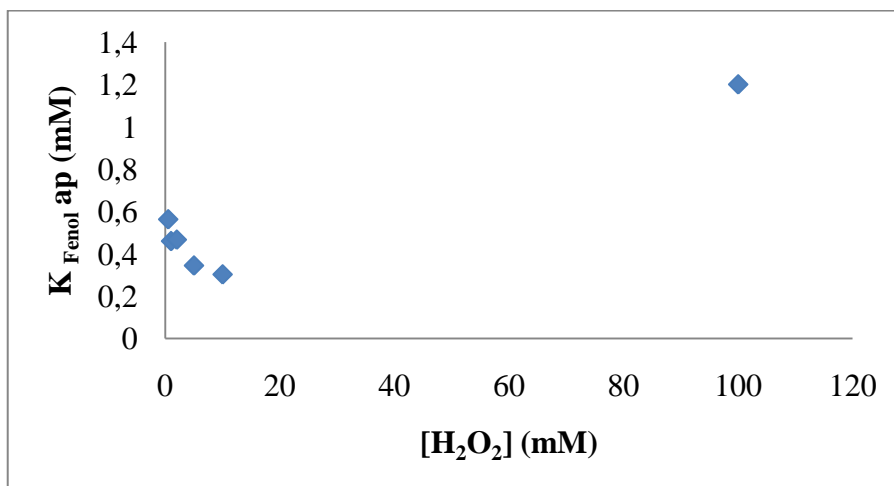


Figura 3.9 Constantes de afinidad aparentes del fenol en función de la concentración de peróxido de hidrógeno.

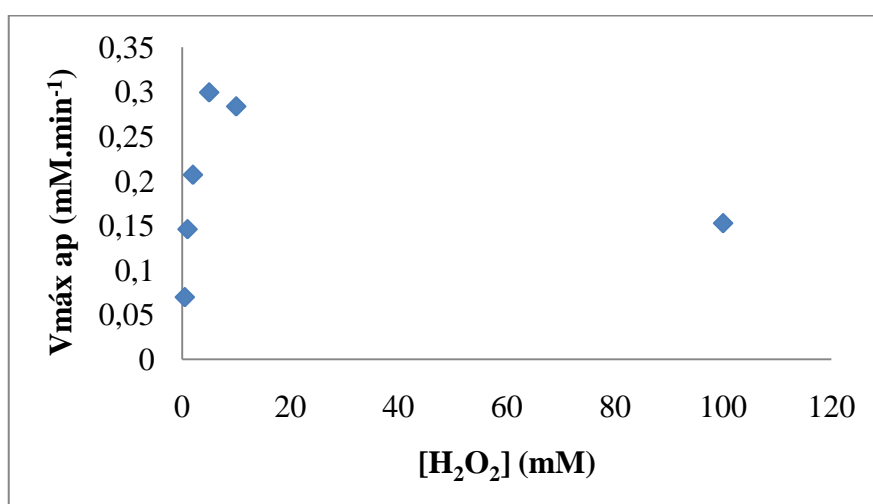


Figura 3.10 Velocidades máximas aparentes en función de la concentración de peróxido de hidrógeno.

La $V_{m\acute{a}x}$ es $0,459 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$ y la K_{Fenol} es $0,527 \text{ mM}$, estos valores se obtuvieron con las gráficas secundarias: $1/V_{m\acute{a}x}$ ap vs $1/[\text{H}_2\text{O}_2]$ y $1/K_{\text{Fenol}}$ ap vs $[\text{H}_2\text{O}_2]$ (ver Anexo F).

Cuando se mantiene fija la concentración de fenol y el ligando variable es el peróxido de hidrógeno, en el modelo de Michaelis-Menten, los resultados mostraron que la velocidad inicial se incrementa con el aumento de la concentración de peróxido de hidrógeno, hasta una concentración de peróxido de 5 mM , a una concentración de 10 mM la V_o desciende. La concentración de fenol 4 mM proporciona los valores más altos de V_o (Figura 3.11).

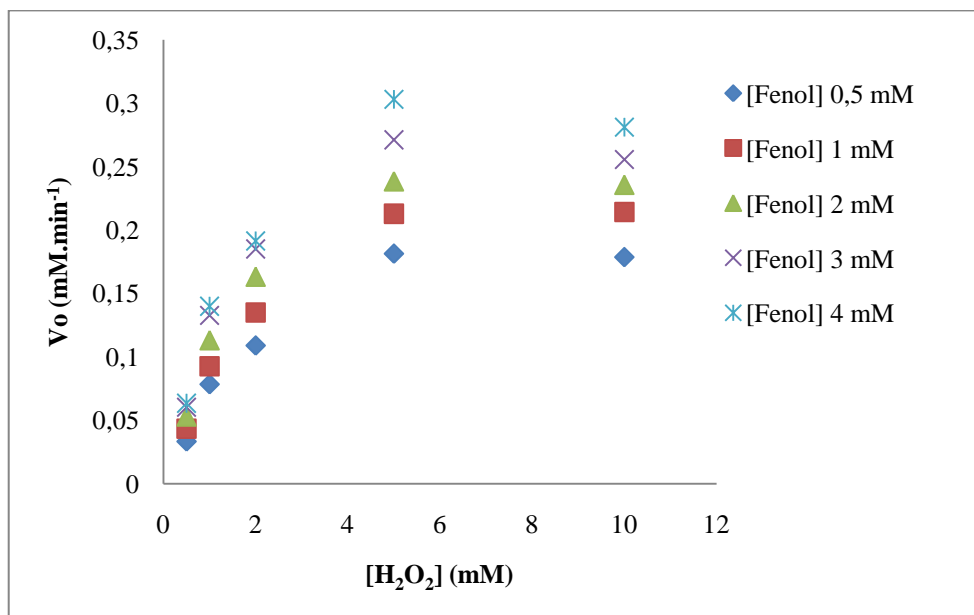


Figura 3.11 Comparación de las velocidades iniciales, en función de la concentración de peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones fijas de fenol. Modelo Michaelis-Menten.

En la figura 3.12 se presenta la gráfica de los dobles recíprocos de $1/V_o$ versus $1/[\text{H}_2\text{O}_2]$ a diferentes concentraciones fijas de fenol, donde todas las rectas independientemente de la concentración de fenol, se interceptan en el eje $1/V_o$, en un mismo valor de $V_{m\acute{a}x}$ igual a $0,4768 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$ (el valor de $V_{m\acute{a}x}$ se lo determinó con la gráfica secundaria de las pendientes de $1/[\text{H}_2\text{O}_2]$ en función de $1/[\text{Fenol}]$, como se muestra en el Anexo G).

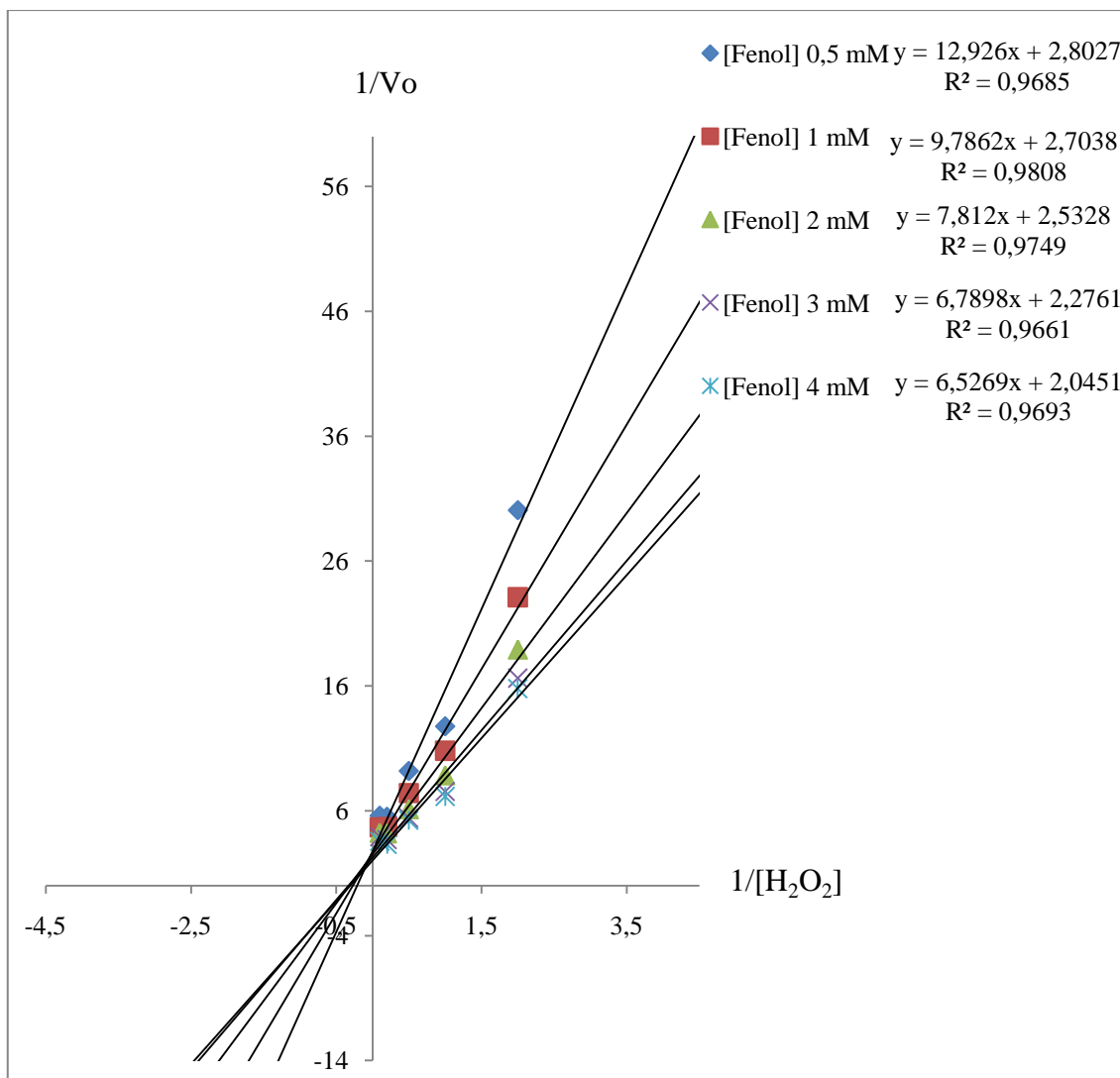


Figura 3.12 Gráfico de los dobles recíprocos: $1/V_o$ vs $1/[H_2O_2]$ a diferentes concentraciones fijas de fenol, para un mecanismo cinético bisustrato ordenado.

Los valores de $K_{H_2O_2}$ ap, presentados en la Tabla 3.15, se obtuvieron a partir de las ecuaciones de las rectas de los dobles recíprocos de la Figura 3.12. A medida que la concentración de fenol aumenta la constante de afinidad del peróxido disminuye (Figura 3.13).

Tabla 3.15 Valores de $K_{H_2O_2}$ ap, evaluados a diferentes concentraciones de fenol.

[Fenol] (mM)	$K_{H_2O_2}$ (mM)
0,5	4,6120
1	3,6194
2	3,0843
3	2,9830
4	3,1915

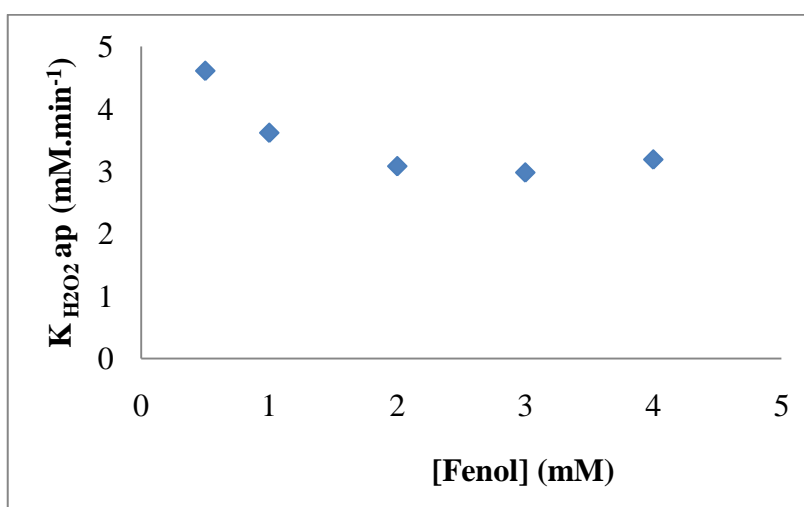


Figura 3.13 Constantes de afinidad aparentes del peróxido de hidrógeno en función de la concentración de fenol

El $K_{H_2O_2}$ es 2,7576 mM, para determinar este valor se empleó la gráfica secundaria de $K_{H_2O_2}$ ap en función de $1/[Fenol]$ (ver Anexo G).

3.3.2. Curva de Calibración para la determinación de fenoles

En la Figura 3.14 se representan gráficamente las 10 curvas de calibración realizadas para la cuantificación de fenol.

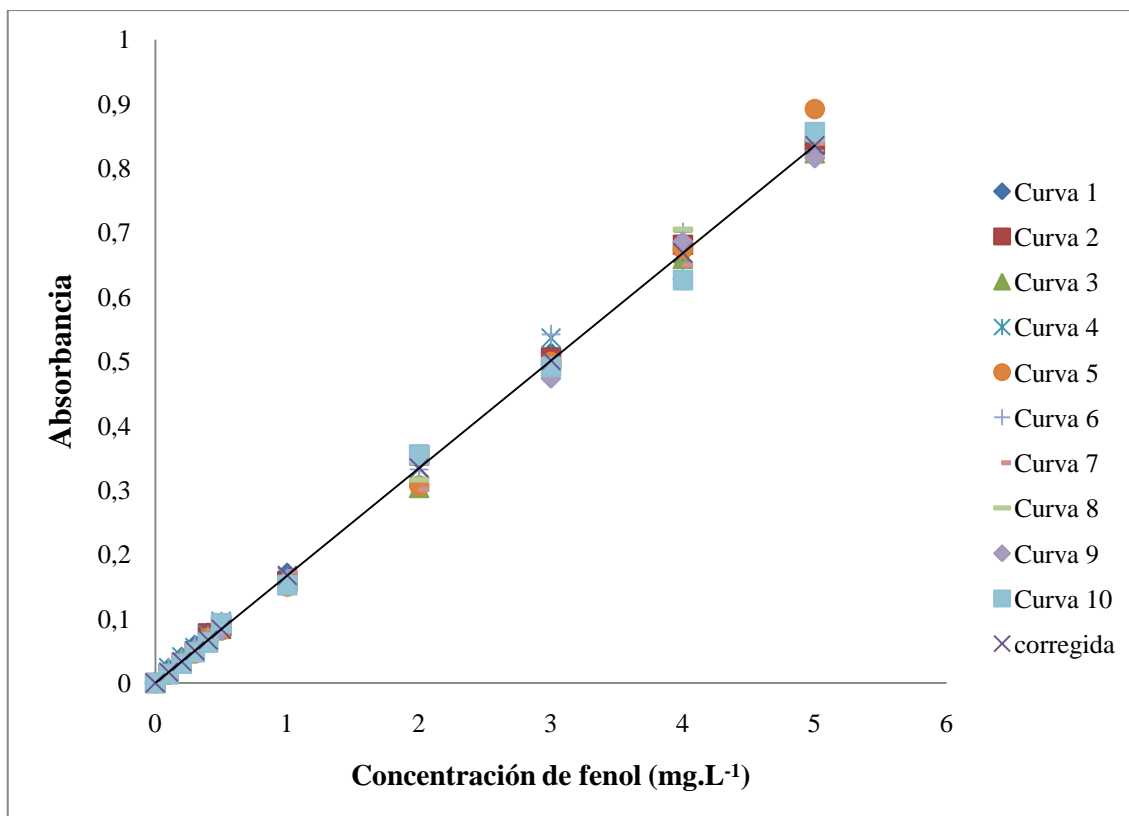


Figura 3.14 Curvas de calibración de fenol

Tabla 3.16 Valores promedio de las pendientes, intersecciones y R^2 de las curvas de calibración con su respectivo análisis estadístico.

	Promedio	Desviación estándar	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)
Pendiente	0,1670	0,0032	0,1651	0,1690
Intersección	0,0002	0,0052	-0,0030	0,0034
R^2	0,9980	0,0009	0,9974	0,9985

La fórmula para calcular la concentración de fenol se obtuvo a través de la ecuación de la recta, que contiene los valores promedio de la pendiente y de la intersección con el eje Y (ver Tabla 3.16) calculados de las 10 curvas de calibración presentadas en la Figura 3.14.

La ecuación de la recta y la fórmula para determinar la concentración de fenol son:

$$y = 0,167x + 0,0002$$
$$Abs_{500nm} = 0,167[Fenol] + 0,0002$$
$$[Fenol] = \frac{Abs_{500nm} - 0,0002}{0,167}$$

Los valores de límite inferior y límite superior de la Tabla 3.16, nos permiten establecer el rango en el cual los datos experimentales poseen el 95% de confianza, además mediante estos valores se pueden crear gráficos de control de pendientes, intersecciones con el eje Y y R^2 (Anexo I), con los que se evalúa si una curva de calibración se encuentra bajo un control estadístico. La curva de calibración está bajo control si los resultados obtenidos se disponen dentro de los límites inferior y superior de la gráfica de control. Con este criterio se validaron las 10 curvas de calibración elaboradas (Anexo H), cuyos valores de pendientes, intersecciones con el eje Y y R^2 si se encontraron dentro de los límites de confianza establecidos.

