



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA: BIOLOGÍA

LABORATORIO DE QUÍMICA VEGETAL Y BIOTRANSFORMACIONES

Inmovilización de peroxidasas del brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) para la biotransformación de fenol.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO

P R E S E N T A:
PATRICIA ALHELÍ JUÁREZ FLORES

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. F. LEONORA SÁNCHEZ Y GARCÍA-FIGUEROA

México Cd.Mx., a 15 de Marzo de 2016

PAPIME PE209015





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional
Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"
DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.

Comunico a usted que la alumna **JUÁREZ FLORES PATRICIA ALHELÍ**, con número de cuenta: **302097939**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **15 de marzo de 2016** a las **11:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dra. ESTHER MATIANA GARCÍA AMADOR

Esther M. García Amador

VOCAL Dra. FRANCISCA LEONORA SÁNCHEZ Y GARCÍA FIGUEROA

Francisca Leonora Sánchez y García Figueroa

SECRETARIO M. en C. CONSUELO BAUTISTA ARAGÓN

Consuelo Bautista Aragón

SUPLENTE BIOL. LETICIA LÓPEZ VICENTE

Leticia López Vicente

SUPLENTE BIOL. ANA LAURA MALDONADO TENA

Ana Laura Maldonado Tena

El título de la tesis que presenta es: **Inmovilización de Peroxidasas del Brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) para la Biotransformación de Fenol.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarlo.

ATENTAMENTE DE ESTUDIOS SUPERIORES
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D. F., a 21 de enero de 2016
AGDA
DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR
DIRECCIÓN



RECIBI
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VS 30
M. en C. ARMANDO CERCANTES SANDOVAL
JEFE DE CÁRTERA

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Química Vegetal y Biotransformaciones de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM bajo la dirección de la Dra. F. Leonora Sánchez y García –Figueroa y financiado por la DGAPA a través del proyecto PAPIME PE209015 y presentado en:

1st BIOTECHNOLOGY WORLD SYMPOSIUM

&

9º ENCUENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA DEL IPN

Atlihuetzia Tlaxcala, México.

13-16 de octubre de 2014

Bajo el título:

“Broccoli Peroxidase Immobilization (*Brassica oleracea* var. *Italica*) for Phenol Biotransformation”.



aniversario
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
1 9 7 6 - 2 0 1 6



AGRADECIMIENTOS



A mi madre *Laura Flores Ramírez*: éste es el fruto de todo el amor, esfuerzo, dedicación y empeño que tuviste para darnos una buena educación, calidad de vida y hacernos independientes; por estar conmigo en cada paso de mi vida y alentarme a seguir superándome y ser mi apoyo incondicional. Gracias por hacer de mí lo que soy; por prepararme para la vida, por convencerme de que lo que yo me proponga lo podré lograr.

A *Netzahualcoyotl Flores Ramírez “Moy”*: por ser mi padre y estar a mi lado en los momentos más importantes de mi vida, desde que comenzó hace veintitantos años hasta hoy que concluye una etapa importante de mi formación profesional, esta *palma* es tuya también pues es el reflejo de tu guía, apoyo incondicional, dedicación y cariño.

A mis hermanas *Laura, Yolo y Quetzal* y a mis tíos *Arturo, “Temo” y “Chalo”*, a mi tía *Soni* por estar conmigo en los momentos buenos y malos y por su apoyo constante muchas gracias.

A la Universidad Nacional Autónoma de México a la que orgullosamente pertenezco y agradezco mi formación académica desde la Escuela Nacional Preparatoria y hasta concluir mis estudios profesionales en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza en la Carrera de Biología.

A la *Dra. Leonora Sánchez y García Figueroa* por la oportunidad y confianza para realizar este proyecto, y por su paciencia, dedicación, guía y motivación brindada en cada etapa de este trabajo.

A mis sinodales:

Dra. Esther Matiana García Amador.

M. en C. Consuelo Bautista Aragón.

Biol. Leticia López Vicente.

Biol. Ana Laura Maldonado Tena.

Gracias por sus consejos y atinadas correcciones para el enriquecimiento de esta tesis.

A mis amigos, que conocí en mi paso por la facultad, con los que compartí momentos de alegría, estrés y compañerismo, y que sin importar si concluyeron o no la carrera el conocerlos dejó gratos recuerdos en mi memoria.

A mis compañeros del Laboratorio: *Antonio, Osvan, Adan, Luis, Frank, Gloria, Vicky, Karla, Eli y Mariana* por todos los momentos de diversión y distracción compartidos.

DEDICATORIA



A la memoria de

Don Diego Ramírez Jiménez y Doña Ma. Melita Birrichaga Flores

Gonzalo Flores Toledo y Guadalupe Ramírez Birrichaga

Flor de Nayeli Flores Ramírez

Mis bisabuelos que fueron un pilar importante en la vida de mi mamá, cuya educación se refleja en la manera que nos crío.

Mis abuelos y mi tía que fueron una parte fundamental en mi vida y la de mis hermanas. Gracias por el cariño, cuidado, valores inculcados y enseñanzas de vida que dejaron una huella en mí para ser mejor persona. En mis triunfos y en mis tropiezos siempre los he tenido presentes.

A mi mami *Laura* con todo mi amor y agradecimiento por ser mi inspiración y modelo a seguir, las palabras son pocas para agradecerte todo el amor, sacrificio, confianza y fe que siempre has tenido en mí, estoy muy orgullosa de ser tu hija y siempre me esforzare para que tú también estés orgullosa de mí.

A mi papa *Moy* con todo mi corazón, por la protección, amor y la entrega que recibí de su parte, me apoyaste y creíste en mí en todo momento, hiciste cuanto estuvo a tu alcance para ayudarme a hacer realidad mis metas y eso es algo que siempre tendré presente.

A mis hermanas *Laura, Yolotzin y Quetzalli* quienes son una parte fundamental de mi familia; por estar a mi lado, darme ánimos y ser mis compañera y cómplices en esta aventura, hemos pasado momentos buenos, malos y tristes y sé que tenemos nuestras diferencias y choques; pero son los recuerdos buenos y alegres los que nos acompañaran siempre a donde quiera que la vida nos lleve, las amos mucho.

A mis tíos *Cuauhtémoc Flores Ramírez “Temo” y Tonatiuh Flores Ramírez “Chalo”* con todo mi corazón por estar conmigo y con mi mamá en momentos decisivos de mi formación académica y personal muchas gracias.

A mi tía *Concepción Ramírez Birrichaga “Conchis”*, porque en los tiernos años de mi infancia, en la antigua casa de mis bisabuelos, entre los tesoros que descubrí, se encontraba su enciclopedia con muchas imágenes, que despertaron mi vocación para ser Bióloga. Gracias por todo el apoyo y afecto incondicional que nos has dado.

“... mis palabras no llevan el bombo de un orador, ni buscan el halago de otro, simplemente es la sencilla narración de mis estudios adquiridos. Que aún permanecen frescos en mi memoria. El tema en que me voy a referir en esta ocasión es...”

Lic. Andrés Flores Ordoñez

(Mi bisabuelo)

“... te voy a llevar a ir conocer una hermosa tierra que es la que te vio nacer, montañas veras y ríos también un hermoso cielo y un precioso amanecer, lo habrás de querer y luchar por él, debes defenderlo con la fuerza de tu ser, porque es tu país y lo quieren ver puesto de rodillas los que tienen el poder.

....

... me voy a estudiar, quiero comprender lo que me rodea y poder diferenciar, porque sin leer nunca aprenderé cuando las mentiras las disfrazan de verdad.”

Canción El chapulín.

Autor: José de Molina

ÍNDICE

Resumen.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Contaminación en México.....	3
2.2 Contaminación Hídrica.....	3
2.3 Fenol.....	3
2.4 Biorremediación.....	5
2.4.1 Biotransformación y Biorremediación Enzimática.....	5
2.5 Inmovilización de Enzimas.....	6
2.5.1 Físico.....	6
2.5.2 Químico.....	7
2.5.3 Importancia de la encapsulación de Enzimas.....	8
2.5.4 Alginato.....	10
2.5.5 Efecto de la concentración de Alginato de sodio y CaCl ₂ en la remoción de fenol.....	12
2.6 Peroxidasas Vegetales.....	13
2.6.1 Peroxidasas Vegetales en la Biorremediación de Agua Residual.....	14
2.7 Actividad Enzimática.....	15
2.8 Descripción de la especie <i>Brassica oleracea var. Italica</i>	16
III. JUSTIFICACIÓN.....	18
IV. HIPÓTESIS.....	18
V. OBJETIVOS.....	19
5.1 Objetivo General.....	19
5.2 Objetivos Particulares.....	19
VI. MATERIALES Y MÉTODO.....	20
6.1 Obtención de los Extractos Enzimáticos.....	20
6.2 Actividad Enzimática de los Extractos.....	20
6.3 Inmovilización en Alginato.....	20
6.4 Actividad Enzimática de las Cápsulas.....	21
6.5 Prueba de Biorremediación de Fenol.....	21
6.6 Cuantificación de Fenol con 4-AAP.....	21

VII.	RESULTADOS.....	23
	7.1 Actividad Enzimática de los Extractos Vegetales.....	23
	7.2 Actividad Enzimática de las Cápsulas.....	24
	7.3 Biorremediación de Agua Residual Sintética 0.2 g/L.....	24
	7.4 Biorremediación de Agua Residual Sintética 0.5 g/L.....	27
	7.5 Análisis Estadístico de la Remoción de Fenol con los 4 tipos de Cápsulas.....	30
	7.6 Biorremediación de Agua Residual Sintética 1,10 y 30 g/L.....	30
	7.7 Actividad Enzimática de las Cápsulas Almacenadas.....	32
VIII.	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	33
IX.	CONCLUSIONES.....	38
X.	RECOMENDACIONES.....	39
XI.	BIBLIOGRAFÍA.....	40
XII.	REFERENCIAS DE INTERNET.....	46
XIII.	ANEXOS.....	47

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Trabajos realizados con peroxidasas vegetales para la remoción de compuestos fenólicos.....	14
Cuadro 2	Actividad enzimática de las cápsulas.....	24
Cuadro 3	Porcentaje de biotransformación de 0.2 g/L de fenol.....	33
Cuadro 4	Porcentaje de biotransformación de 0.5 g/L de fenol.....	33
Cuadro 5	Gramos de fenol removidos en concentraciones de 1, 10 y 30 g/L.....	35

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1	Actividad enzimática del extracto buffer.....	23
Gráfica 2	Actividad enzimática del zumo de brócoli.....	23
Gráfica 3	Primer uso de las cápsulas con 0.2 g/L de fenol.....	24
Gráfica 4	Segundo uso de las cápsulas con 0.2 g/L de fenol.....	25
Gráfica 5	Tercer uso de las cápsulas con 0.2 g/L de fenol.....	25
Gráfica 6	Cuarto uso de las cápsulas con 0.2 g/L de fenol.....	26
Gráfica 7	Quinto uso de las cápsulas con 0.2 g/L de fenol.....	26
Gráfica 8	Primer uso de las cápsulas con 0.5 g/L de fenol.....	27
Gráfica 9	Segundo uso de las cápsulas con 0.5 g/L de fenol.....	28
Gráfica 10	Tercer uso de las cápsulas con 0.5 g/L de fenol.....	28
Gráfica 11	Cuarto uso de las cápsulas con 0.5 g/L de fenol.....	29
Gráfica 12	Quinto uso de las cápsulas con 0.5 g/L de fenol.....	29
Gráfica 13	Remoción de fenol con cápsulas “Zumo 0.2” en concentraciones de 1, 10 y 30 g/L.....	30
Gráfica 14	Actividad enzimática de las cápsulas almacenadas a 4°C.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura del fenol.....	4
Figura 2	Métodos de inmovilización enzimática.....	8
Figura 3	Modelo de la “caja de huevo” de la estructura del alginato.....	11
Figura 4	Reacción entre el guayacol y el H ₂ O ₂ y la peroxidasa.....	15
Figura 5	Cultivo del brócoli.....	17
Figura 6	Zumo de brócoli.....	22
Figura 7	Extracto con buffer de fosfatos.....	22
Figura 8	Actividad enzimática de los extractos.....	22
Figura 9	Cápsulas de extracto buffer y zumo de brócoli.....	22
Figura 10	Actividad enzimática de las cápsulas.....	22
Figura 11	Reacción entre la 4-AAP y el fenol.....	21
Figura 12	Cuantificación de fenol con 4-AAP antes de la biorremediación.....	31
Figura 13	Cuantificación de fenol con 4-AAP después de la biorremediación.....	31
Figura 14	Cápsulas almacenadas.....	32
Figura 15	Cápsulas vistas al microscopio.....	36

RESUMEN

El fenol es uno de los contaminantes más tóxicos y comunes que se encuentran en aguas residuales y uno de los más difíciles de remover, la NMX-AA-050-SCF-2001 establece que el nivel máximo de fenol en agua residual es de 0.5 mg/L. Las técnicas de biorremediación más utilizadas para su remoción son: biorreactores con bacterias, carbón activado y oxidación química (González y col, 2006).

Se ha encontrado que las peroxidasas vegetales son adecuadas para la remoción de fenol, la más utilizada es la peroxidasa de la raíz del rábano picante (HRP), sin embargo hay otros vegetales que también tienen potencial fitorremediador como el nabo, brócoli, soja, cáscara de rábano, vaina de haba etc.

En el presente trabajo se realizó un tratamiento de biorremediación enzimática por medio de peroxidasas obtenidas de desechos vegetales como el tallo de brócoli. Se utilizaron cuatro tipos de cápsulas enzimáticas elaboradas a partir del zumo del vegetal y de un extracto con buffer de fosfatos, se usaron dos concentraciones de CaCl_2 0.2 y 0.5M que probaron ser eficaces en la remoción de fenoles, las cápsulas elaboradas con zumo y CaCl_2 0.2M son las que tienen la cinética de remoción más rápida removiendo por completo las concentraciones de fenol 0.2 g/L en 4 h y 0.5 g/L en 8 h. Estas cápsulas también fueron empleadas en la remoción de 1, 10 y 30 g/L de fenol con resultados favorables.

I. INTRODUCCIÓN

En las aguas residuales de industrias químicas, farmacéuticas y papeleras entre otras, las concentraciones típicas de fenoles varían entre 35 y 400 mg/L, y en algunas refinerías mexicanas se producen 14 m³/día de agua residual y su concentración de fenoles es de 30,000 mg/L (Buitrón y col., 2007).

A pesar de las características tóxicas de los compuestos fenólicos, varias especies de microorganismos utilizan el fenol en condiciones aerobias como única fuente de carbono y de energía. Fialova y col. (2004) y Yang y col., (2005) reportaron que algunos microorganismos del género *Candida* tienen un potencial de degradación de fenol de hasta 1700 mg/L.

Sin embargo existen casos extremos, en aguas residuales petroquímicas los residuos como las sosas gastadas contienen concentraciones totales de fenoles de 30,000 a 50,000 mg/L (Olguín-Lora y Razo., 2004); con estas concentraciones tan elevadas se hace imposible la biorremediación por medio de microorganismos.

Se ha conseguido eliminar satisfactoriamente de un modelo de agua residual sintética una concentración de fenol y 4-clorofenol de 470 mg/L con extractos de peroxidasas de brócoli, estas enzimas forman polímeros de fenol con un alto peso molecular insolubles en medios acuosos, por lo que precipitan y pueden ser removidos (Domínguez, 2009). Las peroxidasas de nabo también han sido utilizadas para la polimerización de fenol en altas concentraciones 10,000 mg/L obteniendo resultados favorables (Arellano y col., 2012). En ambos experimentos se utiliza el extracto enzimático mezclado directamente con la solución de fenol por lo que no es posible reutilizar las enzimas. La inmovilización enzimática busca prolongar su vida útil y determinar la capacidad de remoción de fenol en usos posteriores.

En este trabajo se realizó la inmovilización de las peroxidasas de brócoli *Brassica oleracea* var. *italica* en alginato de calcio y se buscó la concentración más adecuada de cloruro de calcio y alginato de sodio para su mejor desempeño en la biotransformación de fenol en aguas contaminadas.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Contaminación en México

Las principales fuentes de contaminación en México son: actividades de minería, industria química, extracción y refinamiento de petróleo, desarrollo urbano y actividades agrícolas. Dentro de la Industria Química la producción de colorantes y la industria textil son consideradas como uno de los principales generadores de contaminantes de agua y desechos peligrosos debido a que en el proceso de fabricación incluye diversas etapas que provocan una seria contaminación al medio ambiente (INECC, 2014). Las descargas de agua residual sin tratamiento se mezclan sin control con efluentes naturales como ríos, lagos y lagunas, liberando sustancias que las bacterias son incapaces de eliminar provocando graves problemas de contaminación hídrica.

2.2 Contaminación hídrica

La contaminación hídrica se entiende como la acción de introducir algún material o sustancia en el agua que altere su composición; según la Organización Mundial de la Salud el agua está contaminada cuando: su composición se haya modificado de modo que no reúna las condiciones necesarias para el uso/consumo humano y animal. En nuestro país diariamente se producen miles de toneladas de desechos industriales, uno de los contaminantes más tóxicos y difícil de remover es el fenol.