3.3.3. Porcentaje de remoción de fenoles en agua sintética

Las peroxidasas de *Raphanus sativus var sativus* catalizan la polimerización de fenoles en presencia de peróxido de hidrógeno, por lo que después de 24 horas fue necesario filtrar las muestras de agua tratadas con enzimas para remover los polímeros de fenol que se forman. Los polímeros filtrados eran de color café y claramente apreciables sobre el papel filtro blanco (Figura 3.15). Los experimentos de polimerización se llevaron a cabo con 398,105 U de peroxidasas de *Raphanus sativus var sativus* a temperatura ambiente y pH 7,4.

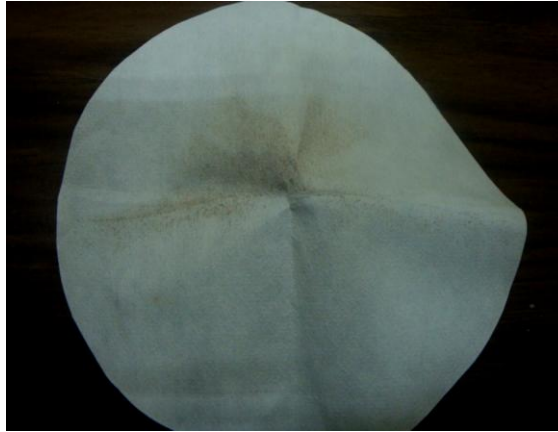


Figura 3.15 Polímeros de fenol obtenidos con concentración de peróxido 5mM y concentración de fenol 4mM.

Cuando se le aplicó el tratamiento enzimático al agua sintética, esta tomó una apariencia turbia y de color café debido a la presencia de polímeros (a mayor concentración de polímeros el color se tornaba más oscuro). La filtración llevada a cabo con papel filtro NM460d, removi6 eficientemente los polímeros de fenol, dejando el agua completamente transparente, con lo que se pudo cuantificar la concentración de fenol para calcular el porcentaje de fenol retirado del agua sintética.

Al evaluar 5 concentraciones de per6xido de hidr6geno por 5 concentraciones de fenol, se obtuvieron 25 valores de porcentajes de remoci6n de fenol, de los cuales el valor m6s bajo fue 11,90% a concentraci6n de per6xido 0,5 mM y concentraci6n de fenol 4 mM, y el m6s alto fue 90,69%, que se logr6 a concentraci6n de per6xido 5 mM y concentraci6n de fenol 0,5 mM (Tabla 3.17).

Tabla 3.17 Porcentajes de remoci6n de fenol a diferentes concentraciones de per6xido de hidr6geno y fenol.

	Porcentaje de remoci6n de fenol (%)				
	[H ₂ O ₂] (mM)				
[Fenol] (mM)	0,5	1	2	5	10
0,5	67,31	69,90	75,57	90,69	83,52
1	42,06	51,10	73,02	81,98	78,58
2	30,15	43,10	75,43	76,48	72,78
3	21,38	34,74	59,60	71,96	77,23
4	11,90	23,89	42,73	70,13	63,63

A medida que aumenta la concentración de peróxido, hasta una concentración de 5 mM, el porcentaje de remoción se incrementa. A concentración de peróxido de 10 mM se da un descenso en el porcentaje de remoción de fenol en comparación al porcentaje logrado con una concentración de 5 mM de peróxido. La mayor remoción de fenoles se obtiene cuando la concentración de fenol es de 0,5 mM. (Figura 3.16).

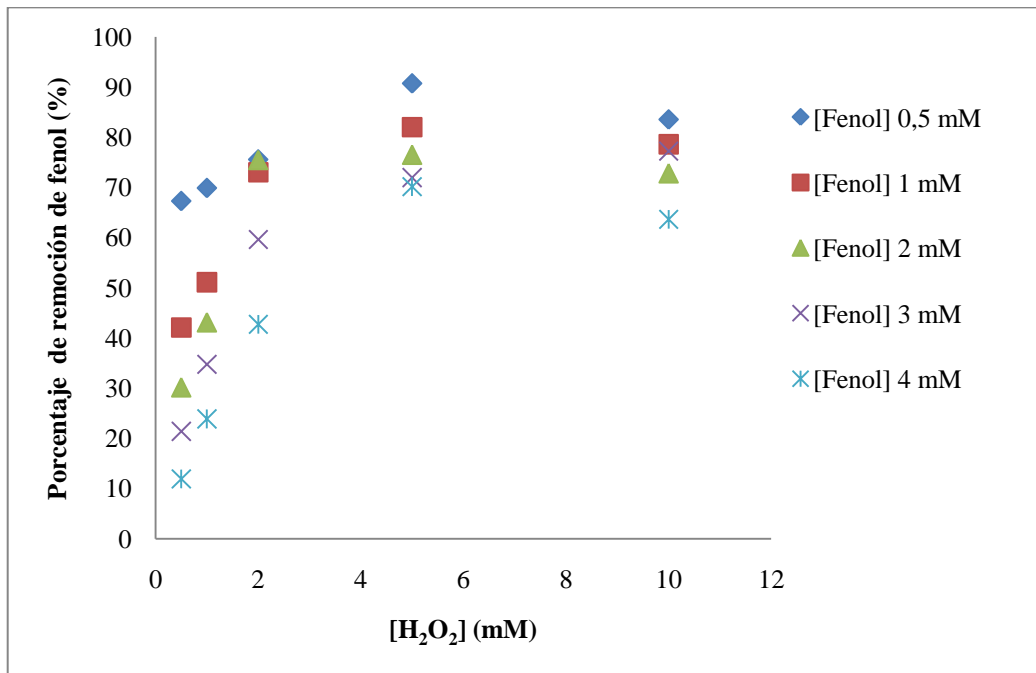


Figura 3.16 Porcentajes de remoción de fenol en función de la concentración de peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones fijas de fenol.

En la Figura 3.17 donde se muestran los porcentajes de remoción en función de la concentración de fenol a 5 concentraciones fijas de peróxido de hidrógeno, se observa que, contrario a lo que sucede con el peróxido de hidrógeno, a medida que la concentración de fenol aumenta el porcentaje de remoción disminuye; hay dos excepciones: 1) a concentración de fenol 2 mM que con 2 mM de peróxido, consigue mayor remoción que a concentración de fenol 1 mM tratado con la misma cantidad de peróxido y, 2) a concentración de fenol 3 mM que tiene mayor porcentaje de remoción que a [Fenol] 2 mM cuando se tratan con 10 mM de peróxido. La concentración de peróxido de hidrógeno con la que se alcanza una mejor remoción del fenol es de 5 mM, a pesar que a concentración de fenol 3 mM se da una mayor remoción con concentración de peróxido de 10 mM.

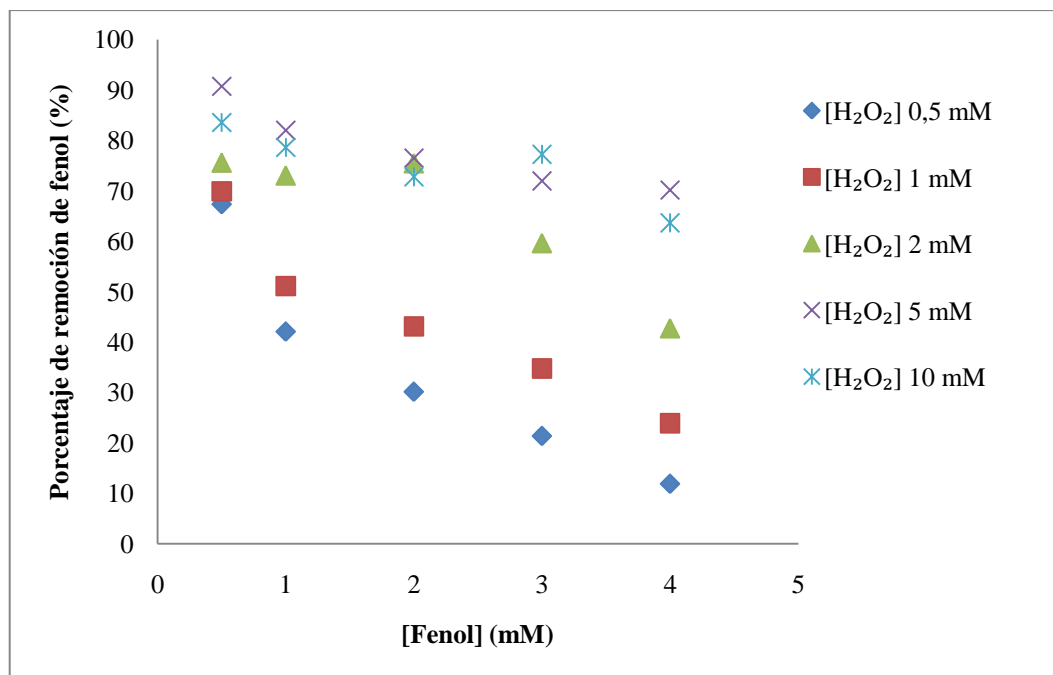


Figura 3.17 Porcentaje de remoción de fenol en función de la concentración de fenol a diferentes concentraciones fijas de peróxido de hidrógeno.

El diseño factorial 5X5, que se aplicó para determinar las concentraciones de peróxido y fenol que generan la mayor remoción de fenoles, se analizó en el programa estadístico SPSS. Los resultados del análisis estadístico demostraron que a medida que se incrementa la concentración de peróxido, hasta una concentración límite de 5 mM, se incrementa el porcentaje de remoción del fenol (Figura 3.18) y, a medida que aumenta la [Fenol] disminuye el porcentaje de remoción del fenol (Figura 3.19).

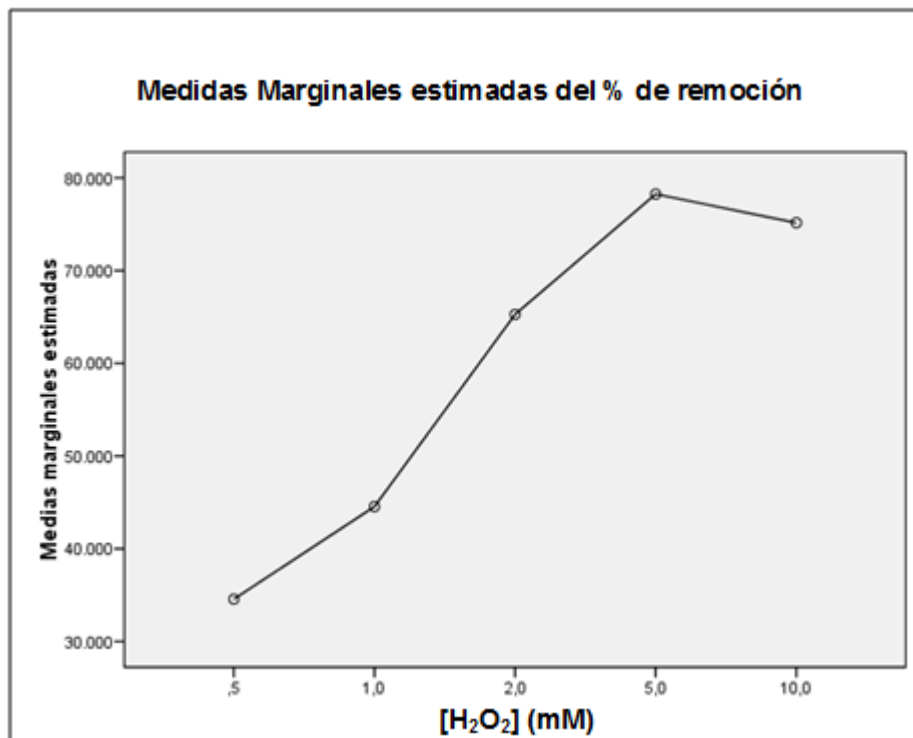


Figura 3.18 Medias marginales estimadas del porcentaje de remoción de fenol en función de la concentración de peróxido de hidrógeno.

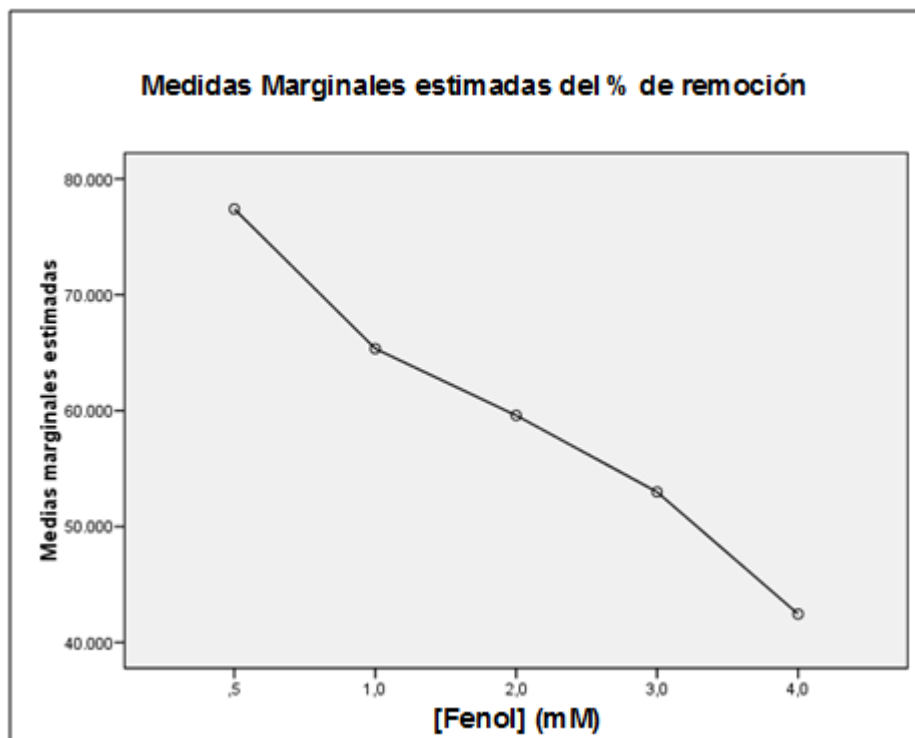


Figura 3.19 Medias marginales estimadas del porcentaje de remoción de fenol en función de la concentración inicial de fenol.

En las Figuras 3.20 y 3.21 donde se presenta en análisis estadístico factorial de las interacciones concentración de peróxido-concentración de fenol y concentración de fenol- concentración de peróxido, es evidente que el tratamiento con el más alto porcentaje de remoción, es el que se realizó con concentración de peróxido 5 mM y concentración de fenol 0,5 mM.

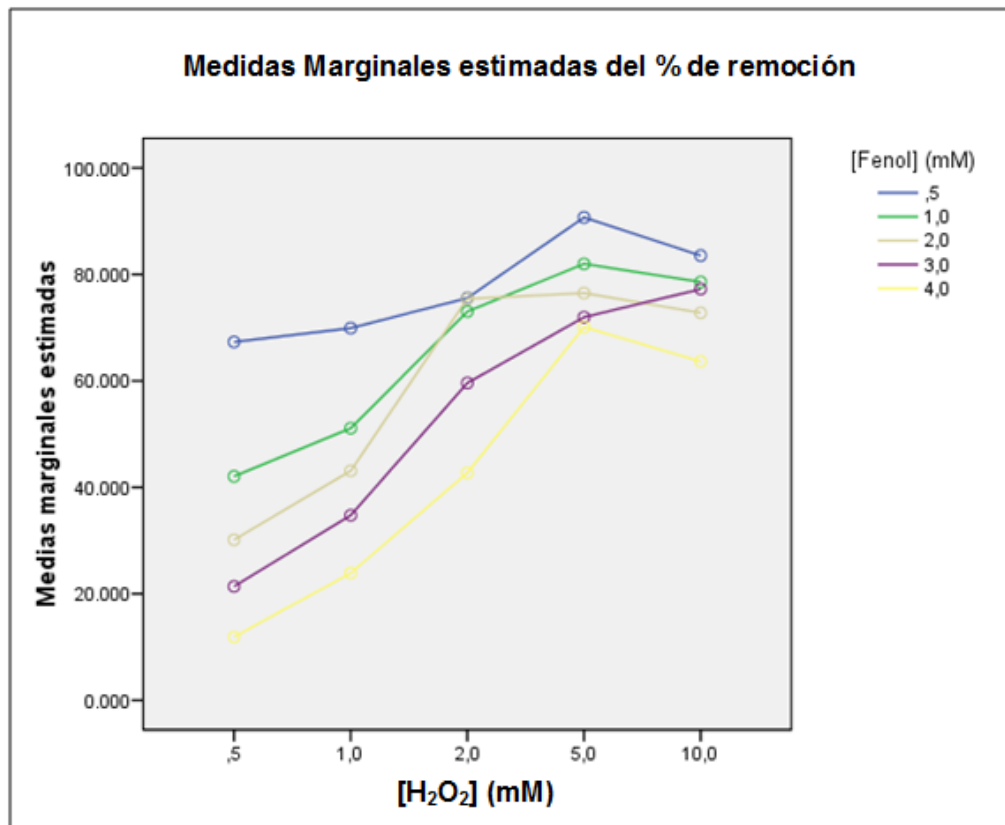


Figura 3.20 Medias marginales estimadas del porcentaje de remoción de fenol en función de la concentración de peróxido de hidrógeno y su interacción con las concentraciones de fenol.