2.3 Fenol

El fenol es un compuesto cristalino blanco o rosado altamente soluble en agua, tiene un olor característico alquitranado, daña la piel y es un veneno muy potente. Su uso principal es en la fabricación de resinas fenólicas por combinación con formaldehído y como intermediario en la fabricación de medicamentos, colorantes, hormonas vegetales y productos de limpieza. El fenol se produce también de manera natural, pues se encuentra en la lignina y como resultado de la descomposición de materia orgánica o de la degradación de pesticidas clorofenoxicarboxílicos y organofosforados (Michalowicz y Duda, 2006).

Dependiendo de la concentración el fenol tiene los siguientes efectos:

- ∞ A bajas concentraciones ($\leq 1\%$) tiene acción bacteriostática.
- ∞ A elevadas concentraciones es bactericida daña severamente la membrana celular. El tiempo de actuación oscila entre 15-20 minutos.

Los fenoles más comunes (fenol, 2-clorofenol, 2,4- diclorofenol, 2,4,5-triclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, pentaclorofenol y cresoles) están en la lista US EPA de contaminantes prioritarios (US EPA 2004).

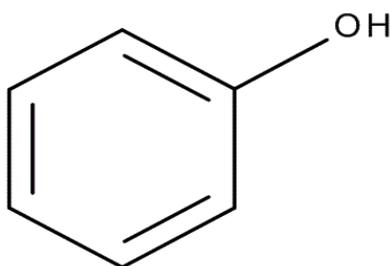


Figura 1. Estructura del fenol

Los compuestos fenólicos son contaminantes que aparecen en los efluentes de numerosas industrias: plantas de carbón, plásticos, resinas, pinturas, industrias papeleras, textiles, farmacéuticas entre otras. Su presencia es perjudicial, tanto para el medio ambiente, como para la salud humana, al tratarse de sustancias tóxicas y corrosivas difíciles de degradar. Debido a su amplio uso, el fenol es considerado un contaminante común de las aguas residuales domésticas, industriales y agrícolas (ATSDR, 1998). Una característica importante del fenol es la reactividad que presenta con el cloro. En el proceso de cloración para la desinfección de agua se pueden producir (si el agua contiene fenol o un derivado de éste) *clorofenoles*, ya que el cloro puede sustituir fácilmente a los átomos de hidrogeno del anillo aromático (Fig.1). Los compuestos fenólicos clorados, son los biocidas más poderosos, pero también, son los más tóxicos para la salud humana (Michalowicz y Duda, 2006).

2.4 Biorremediación

El término biorremediación implica el uso de cualquier operación unitaria o conjunto de ellas, que altere la composición de un contaminante peligroso a través de acciones biológicas que reduzcan su toxicidad, movilidad o volumen en la matriz o material contaminado. La biorremediación es una técnica que puede utilizarse como auxiliar en la descontaminación ya que emplea procesos naturales para eliminar las sustancias químicas perjudiciales para el ambiente (Luna y col., 2005).

En la biorremediación de fenoles el método más empleado es la biotransformación bacteriana con cepas de *Candida tropicalis* (García-Ochoa y Santos, 1998) pero cuando las concentraciones son altamente tóxicas y el tratamiento biológico es inviable, se aplican métodos como la adsorción en carbón activado, la oxidación química, la incineración, la extracción con solventes entre otras; aunque, presentan desventajas por ejemplo, el bajo rendimiento y la alta generación de productos que son aún más tóxicos que los fenoles originales (González y col., 2006 y Ramírez y col., 2002).

Actualmente se desarrollan métodos enzimáticos con peroxidasas vegetales para la remoción de este contaminante, por ejemplo Villegas y col., (2008) utilizan la peroxidasa del chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) para la remoción de fenol, Onder y col., (2011) utilizan la peroxidasa de la raíz del rábano picante (*Armoracia rusticana*) conocida como HRP para la degradación de colorantes ácidos y fenoles y Arellano (2012) utiliza peroxidasas de nabo (*Brassica napus*. L.) para la remoción de fenol.

2.4.1 Biotransformación y Biorremediación Enzimática

La biotransformación es un proceso mediante el cual un microorganismo o célula por medio de enzimas transforma un agente xenobiótico en otro de fácil remoción, las enzimas peroxidasas tienen la función de degradar la lignina pero también son capaces de biotransformar compuestos tóxicos por medio de la oxidación de compuestos aromáticos en polímeros de alto peso molecular (polimerización), estos polímeros generalmente son insolubles en medios acuosos por lo que precipitan y pueden ser removidos con facilidad del agua tratada. La enzima peroxidasa actúa sobre una

amplia variedad de sustratos y su uso en la biorremediación enzimática para el tratamiento de agua contaminada con fenol resulta muy prometedor (Harvey y Thurston, 2001, Bayramoğlu y Arica, 2008).

Las ventajas de este tipo de biorremediación son:

- ∞ La biotransformación no genera subproductos tóxicos.
- ∞ Las reacciones ocurren de manera controlada.
- ∞ No es necesaria la utilización del organismo completo.

El principal inconveniente de esta técnica es el alto costo para obtener las enzimas purificadas.

2.5. Inmovilización de enzimas

La inmovilización se puede definir como la fijación de los biocatalizadores (enzimas) a soportes sólidos insolubles que retienen su actividad catalítica y pueden ser reutilizadas en el tratamiento de biorremediación (Arroyo, 1998, Bayramoğlu y Arica, 2008). Existen dos métodos para la inmovilización de enzimas (Fig.2).

2.5.1 Físico

Atrapamiento o encapsulación: es la retención de la enzima en cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida por prepolímeros entrecruzables o polímeros de tipo poli(acrilamida), colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano. La solución enzimática a inmovilizar se mezcla con el monómero y se inicia la polimerización mediante el cambio de temperatura o la adición de un reactivo que forme la estructura porosa, con este método no hay alteración estructural de la enzima.

Microencapsulación: las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de sustratos y productos. Las microcápsulas tienen diámetros de 1 a 100 μm permitiendo encapsular enzimas, biomoléculas y células.

Reactores de membranas o inclusión: se emplean membranas permeables al producto final, permeables al sustrato y no permeables a la enzima. Mediante una bomba se establece un flujo líquido de sustrato que atraviesa al reactor. La enzima se inmoviliza previamente en la membrana (Arroyo, 1998).

2.5.2. Químico

Unión a soportes: es el método más utilizado y debe cumplir ciertas normas para emplearlo: alta interacción con el sustrato, disminuir la pérdida por adherencia al producto, pH estable, frenar el crecimiento microbiano, ser fácilmente recuperable para su reutilización, ser estables en solución y rígido mecánicamente en procesos de flujo continuo. Los soportes pueden ser inorgánicos naturales (arcilla, bentonita, piedra pómez) o inorgánicos manufacturados (óxido de metales, vidrios de tamaño de poro controlado, cerámicas) y orgánicos naturales (polisacáridos o proteínas fibrosas) o sintéticos (poliolefinas, polímeros acrílicos, poliamidas).

Dentro de este método se encuentran la:

☞ *Unión covalente:* es el método de inmovilización más utilizado en la industria. El procedimiento de inmovilización consiste en la activación de los grupos químicos del soporte, estos grupos activados reaccionan con los aminoácidos de la enzima mediante la formación de enlaces peptídicos, de arilación, de alquilación, de formación de enlace diazo, base de Schiff o de intercambio tiol-disulfuro. Los aminoácidos de las proteínas más empleados para la formación de enlaces con el soporte son lisina (Lys), cisteína (Cys), tirosina (Tyr) y triptófano (Trp).

Reticulado: también denominado entrecruzamiento o cross-linking. Utiliza reactivos bifuncionales (dialdehídos, diminoésteres, disocianatos, sales de diazonio) que originan uniones intermoleculares irreversibles entre las moléculas de enzima, insolubles en agua pero que no necesitan el uso de soportes adicionales. Son capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura.

El co-reticulado: es el entrecruzamiento de la enzima con proteínas sin actividad enzimática, ricas en Lys. Impide la pérdida de actividad por efectos de difusión del sustrato. Uno de los métodos más novedosos en entrecruzamiento consiste en la cristalización de enzimas y su posterior reticulado con glutaraldehído. La propia enzima actúa como su soporte. Estos cristales soportan altas temperaturas, pHs extremos y la acción de proteasas (Arroyo, 1998; Cedillo y col., 2014).

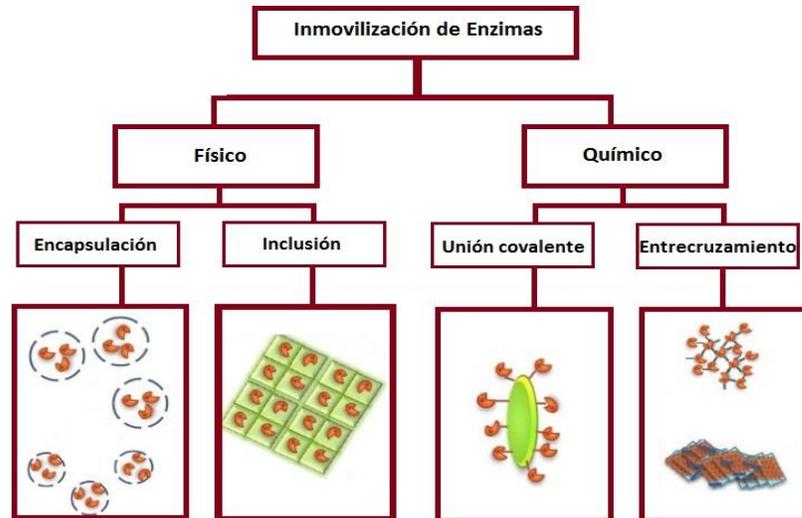


Figura 2. Métodos de inmovilización enzimática.

2.5.3 Importancia de la encapsulación de enzimas

La encapsulación es un proceso mediante el cual sustancias bioactivas se introducen en una matriz para impedir que se pierdan, para protegerlas de la reacción con otros compuestos, o para frenar reacciones de oxidación a causa de la luz o del oxígeno (Bastida y col., 1998). Con los avances en las técnicas de inmovilización, el uso de enzimas y células inmovilizadas va en aumento (Zhang y col., 2005). Se considera que una enzima es apropiada para una aplicación comercial, si su estabilidad es suficiente para dicha aplicación y el método de encapsulación permitirá este propósito.

La inclusión física en geles poliméricos o membranas previene el escape de la enzima y al mismo tiempo permite el paso del sustrato y el producto. Sin embargo, algunas de las desventajas son la disminución de la actividad debido a la pérdida de moléculas de

enzima a través de poros grandes, a la difícil circulación de sustratos de alto peso molecular y al incremento de producto dentro de la membrana (Zhang y col., 2005).

De acuerdo con Gianfreda y Bollag, (1994) para seleccionar el método adecuado de inmovilización enzimática se debe considerar:

- ∞ Simplicidad del método
- ∞ Bajo costo
- ∞ Aplicabilidad general a un gran número de enzimas
- ∞ Capacidad para ser realizado fácilmente a gran escala

Los principales cambios que presentan las enzimas inmovilizadas son:

- ∞ incremento en la estabilidad física, química y biológica frente a los agentes desnaturizantes debido a la prevención o minimización a los cambios conformacionales, y
- ∞ alteración del comportamiento catalítico causado por la naturaleza heterogénea de la catálisis asociada con una enzima estática. Estas propiedades son estrictamente dependientes de los mayores componentes del sistema de enzima inmovilizada (la enzima y el soporte) y su modo de asociación

Uno de los efectos involucrados en la alteración del comportamiento catalítico debido a la inmovilización enzimática es la reducción de la actividad, lo cual puede ser debido a un posible cambio conformacional que se presenta dentro de la estructura terciaria de la proteína después de la inmovilización. El efecto desnaturizante puede ser debido al mayor número de enlaces entre la enzima y el soporte y a la interferencia de los residuos hidrofílicos del soporte con los grupos hidrofóbicos de la proteína enzimática (Gianfreda y Bollag, 1994).

El enlace también puede involucrar grupos que son parte del sitio activo lo que puede limitar la penetración del sustrato dentro del sitio activo, especialmente cuando el sitio activo de la enzima se orienta hacia el soporte; en otras palabras, el sitio activo puede ser parcial o totalmente inaccesible al sustrato (Gianfreda y Bollag, 1994).

2.5.4 Alginato

El ácido algínico en su forma salina es un polímero biodegradable y biocompatible, que forma geles con facilidad en presencia de iones calcio. Este polímero, por su gran versatilidad, ha sido utilizado como estabilizador, aglutinante, espesante, gelificante y formador de películas delgadas sobre superficies. Los alginatos son una familia de polisacáridos lineales, conteniendo cantidades variables de ácido β -D-manurónico (M:1,4-enlace ácido β -D-manopiranosilurónico 4C1) y de ácido α -L-gulurónico (G: 1,4-enlace ácido α -L-gulopiranosilurónico 1C4). Su composición (dada por la relación característica manurónico/gulurónico M/G) y secuencias varían dependiendo de la fuente de la cual proviene el polisacárido. Este polímero debe su carácter polianiónico a los grupos carboxilo que aparecen a lo largo de la cadena (Hernández y col., 2005, Lupo y col., 2012).

La composición y extensión de las secuencias y el peso molecular determinan las propiedades físicas de los alginatos (Lupo y col., 2012). Éstos se agrupan o se distribuyen en secciones constituyendo homopolímeros tipo bloques G (-GGG-), bloques M (-MMM-) o heteropolímeros en los que los bloques M y G se alternan (MGMG-). Tanto la distribución de los monómeros en la cadena polimérica como la carga y volumen de los grupos carboxílicos, confieren al gel formado características de flexibilidad o rigidez dependiendo del contenido de gulurónico. Si en la estructura polimérica hay mayor cantidad de bloques G, generalmente el gel es duro y frágil, mientras que con la presencia de mayor proporción de bloques M, el gel formado se presenta suave y elástico. Los bloques de secuencias MM, MG, se encuentran unidos por enlaces glucosídicos β (1-4); y los bloques GG, GM, unidos por enlaces glucosídicos α (1-4) (Lupo y col., 2012).

Las sales del ácido algínico están formadas por tres bloques, M, G y MG. Cuando dos cadenas de bloque G se alinean, se forman sitios de coordinación. Debido a la forma de bucles de estas cadenas, existen cavidades entre ellas que tienen el tamaño adecuado para acomodar al ion calcio y además están revestidas con grupos carboxílicos y otros átomos de oxígeno electronegativos. Después de la adición de iones de calcio, el alginato sufre cambios conformacionales, dando lugar al modelo de gelificación del alginato conocido como “caja de huevo” (Fig.3). Esto se basa en la

dimerización de la cadena y, finalmente, en la mayor agregación de los dímeros. Se encontró que la fuerza de los geles de alginato depende del número de enlaces cruzados formados, del tipo de reticulación iónica, y de la longitud y la rigidez de los bloques entre los enlaces (Mancini y col., 1999). Lo anterior es importante, ya que los alginatos que presentan grandes regiones de bloques G forman un gel de fuerza alta y exhiben una alta porosidad. Los que presentan grandes bloques M forman un gel de fuerza media, pero con una alta resistencia a la sinéresis y exhiben poros más pequeños que los hacen más suaves (Hernández y col., 2005).

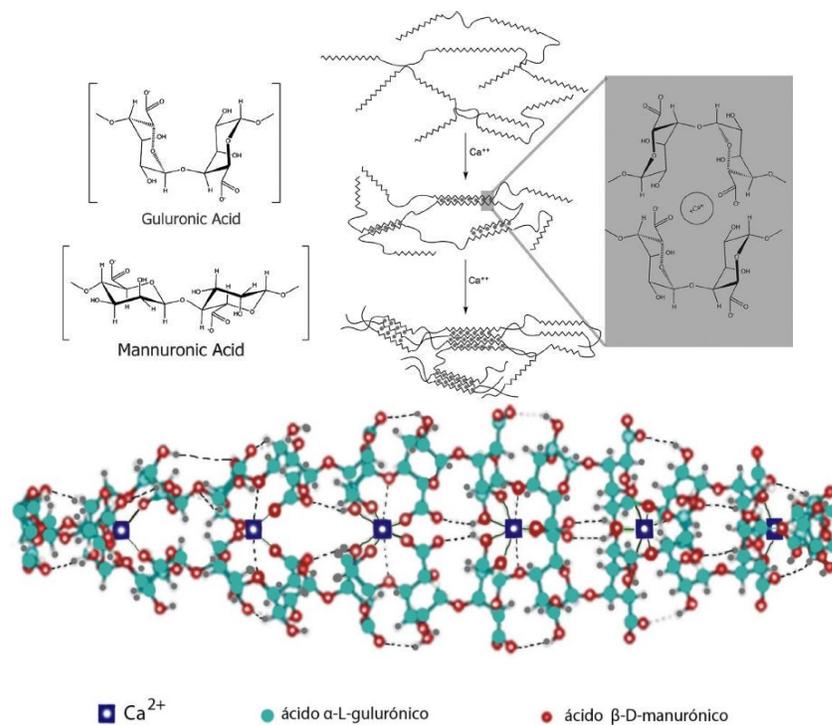


Figura 3. Modelo de la “caja de huevo” que describe la estructura del alginato. (Reddy y Reddy, 2010).