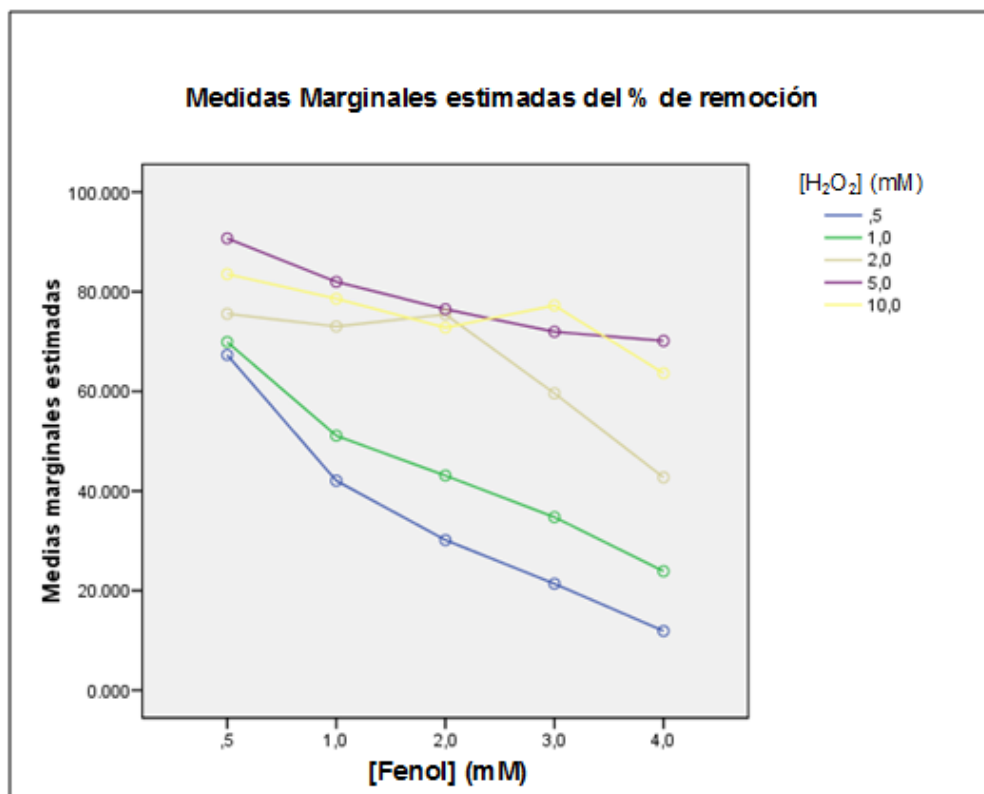


Figura 3.21 Medias marginales estimadas del porcentaje de remoción de fenol en función de la concentración de fenol y su interacción con las concentraciones de peróxido de hidrógeno.

En el análisis de varianza de la Tabla 3.18 tenemos que para: peróxido, fenol e interacción peróxido-fenol, la significancia es menor a 0,005 ($p < 0.005$), por lo tanto, existen diferencias inter e intra grupos, es decir que la variable dependiente (porcentaje de remoción) es diferente a lo largo de todos los tratamientos.

Tabla 3.18 ANOVA de las pruebas de remoción de fenol.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Peróxido	59008,662	4	14752,165	2408,871	8,55E-152
Fenol	27503,102	4	6875,775	1122,741	1,46E-123
Peróxido * Fenol	7359,020	16	459,939	75,103	1,727E-69
Error	1071,717	175	6,124		
Total	94942,501	199			

^aR cuadrado =0,989 (R cuadrado corregida =0,987)

De acuerdo a la prueba de Tukey para las concentraciones de peróxido de hidrógeno (intra grupo), se puede considerar 5 grupos significativos, de los cuales el mejor es con concentración de peróxido 5 mM y el deficiente es con concentración de peróxido 0,5 mM (Tabla 3.19).

Tabla 3.19 DHS de Tukey para las concentraciones de peróxido de hidrógeno.

[H ₂ O ₂] (mM)	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
0,5	40	34,562				
1	40	44,545				
2	40	65,271				
10	40	75,149				
5	40	78,247				
Significación		1	1	1	1	1

Tamaño muestral de la media armónica = 40; alfa = 0,05

Según Tukey, con nivel de confianza de 95%, la concentración de fenol con mayor porcentaje de remoción es de 0,5 mM (Tabla 3.20).

Tabla 3.20 DHS de Tukey para las concentraciones de fenol.

[Fenol] (mM)	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
4	40	42,455				
3	40	52,983				
2	40	59,588				
1	40	65,349				
0,5	40	77,399				
Significación		1	1	1	1	1

Tamaño muestral de la media armónica = 40; alfa = 0,05

En la Figura 3.22 se representa la comparación entre los tratamientos para fijar el mejor, siendo el elegido el que se efectuó con peróxido de hidrógeno a una concentración de 5 mM y con fenol a una concentración de 0,5 mM.

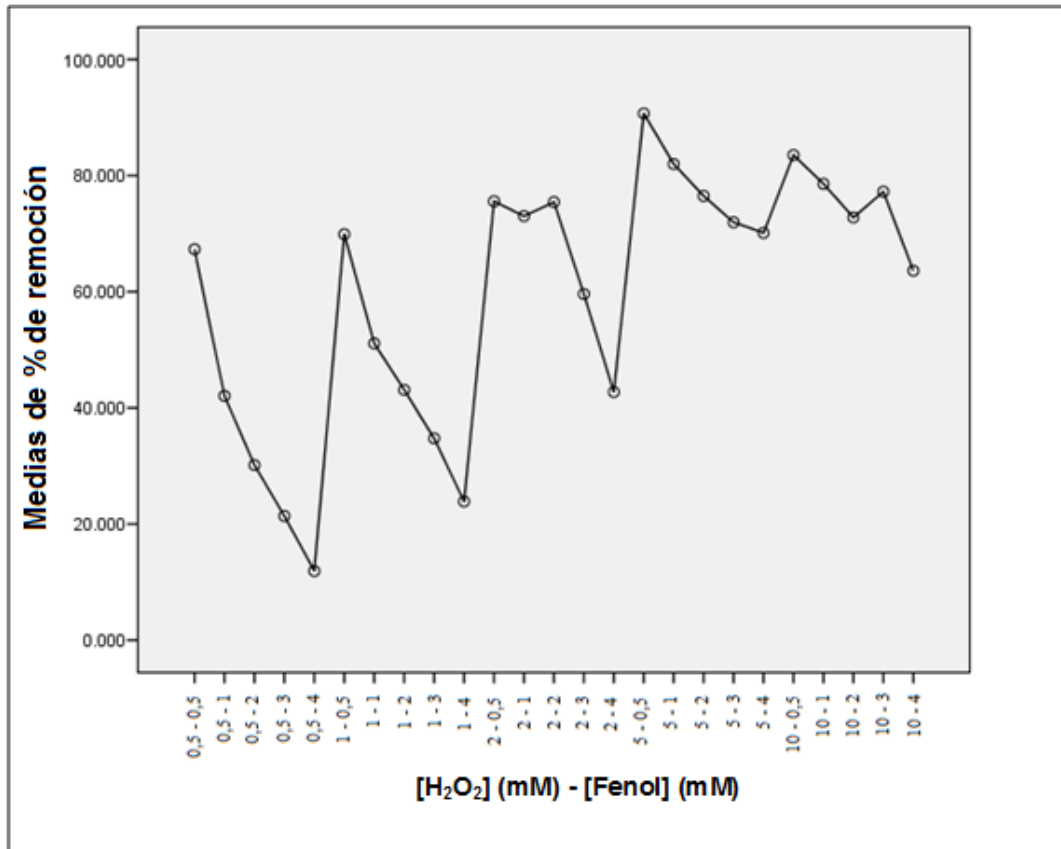


Figura 3.22 Comparación de las medias de los porcentajes de remoción de los 25 tratamientos (interacciones concentración de peróxido–concentración de fenol) aplicados para la eliminación de fenoles.

Al hacer la comparación entre los tratamientos (inter grupos), se establecieron 15 grupos Tukey con un nivel de confianza del 95%, de acuerdo a este análisis el tratamiento con mayor eficacia en la eliminación de fenol, es el que se aplicó con concentración de peróxido 5 mM y concentración de fenol 0,5 mM. El tratamiento que produjo los resultados más bajos fue el efectuado con concentración de peróxido 0,5 mM y concentración de fenol 4 mM (Tabla 3.21).

Tabla 3.21 Grupos Tukey de la comparación de tratamientos, con nivel de confianza 95%, ordenados en forma descendente.

Grupo	Tratamiento [Peróxido] - [Fenol]
1	5 - 0,5
2	10 - 0,5; 5 - 1
3	5 - 1; 10 - 1
4	10 - 1; 10 - 3; 5 - 2; 2 - 0,5; 2 - 2
5	10 - 3; 5 - 2; 2 - 0,5; 2 - 2; 2 - 1; 10 - 2
6	5 - 2; 2 - 0,5; 2 - 2; 2 - 1; 10 - 2; 5 - 3
7	2 - 1; 10 - 2; 5 - 3; 5 - 4; 1 - 0,5
8	5 - 4; 1 - 0,5; 0,5 - 0,5
9	0,5 - 0,5; 10 - 4
10	10 - 4; 2 - 3
11	1 - 1
12	1 - 2; 2 - 4; 0,5 - 1
13	1 - 3; 0,5 - 2
14	1 - 4; 0,5 - 3
15	0,5 - 4

3.3.4. Destilación del agua de la textilera y cuantificación de fenoles

La destilación se completó en un tiempo de 1 hora y media a una temperatura aproximada de 90°C. Los resultados de la concentración de fenoles en el agua de la textilera, en el estándar de fenol y en el agua de la textilera fortificada se presentan en la Tabla 3.22. Se puede apreciar que después de la destilación, se recupera la totalidad de la concentración de fenol, tanto del estándar como de la muestra fortificada, lo que

indica que la concentración medida en el agua de la textilera es un valor real de la cantidad de fenol que se encuentra en el agua residual.

Tabla 3.22 Concentración de fenol en el estándar, agua de la textilera y agua de la textilera fortificada.

Muestras	Concentración teórica de fenol (mg.L⁻¹)	Concentración de fenol calculada (mg.L⁻¹)
Estándar	3	3,085*
Agua de la textilera	desconocida	0,366*
Agua de la textilera fortificada	+ 3	3,462*

*Valor promedio de 3 mediciones de [Fenol].

3.3.5. Porcentaje de remoción de fenoles en efluentes de una empresa textilera

Los fenoles en el agua de la textilera alcanzaron una concentración de 0,340 mg.L⁻¹ y, su eliminación, después de tratar el agua con [H₂O₂] 5 mM y 398,105 U de peroxidasa de *Raphanus sativus var sativus*, fue mínima, con valores de porcentaje de remoción comprendidos entre 1,76 y 8,80% (Tabla 3.23). La concentración de fenol del agua de la textilera no se redujo significativamente después de tratarla, las 5 repeticiones tuvieron valores cercanos a la concentración original del agua contaminada (Figura 3.23).

Tabla 3.23 Valores de concentración de fenol y porcentaje de remoción de 5 tratamientos realizados al agua de una empresa textilera, con concentración de peróxido 5 mM y 398,105 U de peroxidasa de *Raphanus sativus var sativus*.

Agua de la Textilera	Conc. Fenol (mg.L⁻¹)	Porcentaje de remoción (%)
Sin tratar	0,340*	-
Tratamiento 1	0,322	5,28
Tratamiento 2	0,316	7,04
Tratamiento 3	0,322	5,28
Tratamiento 4	0,310	8,80
Tratamiento 5	0,334	1,76

*Valor promedio de 3 mediciones de [Fenol] en el agua de la textilera.

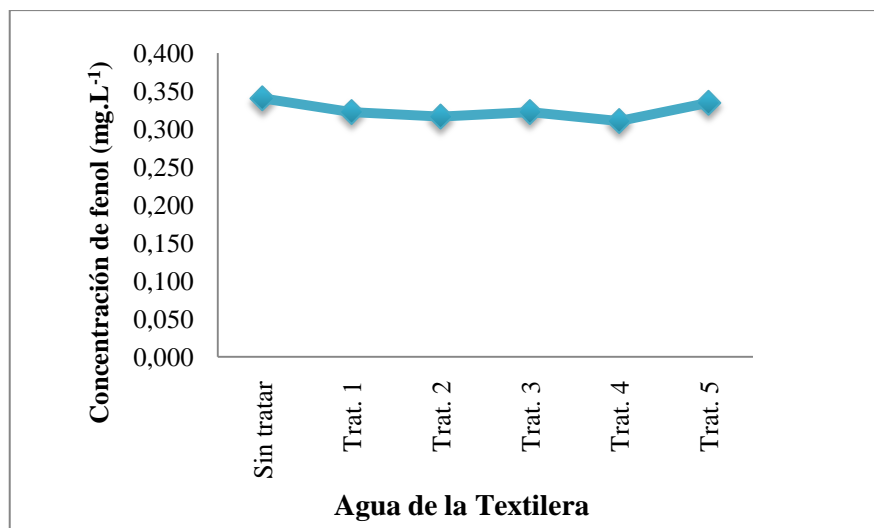


Figura 3.23 Comparación de las concentraciones de fenol del agua de la textilera sin tratar y tratada con concentración de peróxido 5 mM y 398,105 U de peroxidasa de *Raphanus sativus var sativus* (5 repeticiones).

En las 5 medidas de porcentaje de remoción obtenidas para las pruebas de eliminación de fenol en el agua de la textilera, se ha calculado un valor medio de 5,63% de remoción con una desviación estándar de 2,61%, esto permite inferir, con una confiabilidad del 95%, que el porcentaje de remoción de fenol en este caso está entre 2,39 y 8,88% (Tabla 3.24).

Tabla 3.24 Resumen de la estadística descriptiva de los ensayos de remoción de fenoles en el agua de la textilera.

Medida estadística	Valor
Media (%)	5,63
Desviación estándar (%)	2,611
Cuenta	5
Límite inferior (95%) (%)	2,39
Límite superior (95%) (%)	8,88

CAPITULO 4

DISCUSION

4.1. Obtención del extracto crudo

El *Raphanus sativus var sativus*, de la familia Brassicaceae o Cruciferae, es la variedad de rábano que comúnmente se cosecha en el Ecuador, tiene una raíz comestible que es gruesa, carnosa, picante y de color rojo intenso. Su ciclo vegetativo es de aproximadamente de 3 a 5 semanas, y puede ser cultivado durante todo el año, siempre y cuando las temperaturas no sean muy elevadas, las temperaturas favorables para el desarrollo del rábano se encuentran entre los 15 y 18 °C, con mínimas de 4 °C y máximas de 21 °C (Pineda, 2008). En nuestro país la producción de rábano es de 330 toneladas, convirtiéndose en una hortaliza de fácil y económica adquisición, por lo que se la seleccionó para desarrollar la presente investigación.

Las peroxidadasas se encuentran ampliamente distribuida en las plantas, participan en la construcción y lignificación de la pared celular, la biosíntesis de etileno, la regulación de niveles de auxina, la protección contra el deterioro de tejidos e infección por microorganismos patógenos, la oxidación de ácido indolacético, entre otras, principalmente se encuentran en el citoplasma y en la pared celular (Sánchez, 2009) , sin embargo, no existe una especificación sobre el lugar de la planta en donde se encuentren en mayor cantidad. Sakharov, *et al.* en 1999, determinaron la actividad peroxidásica en 7 frutos, 13 raíces y 31 hojas de plantas tropicales que crecen en Colombia, ellos encontraron que la actividad de la peroxidasa varía considerablemente de una especie a otra. En el caso de *Raphanus sativus var sativus* la raíz presentó mayor actividad enzimática en comparación con la hoja de la misma planta, aproximadamente 85,93% más AE, a pesar que la hoja mostró mayor concentración de proteínas. Según el Departamento de agricultura y servicio al consumidor de Carolina del Norte, las hojas de rábano contienen más calcio, fósforo, vitamina C y proteína que la parte comestible de la planta (raíz).

En la primera parte de este trabajo nos centramos en la decoloración del extracto, con carbón activado en polvo, para eliminar compuestos que pueden interferir con la actividad peróxidasica de las enzimas presentes en el extracto de rábano (Marquéz, 1997 y Tarragó *et al*, 2003), tanto en el de raíz como en el de hoja, los resultados demostraron que la decoloración de los extractos disminuía significativamente la actividad enzimática y la concentración de proteína, al modificar la cantidad de carbón activado y pH del extracto de igual manera existió una reducción en la AE y la [P].

Se debe considerar que el carbón activado es un adsorbente universal, con elevada capacidad de eliminación de sustancias debido a la alta superficie interna que posee. Por su naturaleza apolar y por el tipo de fuerzas implicadas en el proceso de adsorción, retiene preferentemente moléculas apolares y con elevado peso molecular. El pH de la solución y la solubilidad de los compuestos son factores que influyen en la adsorción; la capacidad del carbón aumenta cuando el pH disminuye y, los compuestos con baja solubilidad se absorben más fácilmente (Rodríguez, 2003 y Lenntech, 2009)

Al incrementar el pH de los extractos a 7.3 la AE disminuyó en 66.07% y 82,60% en el extracto de raíz y hoja, respectivamente. De igual forma la proteína se redujo en 79,74 % en el extracto de raíz de rábano y 73,68% en el de hoja. La pérdida de AE y [P] fue mayor que a pH original de los extractos, esto pudo deberse a que la enzima esta cerca de su punto isoeléctrico, en donde su carga neta es cero y su solubilidad es casi nula, facilitando el proceso de adsorción sobre carbón activado (Lenntech, 2009 y Chaplin, 2004).

Cho y Bailey en 1979 inmovilizaron la enzima glucoamilasa sobre carbón activado, y en 2004, Sun, *et al*. inmovilizaron peroxidasa de rábano picante (HRP) sobre la superficie de carbón activado en polvo. El poder inmovilizar enzimas sobre carbón activado, significa que se da una interacción física entre los dos, por lo que al decolorar los extractos de rábano es posible que las peroxidases se retengan sobre la superficie de carbón.

4.2. Purificación enzimática de baja resolución

La purificación de una proteína suele tener como objetivo final obtener el material deseado con el máximo rendimiento, utilizando el proceso más corto, y de ser posible, más económico. Hay que tener en cuenta el material del que se parte y cual será la aplicación del material purificado, ya que de ello depende el grado de pureza a obtener. En este caso, se aplicó una purificación de baja resolución, con el fin de evaluar la capacidad de las peroxidasas para polimerizar compuestos fenólicos.

La precipitación de proteínas mediante el uso de sales ha sido utilizada durante muchos años, siendo útil tanto para su purificación como para su concentración. La sal más comúnmente empleada es el sulfato de amonio debido a su alta solubilidad, a la ausencia de toxicidad para la mayor parte de las enzimas y a su bajo costo (Coello, 2010). A altas concentraciones de sal, las proteínas tienden a agregarse, debido a que cambian su polaridad (cargas externas), se tornan insolubles y precipitan de la solución. Esta técnica es referida como “salting out”, la cual depende de la disminución de las interacciones solubilizantes entre el agua y los grupos hidrofílicos de la proteína, es decir que cuando aumenta mucho la cantidad de sal, la interacción proteína-proteína se hace mayor que la interacción proteína-agua, produciendo la precipitación de las moléculas proteicas (Garrido *et al.*, 2006).

Algunas investigaciones que hacen referencia al uso de sulfato de amonio son: Evans (1967) para purificar peroxidasas de una planta de tomate enano (*Lycopersicon esculentum*) realizó varias precipitaciones y utilizó acetona (al 35 y 60% de saturación) y sulfato de amonio (al 70 y 90% de saturación). En 1979, Kokkinakis y Brooks, precipitan la peroxidasa de otra variedad de tomate (*Lycopersicon esculentum var. Tropic*) con sulfato de amonio al 85% de saturación, y obtuvieron un grado de purificación de 3.35 veces.

También Rodríguez-López *et al.* (2002) precipitaron la peroxidasa de la alcachofa (*Cynara scolymus, L.*) a través de una precipitación fraccionada con sulfato de amonio por saturación, al 30% y 70% de saturación, y alcanzaron un grado de purificación de 4.2. Şişecioğlu *et al.* (2010) precipitaron peroxidasas de rábano negro

turco (*Raphanus sativus* L.) con sulfato de amonio en un intervalo de 20 – 60% de saturación, el grado de purificación que obtuvieron después de la diálisis fue de 1.766.

La precipitación salina de extracto de raíz de *Raphanus sativus var sativus*, con sulfato de amonio al 90% de saturación (Márquez, 1997 y Shannon, 1965), resultó muy efectiva no sólo por el alto porcentaje de recuperación de la actividad enzimática (81,41%), sino también por el aumento en el grado de purificación de 4 veces. El grado de purificación alcanzado en el presente trabajo es similar al grado de las investigaciones mencionadas anteriormente.

4.3. Eliminación enzimática de fenoles

En la Figura 4.1 se establece el ciclo catalítico del *Raphanus sativus var sativus*, basado en el mecanismo de reacción de la peroxidasa de rábano picante (horseradish peroxidase – HRP), peroxidasa más estudiada (Veitch, 2004), y en de la peroxidasa de soja (soybean peroxidase – SBP) (Biswas, 1999).

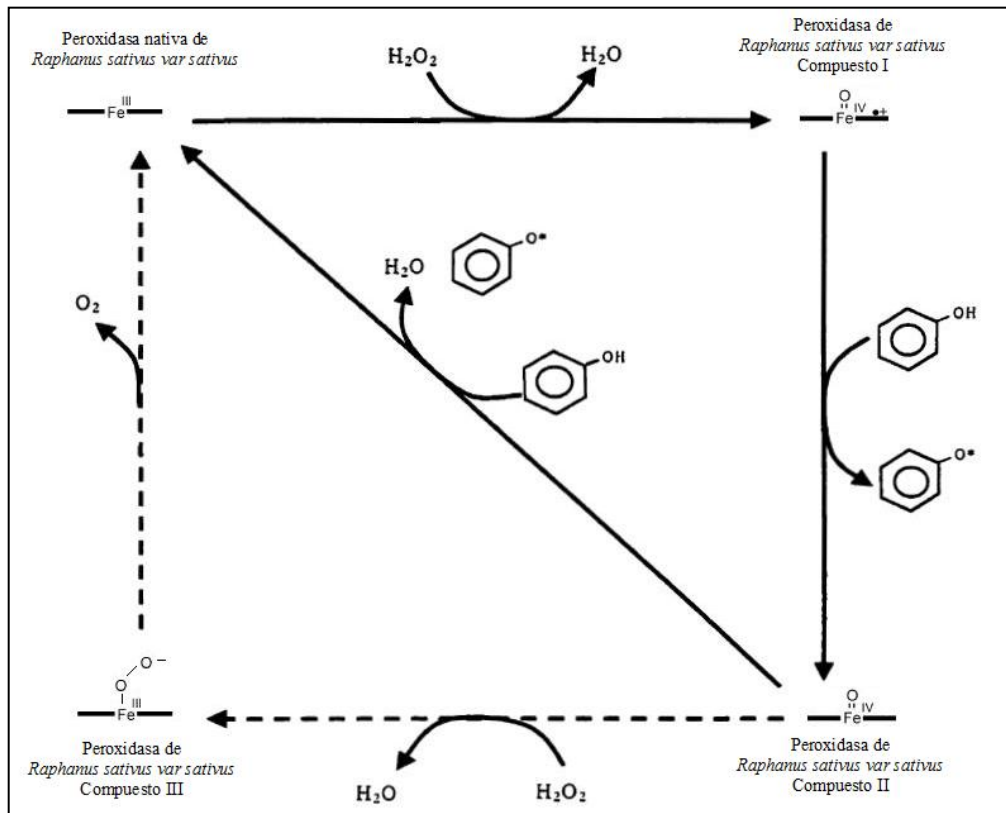


Figura 4.1 Ciclo catalítico de la peroxidasa de *Raphanus sativus var sativus*.

De acuerdo a la Figura 4.1 la peroxidasa cataliza la oxidación del fenol, usando al peróxido de hidrógeno como agente oxidante, en tres pasos. Primero la enzima reacciona con una molécula de H_2O_2 para dar lugar al Compuesto I, la formación de este compuesto se da por escisión heterolítica del enlace O-O del H_2O_2 , a través de un mecanismo push-pull (Claude 2001 y Kadish *et al.*, 2000). El imidazol de la histidina distal (His-42 en la HRP) promueve el pull, y la histidina proximal (posee un comportamiento aniónico por el enlace de su hidrógeno con el aspartato proximal) promueve el push. La molécula de H_2O_2 es convertida en un nucleótido al transferir su protón a la histidina distal. La carga negativa de la histidina proximal y la carga positiva de la histidina y arginina distal, facilitan la ruptura heterolítica de el enlace O-O del H_2O_2 y permiten la formación del grupo ferril ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) y del radical catiónico π de la porfirina (Bandyopadhyay *et al.*, 1999). Al presentar el hierro un estado de oxidación +4, es decir solo cede un electrón (va de Fe^{+3} a Fe^{+4}), el otro electrón que se cede al oxígeno proviene de la porfirina, formándose así el radical catiónico π (Ochiai, 1985).

Como segundo paso, el Compuesto I puede oxidar un sustrato (compuesto aromático) y se forma el Compuesto II. En este paso cuando un electrón es transferido del donador aromático a la porfirina (radical catiónico π) del Compuesto I, un protón (H^+) al mismo tiempo pasa a la histidina distal, dando como resultado la escisión homolítica del enlace H-O del donador, para formar un radical libre (Bandyopadhyay *et al.*, 1999).

En el tercer paso el Compuesto II es reducido al estado nativo de la enzima, por otra molécula donadora, con la producción de una molécula de agua. En la formación del H_2O participa el protón que se unió al nitrógeno del imidazol de la histidina distal en el segundo paso (Henriksen *et al.*, 1999).

Finalmente en ausencia de sustratos reductores adecuados, un exceso de H_2O_2 reacciona con el Compuesto II para formar el Compuesto III ($\text{Fe}^{+3} \text{O}_2^-$) produciéndose la inactivación de la enzima (Wariishi y GoId, 1990).

Dos radicales libres se generan por cada molécula de peróxido consumida. Como los radicales fenoxi se polimerizan espontáneamente, la relación estequiométrica peróxido-fenol es de 0,5:1; en este contexto se asume que los dímeros son

completamente insolubles en agua (Nicell *et al.*, 1992). Sin embargo, algunos dímeros pueden seguir siendo solubles y de esta manera pueden reaccionar con la peroxidasa para producir más radicales libres, los mismos que van a formar polímeros de mayor tamaño que precipitan fácilmente. Mientras los polímeros permanecen solubles las peroxidases pueden catalizar la oxidación del fenol y sus polímeros; por esta razón el consumo de peróxido para eliminar el fenol, aumenta, creándose una relación peróxido - fenol de 1:1. Así, la formación de moléculas de polímeros de gran tamaño, requiere la acción de las peroxidases con los fenoles y los polímeros de fenol formados (Pramparo, 2008).

4.3.1. Cinética de las peroxidases de rábano (*Raphanus sativus var sativus*)

Las peroxidases son enzimas bisustrato (Scholis, 2008), las reacciones bisustrato constituyen aproximadamente el 60% de las reacciones bioquímicas conocidas y casi todas consisten en la transferencia de un grupo funcional (Linares, 2007).

Los estudios cinéticos son fundamentales para la elucidación de los mecanismos de reacción de enzimas, y muchos han sido realizados para diferentes peroxidases, con diferentes sustratos secundarios. A pesar de ello, los parámetros cinéticos encontrados en la bibliografía pueden llegar a diferir ampliamente para la misma peroxidasa, lo cual demuestra la complejidad de caracterizar cinéticamente esta familia de enzimas.

En el estudio de la cinética de las peroxidases de *Raphanus sativus var sativus* la curva de la velocidad inicial de reacción en función de la concentración inicial del sustrato variable para cada concentración de sustrato fijo (Figuras 3.6 y 3.11) se ajustó de manera adecuada a una cinética *michaeliana*. Con este antecedente se aplicó el principio de Lineweaver-Burk (dobles recíprocos) para establecer el mecanismo cinético a emplear en el cálculo de los parámetros K_M y $V_{m\acute{a}x}$ para cada sustrato. Vale reclacar que las condiciones en las que se desarrollaron los ensayos de cinética y % de remoción fueron: temperatura ambiente, pH 7.4 (Naghbi *et al.*, 2003) a concentraciones fijas de enzima.

A niveles bajos de concentración inicial de H_2O_2 se consiguió un bajo rendimiento de la enzima, por lo que los valores de la velocidad inicial son bajos. A medida que los valores de concentración inicial del fenol aumentaron la V_o también se incrementó, en el intervalo de 0,5 – 5 mM, al aumentar la $[H_2O_2]$ fuera de este rango la V_o empezó a decrecer debido a la inactivación por exceso de sustrato. Este mismo comportamiento fue observado, por Pramparo (2008), en la peroxidasa de rábano picante (HRP) de la casa comercial Sigma-Aldrich (ref. P8250), en donde la inhibición se presentó a partir de $[H_2O_2]$ 1,5 mM, cuando el intervalo de concentraciones de peróxido que analizó estuvo entre 0,221 – 2,650 mM, y el intervalo de $[Fenol]$ fue 0,5 – 1,6mM.

También se demostró que a mayor concentración de fenol (en el intervalo de concentraciones manejadas) hay un efecto positivo en la velocidad inicial de reacción, este comportamiento fue similar reportado por Pramparo 2008.

Al recurrir al principio de los dobles recíprocos (Lineweaver-Burk) en el análisis cinético de las peroxidasas de *Raphanus sativus var sativus*, las gráficas de $1/V_o$ vs $1/[Fenol]$ y las gráficas de $1/V_o$ vs $1/[H_2O_2]$ mostraron un mecanismo cinético bisustrato ordenado (Chávez *et al.*, 1990), así que para determinar las constantes de afinidad y las velocidades máximas para cada sustrato se aplicaron las ecuaciones establecidas para este mecanismo cinético.

Los parámetros cinéticos determinados para cada sustrato fueron K_M y $V_{máx}$ aparentes. Considerando que las reacciones enzimáticas estudiadas siguen el modelo bisustrato ordenado se tiene:

$$\frac{V_o}{V_{máx}} = \frac{[H_2O_2][Fenol]}{K_{H_2O_2}K_{Fenol} + K_{Fenol}[H_2O_2] + [H_2O_2][Fenol]}$$

Reordenando la ecuación anterior reflejando la dependencia de la velocidad inicial se la concentración de cada sustrato se obtienen:

$$\frac{V_o}{V_{m\acute{a}x}} = \frac{[H_2O_2]}{K_{H_2O_2} \left(\frac{K_{Fenol}}{[Fenol]} \right) + [H_2O_2] \left(1 + \frac{K_{Fenol}}{[Fenol]} \right)}$$

$$\frac{V_o}{V_{m\acute{a}x}} = \frac{[Fenol]}{K_{Fenol} \left(1 + \frac{K_{H_2O_2}}{[H_2O_2]} \right) + [Fenol]}$$

Las ecuaciones anteriores resultan en un modelo Michaelis-Menten, y las constantes de afinidad y velocidades máximas aparentes de los dos sustratos se definieron con las formas recíprocas de estas ecuaciones (Lineweaver-Burk) (Chávez *et al*, 1990).

Para el fenol se obtuvieron 5 velocidades máximas aparentes, a medida que $[H_2O_2]$ aumenta, la $V_{m\acute{a}x}$ ap del fenol aumenta, esto implica que la velocidad máxima del fenol depende de concentración de peróxido de hidrógeno. Con estos valores y con la aplicación de la gráfica secundaria de $1/V_{m\acute{a}x}$ ap en función de $1/[H_2O_2]$ se determinó el valor de $V_{m\acute{a}x}$ del fenol igual a $0,459 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$.

En el caso del peróxido de hidrógeno, se determinó un solo valor de $V_{m\acute{a}x}$ igual a $0,4768 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$, de modo que la velocidad máxima del peróxido no está limitada por la concentración del fenol.

En lo que respecta a las constantes de afinidad, para cada concentración de peróxido se registró un valor de K_{Fenol} ap, de igual manera para cada concentración de fenol existe un valor de $K_{H_2O_2}$ ap. En los dos casos a medida que aumentan las concentraciones de los sustratos, el valor de las constantes aparentes disminuye, lo que significa que la afinidad de la enzima por los sustratos aumenta.

El K_M es una constante de afinidad cuyo valor representa la concentración inicial de sustrato que da lugar a una velocidad inicial igual a la mitad de la velocidad máxima. En este contexto se puede señalar que la afinidad de una enzima por un sustrato tiene una relación inversa con el valor de K_M , por cuanto a mayor valor de K_M , más concentración de sustrato se requiere para alcanzar la mitad de $V_{m\acute{a}x}$ y viceversa.

Es decir que a mayor valor de K_M la enzima presenta una menor afinidad por el sustrato (Chávez *et al.*, 1990).

Con los valores de $K_{H_2O_2}$ ap y K_{Fenol} ap, se determina el valor de $K_{H_2O_2}$ ap y K_{Fenol} , mediante las gráficas secundarias $K_{H_2O_2}$ ap en función de $1/[Fenol]$ y $1/K_{Fenol}$ en función de $[H_2O_2]$. Para las peroxidasas de *Raphanus sativus var sativus*, las constantes de afinidad fueron $K_{H_2O_2}$ igual a 2,7576 mM y K_{Fenol} igual a 0,527 mM, los valores son relativamente altos en comparación con las constantes de las peroxidasas de otras fuentes vegetales.

Por ejemplo Şişecioglu *et al.* (2010), investigaron la cinética de la peroxidasa de rábano negro turco y determinaron que los valores de K_M para el guayacol (sustrato secundario) y el H_2O_2 son 0.036 ± 0.08 y 0.0084 ± 0.003 mM, respectivamente; en el caso de la peroxidasa de hojas de té, las constantes de afinidad para el ascorbato y el peróxido de hidrógeno fueron 470 μ M (en $[H_2O_2]$ 2mM) y 188 μ M (en [Ascorbato] 2 mM) correspondientemente (Kvaratskhelia *et al.*, 1997). Todos estos resultados reflejan la gran variabilidad que manifiestan las peroxidasas en relación a su afinidad por diferentes sustratos.

4.3.2. Porcentaje de remoción de fenoles a escala de laboratorio

La desfenolización enzimática se llevo a cabo por primera vez en 1980 por Klibanov *et al*, a partir de este año, las peroxidas han sido muy utilizadas en el tratamiento de aguas contaminadas con fenol. A continuación se mencionan algunos realizados: Rodríguez-López *et al.* (2002) empleó el extracto de alcachofa para descontaminar agua que contenían fenoles, aminas aromáticas, haluros orgánicos y/o metales pesados, y consiguió un 87% de eliminación de los compuestos fenólicos; Kennedy, Alemany y Warith (2002) removieron alrededor del 84% de 2,4-diclorofenol de una solución sintética, con peroxidasa de soja; y Mossallan *et al.* (2009), usaron la técnica enzimática para eliminar fenoles en aguas residuales de una refinería petrolera con alta cantidad de fenoles, removieron aproximadamente el 80% de los contaminantes.