En cuanto a la capacidad gelificante de los alginatos, se sabe que la formación del gel se inicia a partir de una solución de sal de alginato y una fuente de calcio externa o interna, desde donde el ion calcio se difunde hasta alcanzar la cadena polimérica.

Como consecuencia de esta unión se produce un reordenamiento estructural en el espacio, resultando en un material sólido con las características de un gel. El grado de

gelificación depende de la hidratación del alginato, la concentración del ion calcio y la proporción de ácido gulurónico (Funami y col., 2009)

Los mecanismos de gelificación iónica se llevan a cabo fundamentalmente por dos procesos: la gelificación externa y la gelificación interna. El proceso de gelificación externa ocurre con la difusión del ion calcio hacia la solución de alginato de pH neutro. La formación del gel se inicia en la interfaz y avanza hacia el interior a medida que la superficie se encuentra saturada de iones calcio, de manera que el ion sodio proveniente de la sal de alginato es desplazado por el catión divalente solubilizado en agua. Este interacciona con los bloques G de diferentes moléculas poliméricas, enlazándolas entre sí. Aunque la fuente de calcio más usada ha sido el CaCl_2 , debido a su mayor porcentaje de calcio disponible, existen otras sales empleadas con menor frecuencia tales como el acetato monohidratado de calcio y el lactato de calcio. El proceso de gelificación interna consiste en la liberación controlada del ión calcio desde una fuente interna de sal de calcio insoluble o parcialmente soluble dispersa en la solución de alginato de sodio (Pasin y col., 2012).

2.5.5 Efecto de la concentración de alginato de sodio y CaCl_2 en la remoción de fenol.

Se ha demostrado que la estabilidad del gel depende de la composición química del alginato empleado y del catión Ca^{2+} utilizado; para evitar la disgregación del gel se requiere una concentración mínima del ion Ca^{2+} (0.003M CaCl_2) (González, 2009). En otros trabajos realizados en el Laboratorio de Química Vegetal y Biotransformaciones se evaluaron diferentes concentraciones de cloruro de calcio para la inmovilización de las peroxidasas y se encontró que las mejores concentraciones fueron 0.2 y 0.5M por lo que en este trabajo de tesis se utilizaron estas dos concentraciones de cloruro de calcio y dos tipos de extracto enzimático para encontrar las condiciones óptimas para la elaboración de cápsulas eficaces en la eliminación de fenol en fase acuosa.

En cuanto al alginato las concentraciones adecuadas para la elaboración de cápsulas deben ser de 0.75% a 1% y del CaCl_2 las concentraciones van del 2% al 5.5% (p/v), esto se debe a que el gel de alginato es el que se encarga de atrapar a la enzima y el cloruro de calcio es el que da la forma a la estructura de la cápsula, los iones de calcio

reemplazan al sodio en los extremos carboxílicos del alginato (ácido gulurónico) y forman la estructura de caja de huevos, atrapando a la enzima pero permitiendo a la vez el contacto con el fenol (Alemzadeh, 2009).

2.6 Peroxidasas Vegetales

Las peroxidasas vegetales con nomenclatura EC 1.11.1.7 son enzimas oxidorreductasa, que catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el peróxido de hidrógeno o un hidroperóxido orgánico como molécula aceptora de electrones. En plantas superiores participan en una gran variedad de procesos fisiológicos, a lo largo de todo el ciclo vital de la planta, desde el nacimiento a la senescencia, entre los que cabe citar crecimiento, desarrollo y endurecimiento de la pared celular, lignificación y suberización, catabolismo de auxina y defensa frente al estrés oxidativo y el ataque de patógenos.

Además de esta funcionalidad dentro de la planta, estas enzimas se utilizan ampliamente en la industria, algunas de sus funciones son: la síntesis de polímeros orgánicos como polianilina (PANI), decoloración de tintes sintéticos, descontaminación y limpieza de aguas residuales y suelos, síntesis de fármacos orgánicos con alto rendimiento, electrodos enzimáticos, kits de diagnóstico e inmunoensayos enzimáticos.

En todos estos procesos, la peroxidasa que se utiliza por excelencia es la peroxidasa de rábano picante (*Armoracia rusticana*), obtenida de sus raíces, además de la peroxidasa de soja (*Glycinemax*), que presenta una mayor estabilidad. (Rodríguez y col., 2002).

Se ha descubierto que las peroxidasas de brócoli son capaces de trabajar en un amplio rango de pH (pH 2 - pH 8) aunque registran mejor actividad a pH ácido (Domínguez, 2009). Estas enzimas han sido probadas con éxito en la degradación del colorante textil índigo carmín (Hernández, 2011) demostrando que el brócoli es una planta con potencial fitorremediador.

2.6.1 Peroxidasas vegetales en la biorremediación de agua residual

Se ha comprobado experimentalmente que las peroxidases vegetales polimerizan diversas concentraciones de fenoles, en el cuadro 1 se dan algunos ejemplos.

Cuadro 1. Trabajos realizados con peroxidases vegetales para la remoción de compuestos fenólicos

Autor	Vegetal	Compuesto	Remoción
Nicell y col., (1995)	22.3 U/mg ⁻¹ de peroxidases HRP inmovilizadas en alginato de calcio al 1%	140 mL de fenol 1500 mg/L con H ₂ O ₂ al 0.1mM	En 12 h de reacción remueve el 81.25% (1218.75 mg/L) de fenol.
Caza y col., (1999)	0.9 U/mg de peroxidasa de soja comercial Enzymol International Inc.	30 ml de fenol 1 mM (94 mg/L) 1.2 mM H ₂ O ₂	En 3 h de reacción remueve el 95% (89.3 mg/L) de fenol.
Villegas y col., (2003)	5 µL de peroxidasa de chayote inmovilizada en [<i>Sechium edule</i> (Jacq.) Sw] Alginato y PEG	25µL Fenol 1889 mg/L.	En 15 min de reacción remueve el 70% (1324.1 mg/L) de fenol.
Quintanilla-Guerrero y col., (2008a)	1.77 U/mg ⁻¹ de peroxidases de nabo (<i>Brassica napus</i> L. var. <i>esculenta</i> D.C.) inmovilizadas en alginato de calcio, adicionadas con 200 mg/L de PEG y (0.1-5 mM) de H ₂ O ₂	30 mL Fenol. 2-clorofenol, 3-clorofenol y 2,4 clorofenol; 0.5 mM y 1.4 mM	En 30 min de reacción remueve el 90% de 0.5 mM (42.3 mg/L) y el 90% de 1.4 mM (118.44 mg/L).
Alemzadeh y col., (2009)	7.5 U/g ⁻¹ de HRP inmovilizadas en alginato de calcio al 0.5, 0.75, 1 y 2% y H ₂ O ₂ 5%	100 ml Fenol 10 mM y 20 µL H ₂ O ₂	En 150 min de reacción remueve el 80% (752 mg/L) de fenol 10 mM (940 mg/L).
Arellano y col.,(2012)	50 µL de extracto crudo de nabo (<i>Brassica napus</i>)	25 µL Fenol	En 20 h de reacción remueve el 61% (5740.7 mg/L) de 9411 mg/L.
Deva y col., (2014)	5 U/ml ⁻¹ de peroxidasa de coliflor (<i>Brassica oleracea</i>) purificada y PEG.	30 ml Fenol (1-10 mM) y 1 mM H ₂ O ₂	En 3 h de reacción remueve: 1 mM (94 mg/L) el 93% 5 mM (470 mg/L) el 82% 10 mM(941 mg/L) el 73%

2.7 Actividad Enzimática

La peroxidasa es una hemoproteína (presenta como grupo prostético un grupo Hem) que cataliza la oxidación de compuestos dadores de hidrógeno, como ofenilendiamina (aminas aromáticas), guayacol y pirogalol (fenoles) por medio de peróxidos (de ahí el nombre peroxidasa). El guayacol es el substrato oxidable más usado para determinar la actividad de ésta enzima (Fig.4), dicho substrato es oxidado a un complejo coloreado de tetraguayacol (color rojo ladrillo) en presencia de peroxidasa, la velocidad de formación de coloración, es utilizada como medida de la actividad enzimática por lecturas espectrofotométricas de las absorbancias en relación con el tiempo (Santos de Araujo y col., 2006, Nicell y col., 1995).

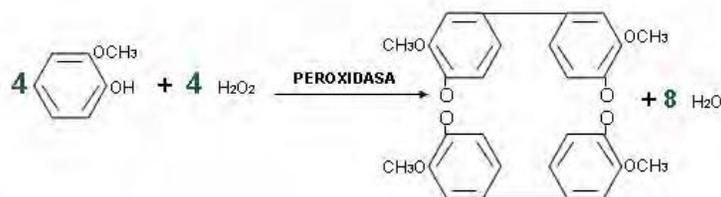


Figura 4. Ecuación de la reacción entre 4 moléculas de guayacol y 4 moléculas de peróxido de hidrógeno, de la catálisis de la peroxidasa se obtiene un producto de tetraguayacol y 8 moles de agua.