La remoción de fenol fue estudiada a 5 diferentes concentraciones de peróxido, que varían entre 0,5 y 10 mM; mientras las concentraciones de fenol usadas fueron 0,5, 1, 2, 3, 4 mM.

Alrededor del 90%, fue el valor de porcentaje remoción máxima alcanzado, cuando la concentración inicial de fenol fue de 0,5 mM, y la concentración inicial de H₂O₂ fue de 5 mM. Este valor es comparable con el porcentaje de remoción obtenido en Iran, por Naghibi *et al.* (2003), quienes lograron eliminar más del 90% de fenol de agua sintética con [Fenol] 0,9 mM, realizaron experimentos con pedazos de raíz de *Raphanus sativus*, y con el extracto de la raíz, a [H₂O₂] 1 mM, en los dos casos el % de remoción fue similar.

El aumento de la concentración inicial de H₂O₂ provoca un aumento de la conversión de fenol hasta que se llega a un valor máximo (5 mM). Después de este punto, si la concentración inicial de H₂O₂ se incrementa más (10 mM), el porcentaje de remoción comienza a disminuir y la reacción tiene una velocidad inicial de reacción más lenta. La baja conversión de fenol a altas concentraciones de H₂O₂ puede ser atribuida a la inactivación de la enzima por exceso de sustrato (Arnao *et al.*, 1990 citado por Biswas, 1999; Hernández-Ruíz *et al.*, 2001).

La remoción de fenol es inversamente proporcional a la concentración inicial de fenol utilizada, es decir que a concentraciones mayores de fenol, disminuye el porcentaje de remoción del mismo. Este hecho parece indicar que estamos en presencia de la inactivación de la enzima, causada por la alta concentración de radicales libres formados durante la reacción (interacción de los radicales fenoxi con el centro activo de la enzima), por lo que la falta de peróxido no es el factor limitante de la conversión del fenol (Klibanov 1983 y Pramparo 2008). Conviene comentar que cuando la concentración del fenol es baja (0,5 mM) no se da una eliminación total del compuesto, se alcanza una remoción máxima del 90%, a pesar que el tiempo de reacción fue de 24 horas, por lo tanto el aumento del tiempo de reacción no provoca ninguna mejora en la conversión de fenol (Maloney, 1986).

4.3.3. Porcentaje de remoción de fenoles en efluentes de una empresa textilera

Las empresas textiles usan compuestos fenólicos principalmente para la tinción de telas, a pesar del alto consumo de fenol, la concentración de este compuesto en el agua residual de las empresas, no es muy significativa, a pesar que rebasa el límite permisible de descarga de efluentes establecido en el TULAS de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$.

En la empresa textilera TEXTIL ECUADOR S.A. la concentración de fenol en los efluentes fue de $0,340 \text{ mg.L}^{-1}$, siendo una concentración muy baja para la aplicación de del tratamiento enzimático. La falta de actividad peroxidásica a bajas concentraciones de fenol se puede atribuir a una deficiencia de sustrato secundario, justificada con el cálculo de la V_o :

$$\frac{V_o}{V_{m\acute{a}x}} = \frac{[Fenol]}{K_{Fenol} \left(1 + \frac{K_{H_2O_2}}{[H_2O_2]} \right) + [Fenol]}$$

$$\frac{V_o}{0,459 \text{ mM/min}} = \frac{[3,604 \times 10^{-3} \text{ mM}]}{0,527 \text{ mM} \left(1 + \frac{2,7576 \text{ mM}}{[5 \text{ mM}]} \right) + [3,604 \times 10^{-3} \text{ mM}]}$$

$$V_o = 2,014 \times 10^{-3} \text{ mM} \cdot \text{min}^{-1}$$

La V_o calculada es relativamente nula, por esta razón no ocurre la reacción de polimerización de fenoles.

En las pruebas preliminares para elegir las concentraciones de fenol con las que se va a trabajar, se realizó mediciones de AE con $[Fenol] 0,025 \text{ mM}$, a dicha concentración las peroxidasas del extracto purificado de *Raphanus sativus var sativus* no revelaron actividad peroxidásica, este resultado es una respaldo práctico de la deficiente actividad de las peroxidasas a bajas concentraciones de fenol.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

1. En la planta de *Raphanus sativus var sativus*, la mayor cantidad de enzimas con actividad peroxidásica se encuentra en la raíz.
2. La actividad enzimática del extracto de raíz de *Raphanus sativus var sativus* purificado con sulfato de amonio al 90% de saturación es de 4409,216 U.mL⁻¹, con un grado de purificación de 4,6 veces y un rendimiento del 81,405%.
3. A escala de laboratorio y, con agua sintética, el mejor tratamiento para remover fenoles, con peroxidasas de raíz de *Raphanus sativus var sativus*, se realiza con concentraciones de 0,5 mM de fenol y 5 mM de peróxido de hidrógeno.
4. Las peroxidasas de la raíz de *Raphanus sativus var sativus*, pueden remover hasta el 90% de fenol de una solución sintética de concentración 0,5 mM, aplicando una concentración de 5mM de peróxido de hidrógeno.
5. Los parámetros cinéticos de las peroxidasas de *Raphanus sativus var sativus* para el peróxido de hidrógeno son: la constante de afinidad ($K_{H_2O_2}$) es 2,7576 mM y la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) es 0,4768 mM.min⁻¹ y, para el fenol la constante de afinidad (K_{Fenol}) 0,527 mM y la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) es 0,459 mM.min⁻¹.
6. La eliminación de fenoles con peroxidasas de raíz de *Raphanus sativus var sativus* no es aplicable a bajas concentraciones de fenol, por lo que no se consiguió una remoción significativa de los fenoles presentes en el agua de la textilera TEXTIL ECUADOR S.A.
7. La polimerización enzimática, con peroxidasas de raíz de *Raphanus sativus var sativus*, puede ser usada como un método apropiado para la remoción de fenoles de agua residual con altas concentraciones de fenol.

CAPITULO 6

RECOMENDACIONES

1. Debido a la pérdida significativa de actividad enzimática y concentración de proteína durante el proceso de decoloración del extracto con carbón activado, es recomendable omitir dicho proceso y, realizar la purificación sin decoloración.
2. La 4-aminoantipirina es un compuesto fotosensible por lo se recomienda trabajar en un lugar con reducida iluminación.
3. A pesar que las peroxidasas de *Raphanus sativus var sativus*, presentaron una gran resistencia al tiempo de conservación, se recomienda que el tiempo de uso del extracto con actividad peroxidásica sea corto, debido a que otras proteínas presentes en el extracto se degradan y forman precipitados que aumentan la turbidez, siendo esta una interferencia en la determinación de la [P].
4. En el proceso de filtración de los polímeros de fenol, es recomendable usar papel filtro con el tamaño de poro más pequeño, para retener la totalidad de polímeros formados.
5. Para que la remoción de fenoles con peroxidasas de *Raphanus sativus var sativus*, sea más económico, se recomienda realizar una investigación empleando la pedazos de raíz de rábano directamente, es decir sin la preparación de un extracto enzimáticamente activo.

CAPITULO 7

BIBLIOGRAFIA

Aguayo, J. (2008). Tratamiento de aguas contaminadas por fenol mediante el proceso Fenton heterogéneo. Extraído el 12 de Enero, 2010, de <http://www.madrimasd.org/blogs/remtavares/2008/05/13/91674>.

Akkara, J., Ayyagari, M., Kaplan, D. (2002). Large-scale production polyphenols or polyaromatics amines using enzyme-mediated reactions. United States Patents. Patent No. 6,444,450 B2. Extraído el 26 de Enero, 2010, de <http://www.freepatentsonline.com/6444450.pdf>.

APHA AWA WPCF. (1989). Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. 17 edición. Díaz de Santos. España. pp. (5-56)-(5-63).

Arnao *et al.* 1990 citado por Biswas, K. (1999). Tesis: Removal of cresols from synthetic wastewater using crude soybean peroxidase. Universidad de Windsor. Ontario. Canada. pp9. Extraída el 28 de Noviembre, 2010, de http://www.collections.canada.gc.ca/obj/s4/f2/dsk1/tape8/PQDD_0026/MQ62187.pdf.

Atanor. (2010). Extraído el 2 de Noviembre, 2010, de http://www.atanor.com.ar/esp/negocios_domesticos/quimicos/productos/fenol.php.

Bandyopadhyay, U., Adak, S. y Banerjee R. (1999). Role of active site residues in peroxidase catalysis: studies on horseradish peroxidase. PINSA B65 No 5. pp. 315-330.

Battaner, E. (1993). Biomoléculas. Primera edición. Ediciones Universidad de Salamanca. España. pp. 264. Extraído el 12 de Enero, 2011, de http://books.google.com.ec/books?id=VW3n0WL5DF8C&pg=PA264&lpg=PA264&dq=ley+de+la+mbert+y+beer+%2B+proteinas+%2B+280nm&source=bl&ots=P_13DEI0ka&sig=H7vDvppxXWW7psQx53_W6tTMakU&hl=es&ei=SNdATZyeNcudgQfntZzBAw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=8&ved=0CEIQ6AEwBw#v=onepage&q&f=false.

Biswas, K. (1999). Tesis: Removal of cresols from synthetic wastewater using crude soybean peroxidase. Universidad de Windsor. Ontario. Canada. Extraída el 28 de Noviembre, 2010, de http://www.collectionscanada.gc.ca/obj/s4/f2/dsk1/tape8/PQDD_0026/MQ62187.pdf.

Bódalo, A., Gómez, J.L., Gómez, M., León, G., Hidalgo, A.M., y Ruíz M.A. (2007). Phenol removal from water by hybrid processes: study of the membrane process step. Desalination, Volumen 223, pp. 323-329. Resumen extraído el 7 de Noviembre, 2010, de la base de datos ScienceDirect.

Brenda. <http://www.brenda-enzymes.org/>

Carrión, X. (2004). Tesis: Ozonólisis para el control de fenoles en aguas servidas y en efluentes de pinturas industriales. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustrial. Escuela Politécnica Nacional. Ecuador.

Castro, U. (2009). Tesis: Phenol oxidation catalysed by polymersupported metal complexes. Departamento de Ingeniería Química. Univeritat Rovira I Virgili. Tarragona. España. Extraída el 4 de Abril, 2010, de http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_URV/AVAILABLE/TDX-1008109-132429//IC.pdf

Chaplin, M. (2004). Efecto del pH y fuerza iónica. Extraído el 29 de Enero, 2011, de <http://translate.google.com/translate?hl=es&langpair=en%7Ces&u=http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/ph.html>.

Chávez, M., Díaz, J., Pérez, U., Delfín, J. (1990). Temas de enzimología. Tomo I. pp. 41, 42, 249, 250.

Cho YK. y Bailey JE. (1979). Immobilization of enzymes on activated carbon: selection and preparation of the carbon support. Biotechnol Bioeng. 21(3). pp. 461-76. Resumen extraído el 26 de Enero, 2011, de la base de datos de PubMed.

Claude, C. (2001). Tesis: Enzyme Models of Chloroperoxidase and Catalase. Universidad Basel. pp 21. Extraída el 29 de Enero, 2011, de http://edoc.unibas.ch/47/1/DissB_6278.pdf.

Coello, B. (2010). Extracción y purificación de proteínas. Universidad Autónoma de Chiapas. Facultad de Ciencias Químicas. Tapachula-México. pp 18. Extraído el 28 de Enero, 2011, de <http://www.scribd.com/doc/36563917/Purificacion-y-Extraccion-de-Proteinas>.

Diaz, A., Rincón, N., Marín, C., Behling, E., Chacín, E. y Fernández, N. (2005). Degradación de fenoles totales durante el tratamiento biológico de aguas de producción petroleras. Venezuela. Extraído el 12 de Enero, 2011, de http://www2.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-20762005000300001&lng=es&nrm=iso

Duarte-Vázquez MA, Whitaker JR, Rojo-Domínguez A, García-Almendárez BE, Regalado C. (2003). Isolation and thermal characterization of an acidic isoperoxidase from turnip roots. J Agric Food Chem. 51(17). pp. 5096-102. Resumen extraído el 23 de Marzo, 2010, de la base de datos Refdoc.

Duarte-Vázquez, MA., García, B., Regalado, C., Rojo, A. (2008). Purificación de peroxidases vegetales: algunas características estructurales y especificidad por sustratos naturales. México. Extraído el 23 de Marzo, 2010, de http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_I/CI-2.pdf.

Duran, N., y Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. Applied Catalysis B: Environmental 28. pp. 83–99.

Ecopreneur. (2010). Ingeniería sanitaria y ambiental. Sistema de tratamientos y reuso de aguas y efluentes urbanos e industriales. Extraído el 18 de Abril, 2010, de http://www.ecopreneur.com.ar/es/pys_efi.php.

Eftaxias, A. (2002). Tesis: Catalytic Wet Air Oxidation of Phenol in a Trickle Bed Reactor: Kinetics and Reactor Modelling. Universidad Rovira I Virgili. Tarratoga. España. Extraída el 28 de Enero, 2010, de http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_URV/AVAILABLE/TDX-1103103-094925/EftaxiasThesis.pdf.

Evans, J. (1967). Peroxidases from the extreme dwarf tomato plant. Identification, isolation, and partial purification. Plant Physiology. 43. pp. 1037-1041.

Flock, C. (1998). Tesis: Bioremediation of phenols and chlorophenols with soybean peroxidase (SBP) and crude soybean seed hulls: modeling and experimental studies. The University of Western Ontario. Canada. Extraída el 17 de Enero, 2010, de http://www.collectionscanada.gc.ca/obj/s4/f2/dsk2/tape17/PQDD_0005/MQ30723.pdf.

Floris, G.; Medda, R. y Rinaldi, A. (1984). Peroxidase from Euphorbia characias latex: purification and properties. Phytochemistry. 23(5). pp. 953-956.

García, B., Duarte-Vázquez, MA., Regalado, C. (2003). Propiedades de la enzima indicadora del escaldado en el procesamiento de alimentos vegetales. Extraído el 3 de Marzo, 2010, de http://www.pncta.com.mx/pages/pncta_investigaciones_03h.asp?page=03e15.

Garrido, A., Teijón, JM., Blanco, D., Villaverde, C., Mendoza, C. y Ramírez, J. (2006). Fundamentos de bioquímica estructural. Segunda edición. Ediciones Tébar. Madrid. España. pp. 78. Extraído el 18 de Enero, 2011, de http://books.google.com.ec/books?id=avt8LFmp8q4C&pg=PA78&lpg=PA78&dq=salting+out+fundamento&source=bl&ots=Y2lVqjGfxv&sig=iFCkQV0IHuFugJskU0Xb1ZYARvc&hl=es&ei=6b5FTaukLoaKlweQ5Ogn&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=5&ved=0CC4Q6AEwBA#v=onepage&q&f=false.

Goodin, D.B. y Meree, D.E. (1993). The Asp-His-Fe triad of cytochrome c peroxidase controls the reduction potential, electronic structure, and coupling of the tryptophan free radical to the heme. Biochemistry 32(13). pp. 3313-3324.

Güngör, I. (2008). The effect of heavy metals on peroxidase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. African Journal of Biotechnology Vol. 7 (13), pp. 2248-2253.

Henriksen, A., Smith, A. y Gajhede, M. (1999). The Structures of the Horseradish Peroxidase C-Ferulic Acid Complex and the Ternary Complex with Cyanide Suggest How Peroxidases Oxidize Small Phenolic Substrates. The Journal of Biological Chemistry Vol. 274, No. 49. pp. 35005–35011.

Hernández-Ruíz, J., Arnao, MB, Hiner, A., Garcia-Canovas, F., y Acosta, M. (2001). Catalase-like activity of horseradish peroxidase : relationship to enzyme inactivation by H₂O₂. Biochem. J. 354. pp. 107 – 114.

Hiraga S., Sazaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H. (2001). A large Family of class III Plant Peroxidases. Plant Cell Physiol. 42. pp. 462-468.

INCHEM. Fenol. Extraído el 12 de Octubre, 2010, de <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc161.htm>.

Induambiente, Descontaminación industrial y residuos energéticos. Extraído el 5 de Mayo, 2009, de <http://www.induambiente.com/content/view/475/>.

Iniesta, J. (1999). Tesis: Oxidación electroquímica de metanol y fenol sobre electrodos de dióxido de plomo puro y dopado: aplicación al tratamiento electroquímico de aguas residuales. Universidad de Alicante. España. Extraída el 27 de Mayo, 2010, de <http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/3617/1/Iniesta%20Valc%C3%A1rcel,%20Jes%C3%BA.pdf>.

Jaramillo, J. (2004). Tesis: Descontaminación de fenoles en aguas residuales utilizando el haz de electrones acelerados. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustrial. Escuela Politécnica Nacional. Ecuador

Jouilia, H., Bouazizia, H., Rossignol M., Borderies G., Jamet, E., El Ferjani, E. (2008). Partial purification and characterization of a copper-induced anionic peroxidase of sunflower roots. Published in Plant Physiology and Biochemistry 46, 8-9. pp. 760-767.

Kadish, KM., Smith, K. y Guilard, R. (2000). The porphyrin handbook. Biochemistry and Binding: Activation of small molecules. Volumen 4. American Press. USA. pp. 97-103. Extraído el 15 de Enero. 2011, de http://books.google.com.ec/book?id=AjCCFytlFTgC&pg=PA97&lpg=PA97&dq=push+pull+%2B+peroxidase&source=bl&ots=KaltYfkG9&sig=f2Fbd9wK7yFcmOEzqH0MhJXcg4&hl=es&ei=fahETbGoHYScIgeHgaHDw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=8&ved=0CFoQ6AEwBw#v=onepage&q=push%20pull%20&f=false.

Kennedy, K., Alemany, K. y Warith, M. (2002). Optimisation of soybean peroxidase treatment of 2,4-dichlorophenol. ISSN 0378-4738 = Water SA Vol. 28 No. 2. pp. 149 – 158.

Klibanov A.M., Alberti B.N., Morris E.D., Felshin L.M. (1980). Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from wastewaters. J. Appl. Biochem. 2. pp. 414–421.

Klibanov A.M., Tsu-Ma Tu y Scott, K.. (1983). Peroxidase catalyzed removal of phenols from coal-conversion wastewaters. Science 221. pp. 259-261.

Kokkinakis, D. y Brooks, J. (1979). Tomato Peroxidase: purification, characterization, and catalytic properties. Plant Physiol. 63. pp. 93-99.

Kvaratskhelia, M., Winkel, C. y Thorneley, R. (1997). Purification and Characterization of a Novel Class III Peroxidase Isoenzyme from Tea Leaves. Plant Physiol. 114. pp. 1237-1 245.

Lapuente, R. (2000). Tesis: Estudio voltamétrico y espectroscópico de los polímeros creados por oxidación electroquímica de fenol sobre electrodos metálicos. Universidad de Alicante. Departamento de Física Química. Facultad de Ciencias. España. pp. 39. Extraída el 2 de Noviembre, 2010, de <http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/3660/1/Lapuente%20Arag%C3%B3,%20Roc%C3%ADo.pdf>.

Lee, C.Y. y Pennesi, A.P. (1984). Isolation and further characterization of a heat resistant peroxidase isoenzymes from cauliflower. J. Food Sci., 49(6). pp. 1616-1617.

Lee, C.Y., Pennesi, A.P. y Dickson, M.H. (1984). Characterization of the cauliflower peroxidase isoenzyme. J. Agric. Food Chem. 32. pp. 18-21.

Lenntech. (2009). Adsorción / Carbón activo. Extraído el 6 de Mayo, 2010, de <http://www.lenntech.es/adsorcion-carbon-activado.htm>

Linares, J. (2007). Tesis: Análisis mutacional del extremo c-terminal de la α -1,3-galactosiltransferasa bovina: estabilidad y catálisis. Universidad Ramon Llull. España. pp. 109. Extraída el 19 de Enero, 2011, de http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_URL/AVAILABLE/TDX-1003107_161528//Tesis_LinaresPasten.pdf

Lomeli, M. y Tamayo, R. (2009). Contaminación del agua. Extraído el 15 de Diciembre del 2010, de <http://www.sagan-gea.org/hojared/portada1.htm>.

Maloney W. (1986). Transformation of trace organic compounds in drinking water by enzymatic oxidative coupling. Environ. Sci. Technol. 20. pp. 249-253.

Márquez, M. (1997). Tesis: Purificación de peroxidases de rábano picante *Armoracia rusticana*. Universidad de la Habana. Cuba.

Mayr, J., *et al.* (2002). Guía ambiental para la formulación de planes de pretratamiento de efluentes industriales. Extraída el 15 de Enero, 2011, de <http://www.scribd.com/doc/13504539/Efluentes-industriales-1>.

McAllister K., Lee H. y Trevors J. (1996). Microbial degradation of pentachlorophenol. Biodegradation. Volumen 7. pp. 1-40.

Moss, G.P. (1992). Enzyme nomenclature. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Extraído el 11 de Enero, 2011, de <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>.

Mossallam, K., Sultanova, F. y Salimova, N. (2009). Enzymatic removal of phenol from produced water and the effect of petroleum oil content. Thirteenth International Water Technology Conference, IWTC 13, Hurghada, Egypt.

Naghibia, F., Pourmoradb, F., Honaryb, S. y Shamsib, M. (2003). Decontamination of Water Polluted with Phenol Using *Raphanus sativus* Root. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, Vol 2, No 1. pp. 29-32.

Nicell J.A., Bewtra J.K., Taylor K.E., Biswas N., St. Pierre C. (1992). Enzyme catalysed polymerisation and precipitation of aromatic compounds from wastewater. Wat. Sci. Technol. 25(3). pp. 157-164.

Nicell, J. A., Al-Kassim, L., Bewtra, J. K. and Taylor, K. E. (1993) Treatment of waste waters by enzyme catalyzed polymerization and precipitation. *Biodeterioration Abstracts*, 7(1). pp. 1-8.

North Carolina Department of Agriculture and Consumer Services. Food and Drug Protection Division. Extraído el 16 de Enero, 2011, de <http://www.ncagr.gov/fooddrug/espanol/documents/ComoSembrarVegetalesdeInvierno.pdf>.

Ochiai, E. (1985). Química Bioinorgánica. Editorial Reverte S.A. Barcelona. España. pp. 146, 147. Extraído el 23 de Enero, 2011, de <http://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=YQBQ0IE74SMC&oi=fnd&pg=PR5&dq=Ochiai,+E.+1985.+Qu%C3%ADmica+Bioinorg%C3%A1nica&ots=1SBa7fC9Vl&sig=bTCmdtOZ9GEZkFYJiRdZmk5qgIA#v=onepage&q&f=false>.

Ortega, M. (2001). Tesis: Eliminación de compuestos fenólicos mediante su polimerización catalizada por peróxidasa de nabo (*Brassica napus L. var Purple top White globe*). Universidad Autónoma de Querétano. México. Extraída el 22 de Diciembre, 2009, de http://www.pncta.com.mx/pages/pncta_investigaciones_01b.asp.

Oxfam. (2009). Extraído el 16 de Enero, 2010, de <http://fr.oxfamamerica.org/es/noticias/noticias/dia-del-agua-oxfam-internacional-llama-la-atencion-en-informe-sobre-la-escasez-y-contaminacion-del-agua-en-peru-ecuador-y-bolivia>.

Pardilla, J. (2007). Tesis: Síntesis y caracterización de polímeros conductores basados en anilinas sustituidas y su aplicación en electrocatálisis. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante. España. Extraída el 17 de Enero, 2010, de <http://www.luisvives.com/servlet/SirveObras/12257293308944839432091/028887.pdf>.

Pascual, M.R.; Pereda, C.M. y Pérez, R. (1983) citado por Márquez, M. (1997) en Purificación de peroxidasas de rábano picante *Armoracia rusticana*. Universidad de la Habana. Cuba.

Peroxidasebase. <http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>

Petunchi, J., Procesos de combustión para la eliminación de residuos peligrosos, Extraído el 22 de Diciembre, 2010, de <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd48/C1-305.pdf>

Pineda, M. (2008). Guía técnica para el cultivo de “rabanito” o “rabanito”. Extraído el 11 de Enero, 2011, de <http://www.cadenahortofruticola.org/biblioexp.php?opt=hortaliza&let=todos>.

Pramparo, L. (2008). Tesis: Study of a torus bioreactor for the enzymatic elimination of phenol. Universitat Rovira I Virgili. Extraída el 20 de Marzo, 2010, de <http://www.tdx.cat/TDX-1124108-100126>.

Programa desarrollo institucional ambiental y control de contaminación industrial. (PRODIA). (1999). Manual de inspectores: control de efluentes industriales. Buenos Aires. Argentina. Página 45. Extraído el 4 de Octubre, 2010, de <http://www.ambiente.gob.ar/?idarticulo=4189>.

Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas (IPCS), Extraído el 12 de Octubre, 2010, de http://training.itcilo.it/actrav_cdrom2/es/osh/ic/108952%20.htm.

Ramírez, C. (2002). Oxidación de fenoles con peróxido de hidrógeno y ozono. Extraído el 12 de Enero, 2011, de <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/mexico26/ii-114.pdf>.

Rodríguez, F. (2003), Síntesis, caracterización y actividad catalítica de nuevas formulaciones de catalizadores de cobre, níquel y zinc, estables en la reacción de oxidación de fenol y 2-clorofenol en fase acuosa con reactores trifásicos. Extraído el 29 de Noviembre, 2009, de http://www.tdr.cesca.es/TESIS_URV/AVAILABLE/TDX-0623106-135042//CTX1CAS.pdf.

Rodríguez, F. (2003). Procesos de potabilización del agua e influencia del tratamiento de ozonización. Ediciones Díaz de Santos S.A. Madrid – España. pp. 170 – 179. Extraído el 10 de Enero, 2011, de http://books.google.com.ec/books?id=xAvNbiXfFpcC&pg=PA170&lpg=PA170&dq=carbon+activado+%2B+apolar&source=bl&ots=NbIhd08TxV&sig=EccYDop1jn2JE6ScwvJmD_PUo8&hl=es&ei=tppATdLiOc7UgAfdoenXAg&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=3&ved=0CB0Q6AEwAg#v=onepage&q&f=false

Rodríguez-López, J.N., López-Molina, D., Tudela-Serrano, J.B. y García Cánovas, F. (2002). Enzima con actividad peroxidasa aislada de la alcachofa (*Cynara scolymus*, L.), procedimiento para su aislamiento y purificación y aplicaciones. Patente 2167278. España.

Rodríguez-López, Tudela-Serrano, J.B. y García Cánovas, F. (2002). Extracto de alcachofa (*Cynara scolymus*, L.) y su empleo en la descontaminación de medios contaminados con fenoles, aminas aromáticas, haluros orgánicos y/o metales pesados. Patente 2 167 277. España.

Rudrappa, T., Neelwarne, B., Kumar, V., Lakshmanan, V., Reddampalli, S., Gokare, R. (2005). Peroxidase production from hairy root cultures of red beet (*Beta vulgaris*). Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458. Volumen 8. No. 2. Extraída el 3 de Enero, 2011, de <http://www.scielo.cl/pdf/ejb/v8n2/a08.pdf>.

Ruíz, F. (1998). Tesis: Caracterización molecular de un nuevo tipo de peroxidasa ligninolítica. Universidad Complutense de Madrid. España. Extraída el 3 de Enero, 2011, de <http://eprints.ucm.es/tesis/19972000/X/3/X3066901.pdf>.

Sakharovl, I., Bautista, G., Sakharova, I., Rojas A. y Pletjuschkina O. (1999). Peroxidasas tropicales. Revista colombiana de química, Volumen 28, No, 1, pp. 97-106.

Samuelson, L. (2008). Enzymatic polymerization. United States Patent. Patent No. 7.332.297. Extraído el 9 de Septiembre, 2010, de <http://www.google.com.ec/patents?hl=es&lr=&vid=USPATAPP10324736&id=dJyaAAAAEBAJ&oi=fnd&dq=Enzymatic+Polymerization+Patents+%2B+pdf&printsec=abstract#v=onepage&q=&f=false>.

Sánchez, L. (2009). Tesis: Caracterización químico-física de la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*), una enzima con elevada estabilidad. Universidad de Salamanca. Facultad de ciencias químicas. Departamento de química-física. pp. 28. Extraída el 17 de Enero, 2010, de http://gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/76561/1/DQFI_Sanchez_ZamoranoL_PeroxidasadePalmaReal.pdf.

Sánchez, M., López, P. (2008). Biosensores amperométricos de tirosinasa para la determinación de compuestos fenólicos en medios acuosos y no acuosos. pp. 5. Extraído el 27 de Noviembre, 2010, de <http://eprints.ucm.es/8131/1/T30542.pdf>.

Santiago, R., Fontaniella, B., Vicente, C. (2009). Guión de prácticas de la asignatura Fisiopatología Vegetal. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3). pp. 146-166. Extraído el 7 de Enero, 2010, de <http://darwin.bio.ucm.es/revistas/index.php/reduca-biologia/article/viewFile/27/70>

Savides, C. (1983). Extraction of phenols from aqueous solutions. Extraído el 2 de Diciembre, 2010, de <http://www.freepatentsonline.com/4420643.pdf>.

Scholis, MJ. (2008). Tesis: Estudio del efecto de una atmósfera ozonificada sobre la actividad peroxidásica, cantidad de ácido ascórbico y algunas propiedades físicas de las hojas de un vegetal. Facultad de Ingeniería Química Agroindustria. Escuela Politécnica Nacional. Ecuador. pp. 18.

Scopes, R. (1987). citado por Márquez, M. (1997) en Purificación de peroxidadas de rábano picante *Armoracia rusticana*. Universidad de la Habana. Cuba.

Shannon, L.M.; Kay, E.; Lew, J.Y. (1966). Peroxidase isozymes from horseradish roots. Catalytic properties. The journal of biological chemistry. Vol. 242, No. 10. pp. 2471-2473.

Shannon, L.M.; Kay, E.; Lew, J.Y. (1966). Peroxidase isozymes from horseradish roots. Isolation and physical properties. The journal of biological chemistry. Vol. 241, No. 9. pp 2166-2172.

Silva, M. (2000). Preconcentración selectiva de fenoles contaminantes prioritarios y determinación por espectrofotometría ultravioleta-visible, cromatografía líquida de alta eficacia y cromatografía de gases-espectrometría de masas. Universidad Complutense de Madrid. España. pp. 2. Extraída el 13 de Enero, 2010, de <http://eprints.ucm.es/tesis/19972000/X/0/X0053101.pdf>

Şişecioğlu et al. (2010). Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus L.*). Journal of Medicinal Plants Research Vol. 4(12). pp. 1187-1196.

Stanisavljević M. y Nedić L. (2004). Removal of phenol from industrial wastewaters by horseradish (*Cochlearia armoracia l*) peroxidase. FACTA UNIVERSITATIS Series: Working and Living Environmental Protection Vol. 2. No 4. pp. 345 – 349

Sun, D., Cai, X., Xing, W. y Lu, T. (2004). Direct Electrochemical Reaction of Horseradish Peroxidase Immobilized on the Surface of Active Carbon Powders. Chinese Chemical Letters Volumen 15. No. 4. pp 453-454. Extraído el 8 de Enero, 2011, de <http://www.imm.ac.cn/journal/ccl/1504/150424-453-03-0229-p2.pdf>.

Tabatabaei Yazdi, M., Khaleghparast, S. y Rafati, H. (2000). Purification and partial characterization of two peroxidases from cultivated black radish (*Raphanus maritimus sm.*) root. Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran . Volume: 11, No.: 1. pp. 11-18.

Tarragó, JR., Faloci, MM., Luna, CV., Sansberro, PA., Mroginski, LA. (2003). Determinación de enzimas peroxidasas en tejidos caulinares de *Ilex dumosa R.* e *Ilex*

paraguariensis St. Hil. Universidad Nacional del Nordeste. Extraído el 24 de Marzo, 2010, de <http://www1.unne.edu.ar/cyt/2003/comunicaciones/05-Agrarias/A-042.pdf>.

Thornton, T., Savage, P. (1992). Kinetics of phenol oxidation in supercritical water. Extraído el 28 de Diciembre, 2010, de http://deepblue.lib.umich.edu/bitstream/2027.42/37422/1/690380302_ftp.pdf

Tinitus. (2010). Toxicología del Fenol. Extraído el 5 de Febrero, 2010, de http://www.salutia.com.ar/Sitio_Pac/Toxicologia/Toxicologia_es_phs115.htm.

Veitch, N. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* 65(3). pp. 249-259.

Villalobos D. A. y Buchanan I.D. (2002). Removal of aqueous phenol by *Arthromyces ramosus* peroxidase. *J. Environ. Eng. Sci.* 1. pp. 65-73

Villegas-Rosas, M., Geissler, G., Handal-Silva, A. y González-Vergara, E. (2003). Inmovilización de una peroxidasa de Chayote (*Sechium edule* (Jacq)Sw) y su potencial aplicación en la remoción de sustancias fenólicas de aguas contaminadas. Universidad Autónoma de Puebla. México. *Rev.Int. Contam.Ambien.* 19 (2). pp. 73-81.

Wariishi, H. y Gold, M.H. (1990) Lignin peroxidase compound III. Mechanism of formation and decomposition. *J. Biol. Chem.* 265, 2070-2077.

Welinder, K. (1992). Haem peroxidases. Extraído 10 de Enero, 2010, de <http://metallo.scripps>.

Winter, E.Z. (1969). Citado por Lee,C.Y.; Pennesi, A.P. y Dickson, M.H. (1984) en Characterization of the cauliflower peroxidase isoenzymes. *J. Agric. Food Chem.*, 32. pp. 18-21.

Yamamoto, H.Y.; Steinberg, M.P. Y Nelson, A.I. (1962). Citado por Lee, C.Y.; Pennesi, A.P. y Dickson, M.H. (1984) en Characterization of the cauliflower peroxidase isoenzymes. *J. Agric. Food Chem.*, 32. pp. 18-21.

Anexo A

Tablas de los límites permisibles de descarga de efluentes al sistema de alcantarillado, a un cuerpo de agua (dulce y salada).