La actividad enzimática varía dependiendo del vegetal utilizado, del clima y suelo donde fue cultivado; la peroxidasa puede ser inactivada por el calor, pero es una de las que precisan mayor temperatura y más tiempo para su inactivación, además tiene la propiedad peculiar de la regeneración enzimática ya que al inactivarla por medio del calor recupera parcialmente su actividad después de un cierto tiempo. Esto se debe a que la fracción proteica de la enzima sufre una desnaturalización parcial con pérdida de su estructura terciaria, si el calor se aplica por cortos periodos de tiempo hay una reversión de la proteína a su estado normal por recombinación de sus grupos hidrógenos o sulfhidrilos (Bayramoğlu y col., 2008, Bódalo y col., 2008)

2.8 Descripción de la especie *Brassica oleracea* var. *italica*.

El brócoli (*B. oleracea* var. *italica*) es una planta anual, de la familia Brassicaceae, que se reproduce por semillas. Pertenecen a la familia de las crucíferas, que engloba a más de 300 géneros y unas 3.000 especies propias de regiones templadas o frías del hemisferio norte (Anthos, 2010).

En México los principales estados productores, en orden de importancia, son: Guanajuato (con más de 50 % de la superficie sembrada), Puebla y Michoacán; en estos estados se tienen una gran cantidad de empacadoras y congeladoras que permiten el envío a otros países de América, Europa y Asia. El brócoli es un cultivo que se desarrolla fundamentalmente durante las estaciones de otoño e invierno, para un desarrollo normal de la planta es necesario que las temperaturas durante la fase de crecimiento oscilen entre 20 y 24 grados centígrados (Fig.5). Prefiere suelos con tendencia a la acidez y no a la alcalinidad, un nivel óptimo de pH entre 6.5 y 7.0, requiere suelos de textura media, soporta la salinidad excesiva del suelo y del agua de riego (SAGARPA, 2011).

Estudios fitoquímicos indican altas concentraciones de sulforafano en el brócoli, la coliflor y otras verduras crucíferas, principalmente en los brotes. Este compuesto es un inhibidor de la histona desacetilasa, o enzimas HDAC, la inhibición de HDAC es uno de los campos más prometedores del tratamiento del cáncer (GHC., 2013).

En otros trabajos se reveló como principal compuesto la cianidina 3-O-diglucosido-5-O-glucosido mono o diacilada, dando lugar a los isómeros de cianidina 3-O-(acil) diglucosido-5-O-glucosido, cianidina 3-O-(acil1)(acil2) diglucosido-5-O-glucosido, y cianidina 3-O-(acil1)(acil2) diglucosido-5-O-(malonil) glucósido. El análisis de antocianinas se ha realizado por primera vez en brotes de brócoli y los resultados son favorables por lo que incluirlo en la dieta ayuda a controlar los niveles de colesterol (Moreno y col., 2010).



Figura 5. Cultivo de brócoli

III. JUSTIFICACIÓN

Las enzimas peroxidasas son útiles en la biotransformación de fenol, en trabajos previos se ha encontrado que el tallo de brócoli tiene potencial fitorremediador, sin embargo los extractos enzimáticos tienen la desventaja de mezclarse y desecharse con los productos, al ser solubles en agua no se pueden reutilizar.

Con la inmovilización en cápsulas de alginato de calcio se busca superar estos inconvenientes, permitiendo que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable.

IV. HIPÓTESIS

La inmovilización de peroxidasas en cápsulas de alginato puede mantener la actividad de la enzima y ser recuperadas después del proceso de biotransformación y por lo tanto se puedan reutilizar, de esta forma se logrará un mayor aprovechamiento del biocatalizador en la biorremediación de fenol.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General:

Extraer e inmovilizar las peroxidases de brócoli en cápsulas de alginato de calcio y evaluar la remoción de fenol en modelos de agua artificialmente contaminada.

5.2 Objetivos Particulares:

- ∞ Evaluar la capacidad de biorremediación de fenol con enzimas inmovilizadas en capsulas de alginato elaboradas con diferentes concentraciones de CaCl_2 (0.2M y 0.5M).
- ∞ Evaluar la capacidad de biorremediación de fenol de las cápsulas elaboradas con dos tipos de extractos enzimáticos (zumo y extracto con buffer de fosfatos).
- ∞ Determinar la capacidad de biotransformación de las cápsulas en diferentes concentraciones de fenol, mediante la cuantificación de fenol con 4-Amino antipirina.
- ∞ Determinar si es posible usar más de una vez las cápsulas y el porcentaje de polimerización en cada ciclo.

- ∞ Estabilidad y vida útil de la enzima en almacenamiento a 4°C.

VI. MATERIALES Y MÉTODO

La preparación de reactivos se muestra en el Anexo I.

6.1 Obtención de los extractos:

Extracto concentrado (zumo): procesar los tallos en un extractor de zumos y colar con una gasa para eliminar los restos del bagazo. Centrifugar a 3000 rpm por 15 min (Fig. 6).

Extracto con buffer de fosfatos: 35 g de material vegetal se licuan con 105 ml de solución buffer pH 6.1 por 3 min a velocidad alta, colar con una gasa y centrifugar a 3000 rpm por 15 min (Fig. 7) (Baltazar y Moreno, 2007).

6.2 Actividad enzimática de los extractos: En una celda adicionar 1mL de buffer de fosfato pH 6.1, 1 mL de agua destilada, 200 μ L de guayacol (1% en etanol), 200 μ L de H₂O₂ (0.5% en agua destilada), agitar manualmente, leer en el espectrofotómetro Génesis 10 UV a 600nm (tiempo cero t₀), adicionar 5 μ l del extracto enzimático (zumo o con buffer de fosfatos), leer la absorbancia cada 10 segundos durante 1 min (Fig. 8) (Baltazar y Moreno, 2007).

Determinación de la actividad enzimática:

$(\text{Abs } 2 - \text{Abs } 1) \times 2.85 / 5.2 \times 0.05 = \text{Actividad por gramo de planta (u/g)}$

Dónde:

Abs 2= Absorbancia al minuto.

Abs 1 = Absorbancia antes de añadir las enzimas.

5.2 = Coeficiente de extinción del tetrámero del guayacol.

0.05 = Cantidad de extracto enzimático.

6.3 Inmovilización en alginato al 1%: pesar 1 gr de alginato de sodio y diluirlo en 100 ml de agua destilada mantener en agitación constante hasta que la mezcla esta homogénea, añadir el extracto (zumo o buffer de fosfatos) y mezclar, hacer gotear en el baño de cloruro de calcio. Enjuagar las cápsulas con abundante agua y mantener húmedas en refrigeración hasta su uso (Fig. 9).

6.4 Actividad enzimática de las cápsulas: Pesar 1 g de cápsulas y triturarlas en un mortero recolectar el zumo obtenido y centrifugar a 3000 rpm por 5 min, tomar el sobrenadante para la determinación enzimática con guayacol (Fig. 10).

6.5 Prueba de biorremediación de fenol: En matraces de 50 ml colocar 5 g de cápsulas de enzimas y 15 ml de la solución de fenol (0.2, 0.5, 1, 10 o 30 g/L), mantener en agitación a 200 rpm y determinar la cantidad de fenoles cada 2 h.

6.6 Cuantificación de fenoles por medio de 4- Amino Antipirina (4-AAP): Tomar una alícuota de 40 μ L de fenol y agregar 2.52 ml de agua destilada, 15 μ L de buffer de amonio pH 10, 15 μ L de solución acuosa de ferricianuro de potasio, agitar y anotar la primera lectura (blanco) en el espectrofotómetro Génesis 10 UV a 510 nm; adicionar 15 μ L de solución 4-AAP, agitar, esperar 15 minutos y tomar la lectura en el espectro (Fig. 11).

Para el porcentaje de biotransformación se utiliza la siguiente fórmula:

$$\% \text{ biotransformación} = ((\text{Abs1} - \text{Abs2}) / \text{Abs1}) * 100$$

Donde:

Abs1= absorbancia del tiempo 0 (mayor concentración de fenol).

Abs2= absorbancias posteriores.