TABLA 11. Límites de descarga al sistema de alcantarillado público

Parámetros	Expresado como	Unidad	Límite máximo permisible
Aceites y grasas	Sustancias solubles en hexano	mg.L ⁻¹	100
Alquil mercurio		mg.L ⁻¹	No detectable
Ácidos o bases que puedan causar contaminación, sustancias explosivas o inflamables.		mg.L ⁻¹	Cero
Aluminio	Al	mg.L ⁻¹	5,0
Arsénico total	As	mg.L ⁻¹	0,1
Bario	Ba	mg.L ⁻¹	5,0
Cadmio	Cd	mg.L ⁻¹	0,02
Carbonatos	CO ₃ ⁼	mg.L ⁻¹	0,1
Caudal máximo		L.s ⁻¹	1,5 veces el caudal promedio horario del sistema de alcantarillado
Cianuro total	CN ⁻	mg.L ⁻¹	1,0
Cobalto total	Co	mg.L ⁻¹	0,5
Cobre	Cu	mg.L ⁻¹	1,0
Cloroformo	Extracto carbón cloroformo (ECC)	mg.L ⁻¹	0,1
Cloro Activo	Cl	mg.L ⁻¹	0,5
Cromo Hexavalente	Cr ⁶⁺	mg.L ⁻¹	0,5
Compuestos fenólicos	Expresado como fenol	mg.L ⁻¹	0,2
Demanda Bioquímica de Oxígeno (5 días)	DBO ₅	mg.L ⁻¹	250
Demanda Química de Oxígeno	DQO	mg.L ⁻¹	500
Dicloroetileno	Dicloroetileno	mg.L ⁻¹	1,0
Fósforo Total	P	mg.L ⁻¹	15
Hierro total	Fe	mg.L ⁻¹	25,0
Hidrocarburos Totales de Petróleo	TPH	mg.L ⁻¹	20
Manganeso total	Mn	mg.L ⁻¹	10,0
Materia Flotante	Visible	mg.L ⁻¹	Ausencia
Mercurio (total)	Hg	mg.L ⁻¹	0,01
Níquel	Ni	mg.L ⁻¹	2,0
Nitrógeno Total Kjeldahl	N	mg.L ⁻¹	40
Plata	Ag	mg.L ⁻¹	0,5
Plomo	Pb	mg.L ⁻¹	0,5
Potencial de hidrógeno	pH		5-9
Sólidos Sedimentables		mL.L ⁻¹	20
Sólidos Suspendidos Totales		mg.L ⁻¹	220
Sólidos Totales		mg.L ⁻¹	1600
Selenio	Se	mg.L ⁻¹	0,5
Sulfatos	SO ₄ ⁼	mg.L ⁻¹	400
Sulfuros	S ⁼	mg.L ⁻¹	1,0
Temperatura	°C		< 40
Tensoactivos	Sustancias activas al azul de metileno	mg.L ⁻¹	2,0
Tricloroetileno	Tricloroetileno	mg.L ⁻¹	1,0
Tetracloruro de carbono	Tetracloruro de Carbono	mg.L ⁻¹	1,0
Sulfuro de carbono	Sulfuro de carbono	mg.L ⁻¹	1,0
Compuestos organoclorados (totales)	Concentración de organoclorados totales.	mg.L ⁻¹	0,05
Organofosfatados y carbamatos (totales)	Concentración de organofosforados y carbamatos totales.	mg.L ⁻¹	0,1
Vanadio	V	mg.L ⁻¹	5,0
Zinc	Zn	mg.L ⁻¹	10

TABLA 12. Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce

Parámetros	Expresado como	Unidad	Límite máximo permisible
Aceites y grasas	Sustancias solubles en hexano	mg.L ⁻¹	0,3
Alquil mercurio		mg.L ⁻¹	No detectable
Aldehídos		mg.L ⁻¹	2,0
Aluminio	Al	mg.L ⁻¹	5,0
Arsénico total	As	mg.L ⁻¹	0,1
Bario	Ba	mg.L ⁻¹	2,0
Boro Total	B	mg.L ⁻¹	2,0
Cadmio	Cd	mg.L ⁻¹	0,02
Cianuro total	CN ⁻	mg.L ⁻¹	0,1
Cloro Activo	Cl	mg.L ⁻¹	0,5
Cloroformo	Extracto carbón cloroformo (ECC)	mg.L ⁻¹	0,1
Cloruros	Cl ⁻	mg.L ⁻¹	1000
Cobre	Cu	mg.L ⁻¹	1,0
Cobalto	Co	mg.L ⁻¹	0,5
Coliformes fecales	Nmp/100mL		⁸ Remoción >al 99,9%
Color real	Color real	Unidades de color	*Inapreciable en dilución:1/20
Compuestos fenólicos	Fenol	mg.L ⁻¹	0,2
Cromo Hexavalente	Cr ⁺⁶	mg.L ⁻¹	0,5
Demanda Bioquímica de Oxígeno (5 días)	DBO ₅	mg.L ⁻¹	100
Demanda Química de Oxígeno	DQO	mg.L ⁻¹	250
Dicloroetileno	Dicloroetileno	mg.L ⁻¹	1,0
Estaño	Sn	mg.L ⁻¹	5,0
Fluoruros	F ⁻	mg.L ⁻¹	5,0
Fósforo Total	P	mg.L ⁻¹	10
Hierro total	Fe	mg.L ⁻¹	10,0
Hidrocarburos Totales de Petróleo	TPH	mg.L ⁻¹	20,0
Manganeso total	Mn	mg.L ⁻¹	2,0
Materia Flotante	Visible	mg.L ⁻¹	Ausencia
Mercurio (total)	Hg	mg.L ⁻¹	0,005
Níquel	Ni	mg.L ⁻¹	2,0
Nitratos + Nitritos	Expresado como nitrógeno (N)	mg.L ⁻¹	10,0
Nitrógeno Total Kjeldahi	N	mg.L ⁻¹	15
Organoclorados totales	Concentración de organoclorados totales.	mg.L ⁻¹	0,005
Organofosforados totales	Concentración de organofosforados totales.	mg.L ⁻¹	0,1
Plata	Ag	mg.L ⁻¹	0,1
Plomo	Pb	mg.L ⁻¹	0,2
Potencial de hidrógeno	pH	mg.L ⁻¹	5-9
Selenio	Se	mg.L ⁻¹	0,1
Sólidos sedimentables		mL.L ⁻¹	1,0
Sólidos suspendidos totales		mg.L ⁻¹	100
Sólidos totales		mg.L ⁻¹	1600
Sulfatos	SO ₄ ⁼	mg.L ⁻¹	1000
Sulfitos	SO ₃ ⁼	mg.L ⁻¹	2,0
Sulfuros	S ⁻	mg.L ⁻¹	0,5
Temperatura	°C		< 35
Tensoactivos	Sustancias activas al azul de metileno	mg.L ⁻¹	0,5
Tetracloruro de carbono	Tetracloruro de Carbono	mg.L ⁻¹	1,0
Tricloroetileno	Tricloroetileno	mg.L ⁻¹	1,0
Vanadio	V	mg.L ⁻¹	5,0
Zinc	Zn	mg.L ⁻¹	5,0

*La apreciación del color se estima sobre 10 cm de muestra diluída

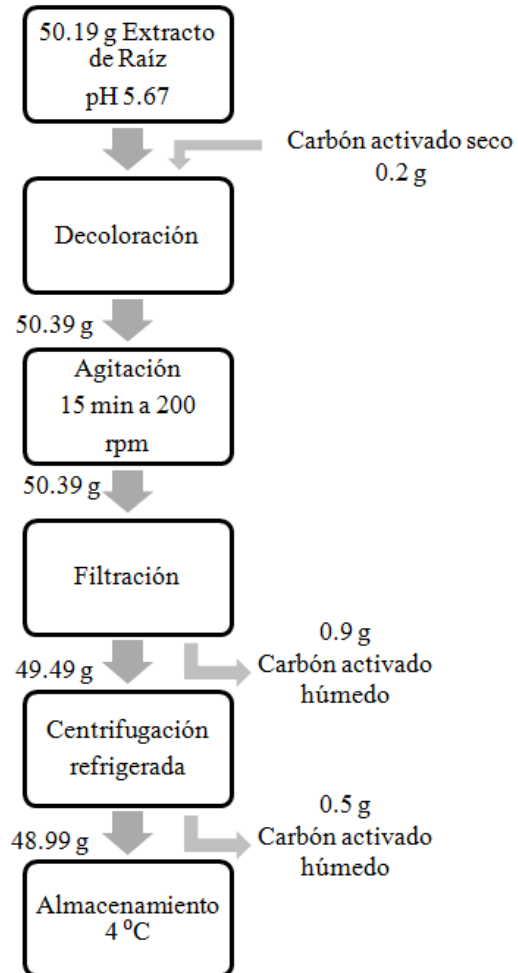
TABLA 13. Límites de descarga a un cuerpo de agua marina

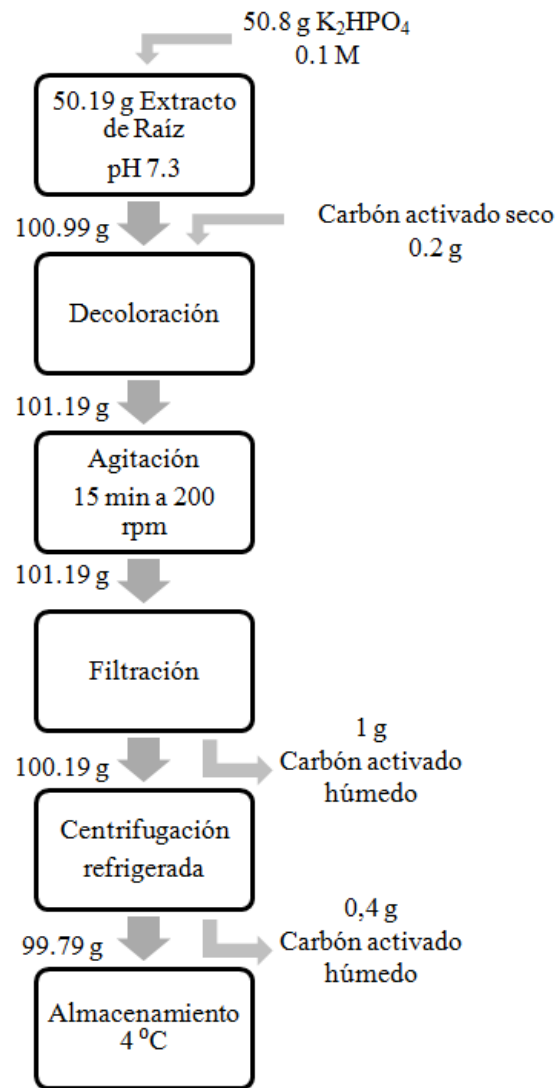
Parámetros	Expresado como	Unidad	Límite máximo permisible
Aceites y grasas		mg.L ⁻¹	0,3
Arsénico total	As	mg.L ⁻¹	0,5
Alquil mercurio		mg.L ⁻¹	No detectable
Aluminio	Al	mg.L ⁻¹	5,0
Bario	Ba	mg.L ⁻¹	5,0
Cadmio	Cd	mg.L ⁻¹	0,2
Cianuro total	CN ⁻	mg.L ⁻¹	0,2
Cobre	Cu	mg.L ⁻¹	1,0
Cobalto	Co	mg.L ⁻¹	0,5
Coliformes fecales	Nmp/100mL		⁸ Remoción >al 99,9%
Color real	Color real	unidades de color	*Inapreciable en dilución:1/20
Cromo Hexavalente	Cr ⁺⁶	mg.L ⁻¹	0,5
Compuestos fenólicos	Expresado como Fenol	mg.L ⁻¹	0,2
Demanda Bioquímica de Oxígeno (5 días)	DBO ₅	mg.L ⁻¹	100
Demanda Química de Oxígeno	DQO	mg.L ⁻¹	250
Fósforo Total	P	mg.L ⁻¹	10
Fluoruros	F	mg.L ⁻¹	5,0
Hidrocarburos Totales de Petróleo	TPH	mg.L ⁻¹	20,0
Materia Flotante	Visible		Ausencia
Mercurio total	Hg	mg.L ⁻¹	0,01
Níquel	Ni	mg.L ⁻¹	2,0
Nitrógeno Total Kjeldahi	N	mg.L ⁻¹	40
Plata	Ag	mg.L ⁻¹	0,1
Plomo	Pb	mg.L ⁻¹	0,5
Potencial de hidrógeno	pH		6-9
Selenio	Se	mg.L ⁻¹	0,2
Sólidos suspendidos totales		mg.L ⁻¹	100
Sulfuros	S ⁻	mg.L ⁻¹	0,5
Organoclorados totales	Concentración de organoclorados totales.	mg.L ⁻¹	0,05
Organofosforados totales	Concentración de organofosforados totales.	mg.L ⁻¹	0,1
Carbamatos totales	Concentración de carbamatos totales	mg.L ⁻¹	0,25
Temperatura	°C		< 35
Tensoactivos	Sustancias activas al azul de metileno	mg.L ⁻¹	0,5
Zinc	Zn	mg.L ⁻¹	10

*La apreciación del color se estima sobre 10 cm de muestra diluída

Anexo B

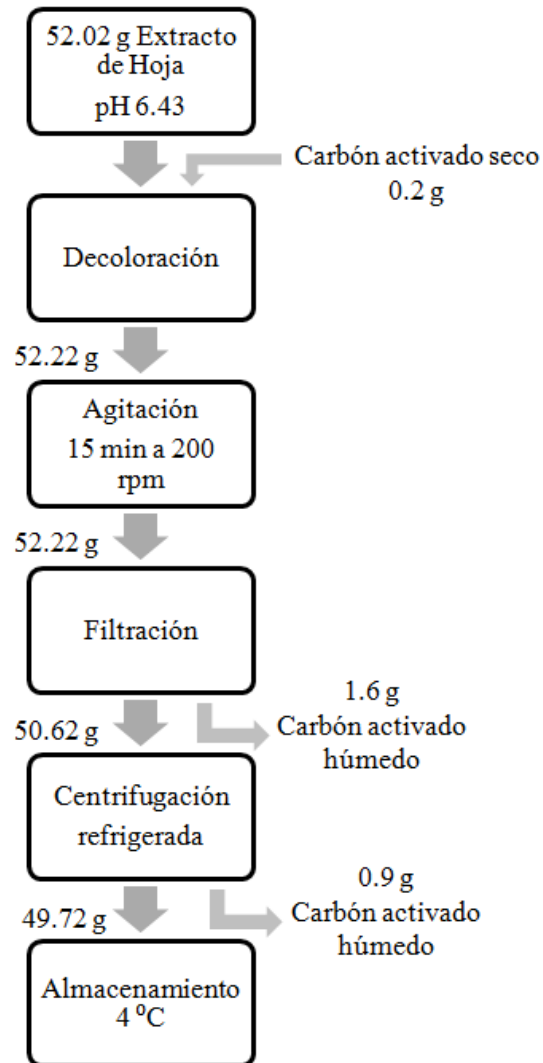
Balances de masa del proceso de decoloración del extracto de raíz de rábano

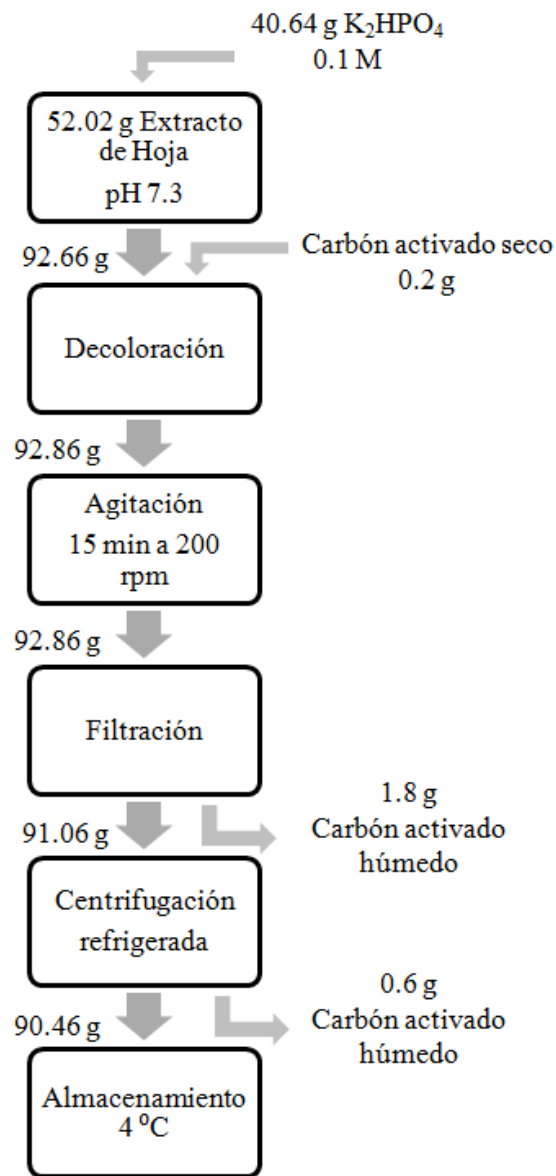




Anexo C

Balances de masa del proceso de decoloración del extracto de hoja de rábano.





Anexo D

Tabla de la concentración Final (% saturación a 0 °C) de solución de sulfato de amonio.

INIT %	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
g.mL ⁻¹ de solución																	
0	10.6	13.4	16.4	19.4	22.6	25.8	29.1	32.6	36.1	39.8	43.6	47.6	51.6	55.9	60.3	65.0	69.7
5	7.9	10.8	13.7	16.6	19.7	22.9	26.2	29.6	33.1	36.8	40.5	44.4	48.4	52.6	57.0	61.5	66.2
10	5.3	8.1	10.9	13.9	16.9	20.0	23.3	26.6	30.1	33.7	37.4	41.2	45.2	49.3	53.6	58.1	62.7
15	2.6	5.4	8.2	11.2	14.1	17.2	20.4	23.7	27.1	30.6	34.3	38.1	42.0	46.0	50.3	54.7	59.2
20	0	2.7	5.5	8.3	11.3	14.3	17.5	20.7	24.1	27.6	31.2	34.9	38.7	42.7	46.9	51.2	55.7
25		0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.6	17.9	21.1	24.5	28.0	31.7	35.5	39.5	43.6	47.8	52.2
30			0	2.8	5.6	8.6	11.7	14.8	18.1	21.4	24.9	28.5	32.3	36.2	40.2	44.5	48.8
35				0	2.9	5.7	8.7	11.8	15.1	18.4	21.8	25.8	29.6	32.9	36.9	41.0	45.3
40					0	2.9	5.8	8.9	12.0	15.3	18.7	22.2	26.3	29.6	33.5	37.6	41.8
45						0	3.0	5.9	9.0	12.3	15.6	19.0	22.6	26.3	30.2	34.2	38.3
50							0	3.0	6.0	9.2	12.5	15.9	19.4	23.5	26.8	30.8	34.8
55								0	3.1	6.1	9.3	12.7	16.1	20.1	23.5	27.3	31.2
60									0	3.1	6.2	9.5	12.9	16.8	20.1	23.9	27.9
65										0	3.2	6.3	9.7	13.2	16.8	20.5	24.4
70											0	3.2	6.5	9.9	13.4	17.1	20.9
75												0	3.3	6.6	10.1	13.7	17.4
80													0	3.4	6.7	10.3	13.9
85														0	3.4	6.8	10.5
90															0	3.4	7.0
95																0	3.5
100																	0

Anexo E

Resumen estadísticos de los ensayos de la cinética enzimática, para cada concentración de peróxido de hidrógeno y fenol.

0,5mM Peróxido					
Medida estadística	Fenol				
	0,5mM	1mM	2mM	3mM	4mM
Media (mM.min ⁻¹)	0,033	0,043	0,053	0,060	0,063
Desviación estándar (mM.min ⁻¹)	0,003	0,004	0,005	0,003	0,004
Cuenta	5	5	5	5	5
Límite mínimo (95%) (mM.min ⁻¹)	0,030	0,039	0,047	0,057	0,058
Límite máximo (95%) (mM.min ⁻¹)	0,036	0,048	0,059	0,063	0,069

1mM Peróxido					
Medida estadística	Fenol				
	0,5mM	1mM	2mM	3mM	4mM
Media (mM.min ⁻¹)	0,078	0,092	0,113	0,133	0,140
Desviación estándar (mM.min ⁻¹)	0,006	0,004	0,005	0,005	0,007
Cuenta	5	5	5	5	5
Límite mínimo (95%) (mM.min ⁻¹)	0,071	0,087	0,107	0,126	0,131
Límite máximo (95%) (mM.min ⁻¹)	0,085	0,098	0,119	0,139	0,149

2mM Peróxido					
Medida estadística	Fenol				
	0,5mM	1mM	2mM	3mM	4mM
Media (mM.min ⁻¹)	0,109	0,135	0,163	0,185	0,191
Desviación estándar (mM.min ⁻¹)	0,004	0,004	0,007	0,002	0,004
Cuenta	5	5	5	5	5
Límite mínimo (95%) (mM.min ⁻¹)	0,104	0,130	0,155	0,183	0,186
Límite máximo (95%) (mM.min ⁻¹)	0,114	0,139	0,171	0,187	0,197

5mM Peróxido					
Medida estadística	Fenol				
	0,5mM	1mM	2mM	3mM	4mM
Media (mM.min ⁻¹)	0,181	0,213	0,238	0,271	0,303
Desviación estándar (mM.min ⁻¹)	0,007	0,016	0,003	0,007	0,011
Cuenta	5	5	5	5	5
Límite mínimo (95%) (mM.min ⁻¹)	0,172	0,193	0,234	0,263	0,290
Límite máximo (95%) (mM.min ⁻¹)	0,191	0,233	0,243	0,279	0,316

10mM Peróxido

Medida estadística	Fenol				
	0,5mM	1mM	2mM	3mM	4mM
Media (mM.min ⁻¹)	0,179	0,214	0,236	0,256	0,281
Desviación estándar (mM.min ⁻¹)	0,011	0,015	0,007	0,004	0,004
Cuenta	5	5	5	5	5
Límite mínimo (95%) (mM.min ⁻¹)	0,165	0,196	0,226	0,251	0,276
Límite máximo (95%) (mM.min ⁻¹)	0,193	0,233	0,245	0,260	0,286

100mM Peróxido

Medida estadística	Fenol				
	0,5mM	1mM	2mM	3mM	4mM
Media (mM.min ⁻¹)	0,046	0,070	0,086	0,101	0,144
Desviación estándar (mM.min ⁻¹)	0,002	0,001	0,002	0,007	0,005
Cuenta	5	5	5	5	5
Límite mínimo (95%) (mM.min ⁻¹)	0,044	0,068	0,083	0,092	0,138
Límite máximo (95%) (mM.min ⁻¹)	0,048	0,071	0,089	0,109	0,149

0,5mM Fenol

Medida estadística	Peróxido				
	0,5mM	1mM	2mM	3mM	4mM
Media (mM.min ⁻¹)	0,033	0,078	0,109	0,181	0,179
Desviación estándar (mM.min ⁻¹)	0,003	0,006	0,004	0,007	0,011
Cuenta	5	5	5	5	5
Límite mínimo (95%) (mM.min ⁻¹)	0,030	0,071	0,104	0,172	0,165
Límite máximo (95%) (mM.min ⁻¹)	0,036	0,085	0,114	0,191	0,193

1mM Fenol

Medida estadística	Peróxido				
	0,5mM	1mM	2mM	3mM	4mM
Media (mM.min ⁻¹)	0,043	0,092	0,135	0,213	0,214
Desviación estándar (mM.min ⁻¹)	0,004	0,004	0,004	0,016	0,015
Cuenta	5	5	5	5	5
Límite mínimo (95%) (mM.min ⁻¹)	0,039	0,087	0,130	0,193	0,196
Límite máximo (95%) (mM.min ⁻¹)	0,048	0,098	0,139	0,233	0,233

2mM Fenol

Medida estadística	Peróxido				
	0,5mM	1mM	2mM	3mM	4mM
Media (mM.min ⁻¹)	0,053	0,113	0,163	0,238	0,236
Desviación estándar (mM.min ⁻¹)	0,005	0,005	0,007	0,003	0,007
Cuenta	5	5	5	5	5
Límite mínimo (95%) (mM.min ⁻¹)	0,047	0,107	0,155	0,234	0,226
Límite máximo (95%) (mM.min ⁻¹)	0,059	0,119	0,171	0,243	0,245

3mM Fenol

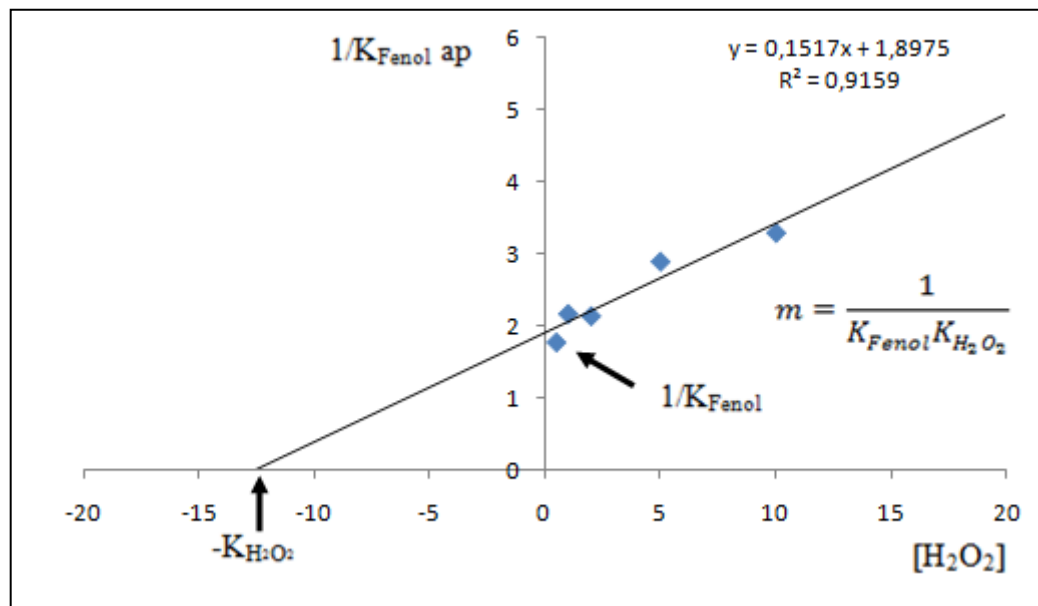
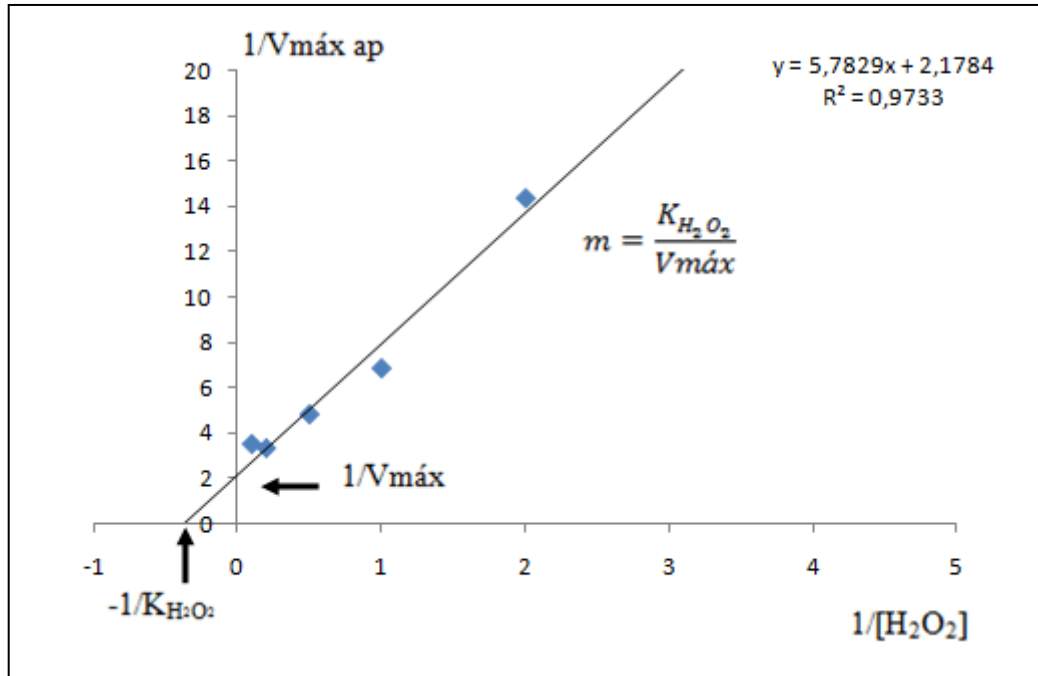
Medida estadística	Peróxido				
	0,5mM	1mM	2mM	3mM	4mM
Media (mM.min ⁻¹)	0,060	0,133	0,185	0,271	0,256
Desviación estándar (mM.min ⁻¹)	0,003	0,005	0,002	0,007	0,004
Cuenta	5	5	5	5	5
Límite mínimo (95%) (mM.min ⁻¹)	0,057	0,126	0,183	0,263	0,251
Límite máximo (95%) (mM.min ⁻¹)	0,063	0,139	0,187	0,279	0,260

4mM Fenol

Medida estadística	Peróxido				
	0,5mM	1mM	2mM	3mM	4mM
Media (mM.min ⁻¹)	0,063	0,140	0,191	0,303	0,281
Desviación estándar (mM.min ⁻¹)	0,004	0,007	0,004	0,011	0,004
Cuenta	5	5	5	5	5
Límite mínimo (95%) (mM.min ⁻¹)	0,058	0,131	0,186	0,290	0,276
Límite máximo (95%) (mM.min ⁻¹)	0,069	0,149	0,197	0,316	0,286

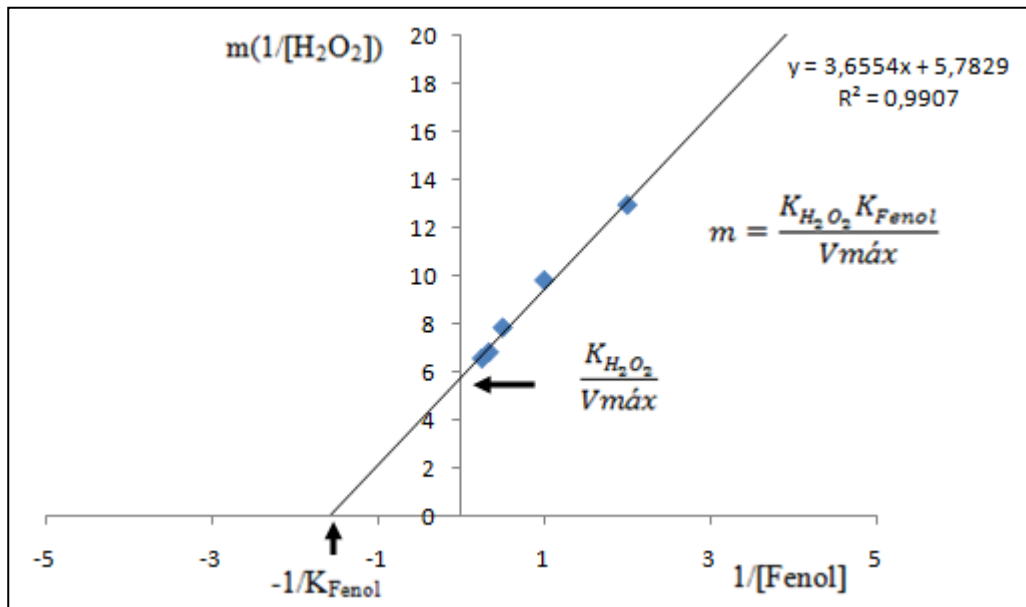
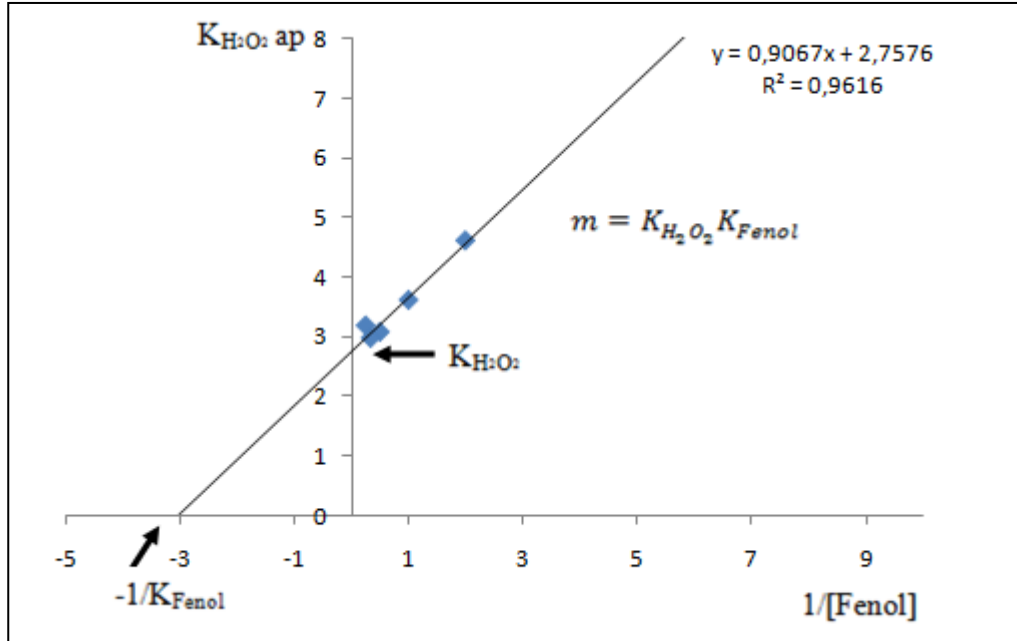
Anexo F

Gráficas secundarias para determinar la $V_{m\acute{a}x}$ y la K_{Fenol} .



Anexo G

Gráficas secundarias para determinar la $V_{m\acute{a}x}$ y la $K_{H_2O_2}$.



Anexo H

Valores de las 10 curvas de calibración de fenol.

Estándar	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Curva 7	Curva 8	Curva 9	Curva 10
	Abs (500nm)	Abs (500nm)	Abs (500nm)	Abs (500nm)	Abs (500nm)	Abs (500nm)	Abs (500nm)	Abs (500nm)	Abs (500nm)	Abs (500nm)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,1	0,022	0,014	0,018	0,024	0,013	0,025	0,017	0,015	0,013	0,014
0,2	0,04	0,031	0,039	0,041	0,03	0,038	0,029	0,037	0,031	0,03
0,3	0,059	0,049	0,052	0,055	0,046	0,059	0,046	0,05	0,053	0,048
0,4	0,078	0,077	0,067	0,075	0,07	0,071	0,066	0,067	0,062	0,063
0,5	0,092	0,088	0,084	0,096	0,082	0,082	0,08	0,082	0,081	0,093
1	0,171	0,158	0,159	0,165	0,15	0,157	0,173	0,161	0,161	0,152
2	0,347	0,354	0,303	0,333	0,307	0,332	0,301	0,316	0,351	0,355
3	0,513	0,506	0,493	0,536	0,499	0,542	0,493	0,488	0,473	0,491
4	0,627	0,681	0,659	0,667	0,674	0,701	0,65	0,705	0,686	0,626
5	0,837	0,832	0,823	0,832	0,892	0,827	0,839	0,818	0,815	0,856
Pendiente	0,1650	0,1682	0,1655	0,1668	0,1690	0,1678	0,1654	0,1672	0,1656	0,1663
Intersección	0,0034	0,0014	-0,0004	0,0033	-0,0028	0,0028	-0,0030	-0,0018	-0,0006	-0,0014
R²	0,9978	0,9982	0,9983	0,9985	0,9976	0,9974	0,9984	0,9975	0,9979	0,9975

Anexo I

Gráficas de control.