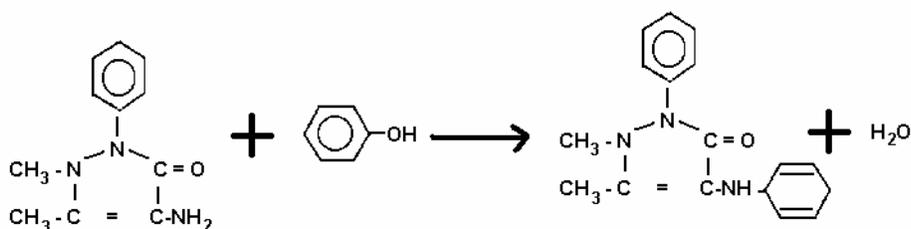


Figura 11. Ecuación de la reacción entre 4-aminoantipirina y fenol



Figura 6. Zumo de brócoli



Figura 7. Extracto con buffer de fosfatos



Figura 8. Actividad enzimática, las celdas de color claro corresponden al extracto buffer y las rojizas al zumo.

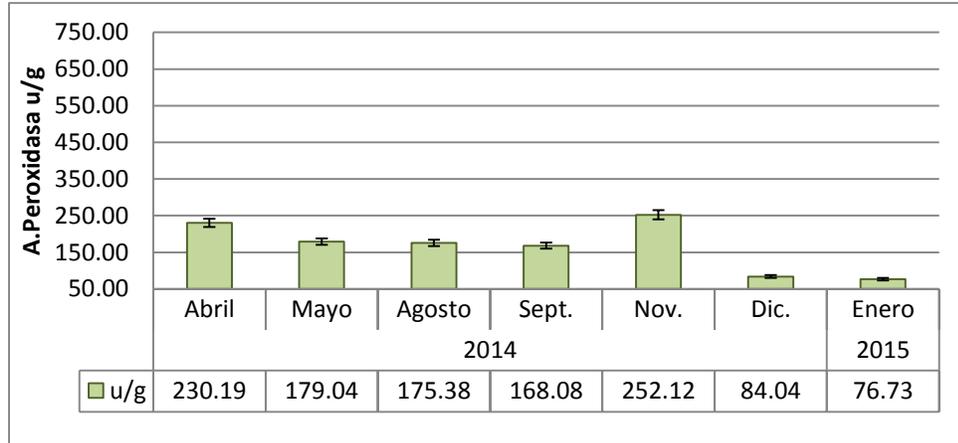


Figuras 9 y 10. Actividad enzimática, la celda naranja corresponde a las cápsulas de zumo (arriba) y la celda clara a las de extracto buffer (abajo).

VII. RESULTADOS

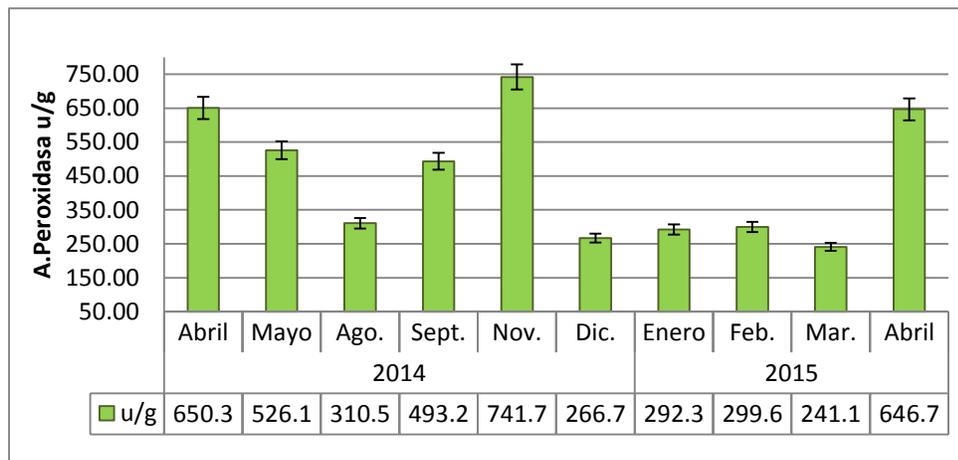
7.1 Actividad enzimática de los extractos vegetales.

En la gráfica 1 se muestra la actividad enzimática del extracto buffer de fosfatos de abril de 2014 a enero de 2015. La actividad enzimática fue mayor en los meses de abril y noviembre y en diciembre 2014 y enero 2015 la más baja.



Gráfica 1. Actividad enzimática de la peroxidasa de brócoli (extracto con buffer de fosfatos pH 6) la actividad de la enzima se presenta en u/g.

En la gráfica 2 se muestra la actividad enzimática del zumo de brócoli de abril 2014 – abril 2015. La mayor actividad enzimática se presenta en los meses de abril y noviembre, y la más baja de diciembre 2014 a marzo 2015.



Gráfica 2. Actividad enzimática de la peroxidasa de brócoli (zumo) la actividad de la enzima se presenta en u/g.

7.2 Actividad enzimática de las cápsulas.

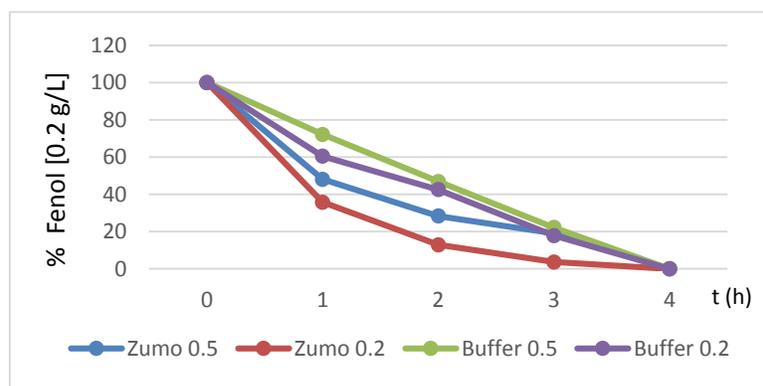
En el cuadro se muestra la actividad peroxidasa de los extractos y de las cápsulas elaboradas para pruebas de biorremediación con dos concentraciones de CaCl_2 y dos extractos enzimáticos antes de la cinética de remoción de fenol.

Cuadro 2. Actividad enzimática del extracto antes de la inmovilización y después de la elaboración de las cápsulas.

Cápsulas con extracto buffer			Cápsulas con zumo		
Actividad extracto u/g	Cápsulas 100 g	CaCl_2	Actividad zumo u/g	Cápsulas 100 g	CaCl_2
438.2	241.2	0.2M	657.64	274.04	0.2M
438.2	208.3	0.5M	679.60	328.84	0.2M
			675.15	317.885	0.2M
Contenido de extracto en las cápsulas					
5 g de cápsulas	Extracto buffer mL	5 g de cápsulas	Zumo mL		
	2		1.87		

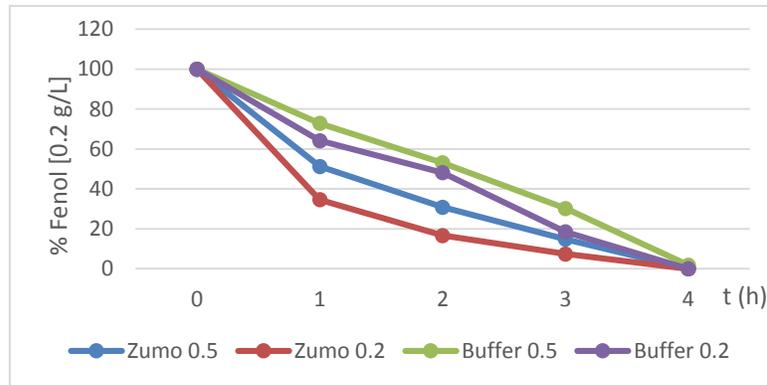
7.3 Biorremediación de agua residual sintética con 0.2 g/L de fenol y cápsulas de zumo de brócoli y de extracto buffer con 0.2M y 0.5M CaCl_2 .

Las concentraciones de fenol en aguas residuales municipales van de 35 a 400 mg/L, incluyen las descargas domésticas e industriales en su flujo hacia las plantas de tratamiento (Buitrón, 2007). En la gráfica 3 se muestran los resultados del primer uso de las cápsulas, se observa que las elaboradas con zumo son las que tienen la cinética más rápida y de ellas las de 0.2M CaCl_2 logran el 100 % de polimerización en 3 h.



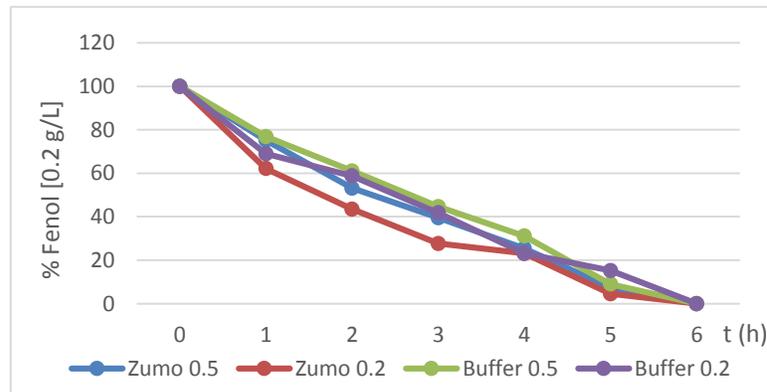
Gráfica 3. Remoción de fenol (0.2 g/L) con cápsulas de extracto buffer de fosfatos y zumo de brócoli en concentración de 0.2M y 0.5M de CaCl_2

En la gráfica 4 se observa que en el segundo uso de las cápsulas, las elaboradas con zumo siguen teniendo la cinética más rápida y a las 4 h la remoción de fenol es 100%.



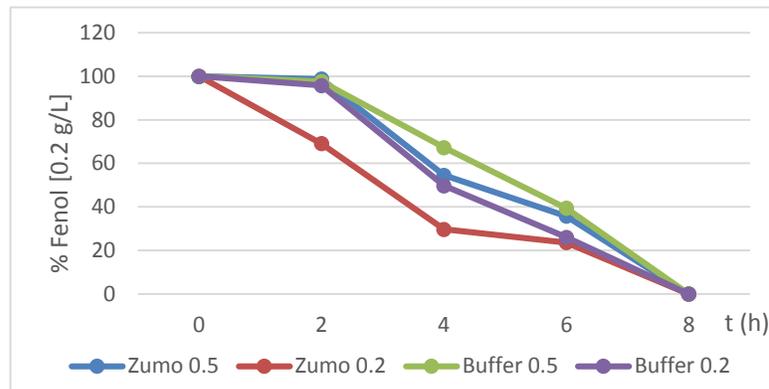
Gráfica 4. Remoción de fenol [0.2 g/L] segundo uso de los cuatro tipos de cápsulas conservadas húmedas a 4°C por 17 h.

En la gráfica 5 se observa que en el tercer uso las cápsulas las de zumo 0.5M, Buffer 0.2M y 0.5 M de CaCl_2 realizan la cinética de remoción de fenol al 100% casi en el mismo tiempo 6 h y las cápsulas de zumo 0.2M CaCl_2 en 5 h.



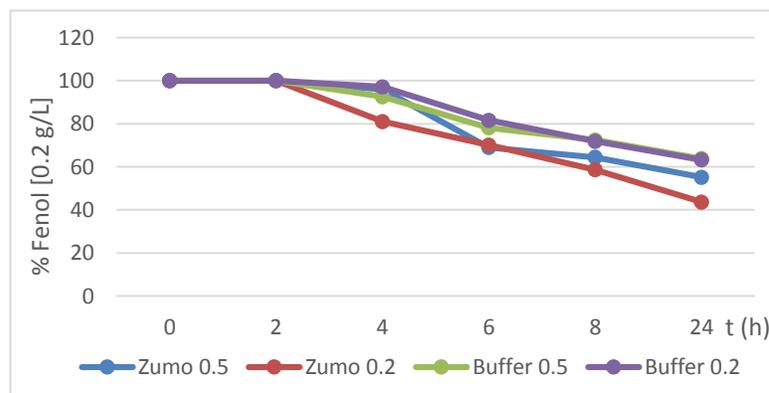
Gráfica 5. Remoción de fenol [0.2 g/L] tercer uso de los cuatro tipos de cápsulas conservadas húmedas a 4°C por 17 h.

En la gráfica 6 se observa que en el cuarto uso todas las cápsulas remueven el 100% del contaminante en 8 h, sin embargo las cápsulas de zumo y 0.2M CaCl₂ tienen un 50% de remoción a las 4h



Gráfica 6. Remoción de fenol [0.2 g/L] cuarto uso de los cuatro tipos de cápsulas conservadas húmedas a 4°C por 17 h.

La gráfica 7 muestra el quinto y último uso de las cápsulas, se observa que las cápsulas Zumo 0.2 remueven el 56%, Zumo 0.5 remueve el 45%, Buffer 0.2 y Buffer 0.5 remueven el 37% del contaminante en 24 h.

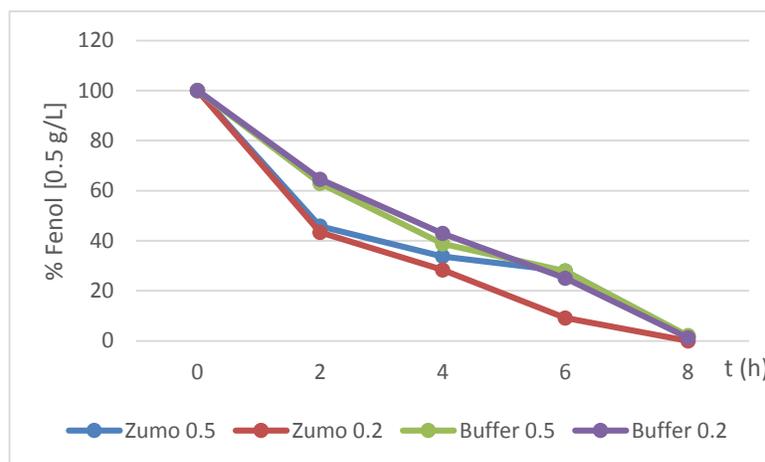


Gráfica 7. Remoción de fenol [0.2 g/L] quinto uso de los cuatro tipos de cápsulas conservadas húmedas 4°C por 17 h.

7.4 Biorremediación de agua residual sintética con 0.5 g/L de fenol y cápsulas de zumo de brócoli y de extracto buffer con 0.2M y 0.5M CaCl₂

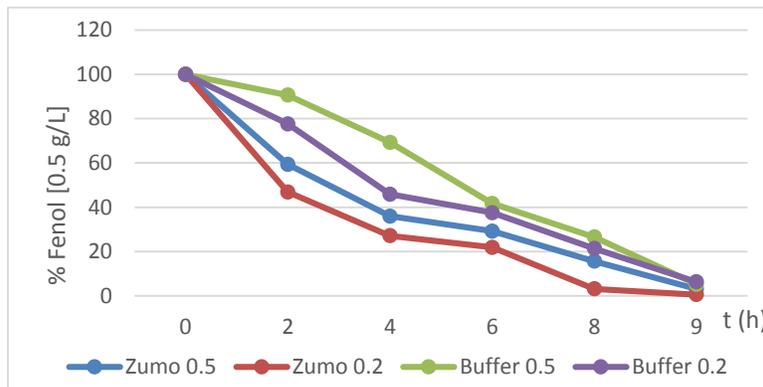
Como se mencionó anteriormente las concentraciones típicas de fenol en agua residual van de 35 a 400 mg/L sin embargo las aguas residuales tienen una composición y origen variado, en aguas agrícolas, textiles, papeleras y del sector salud las concentraciones de fenol van de 200 a 1000 mg/L, esto se debe al uso de plaguicidas, fungicidas, resinas, conservadores y desinfectantes (Buitrón, 2007).

En la gráfica 8 se muestran los resultados de la biorremediación de una concentración media de fenol (500 mg/L), se observa que a las 8 h los cuatro tipos de cápsulas remueven el 100% del contaminante, sin embargo la cinética de biotransformación más rápida la tienen las cápsulas elaboradas con zumo y 0.2M CaCl₂.



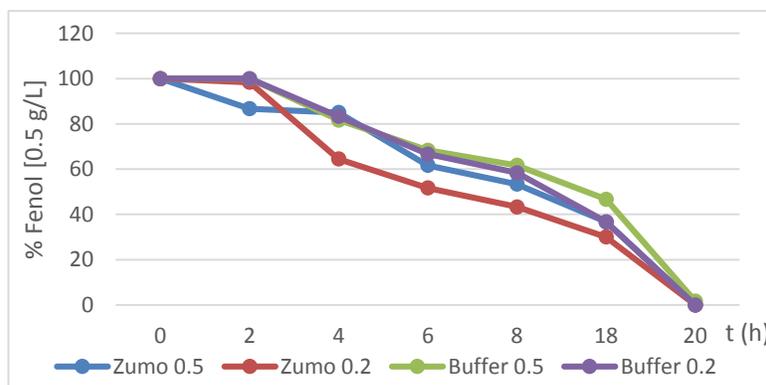
Gráfica 8. Remoción de fenol [0.5 g/L] con cápsulas de extracto buffer de fosfatos y zumo de brócoli en concentración de 0.2M y 0.5M de CaCl₂

En la gráfica 9 se observa que a las 8 h las cápsulas Zumo 0.2M remueven el 100% de fenol, y las Zumo 0.5, Buffer 0.2 y Buffer 0.5 remueven el 100% de fenol a las 9 h.



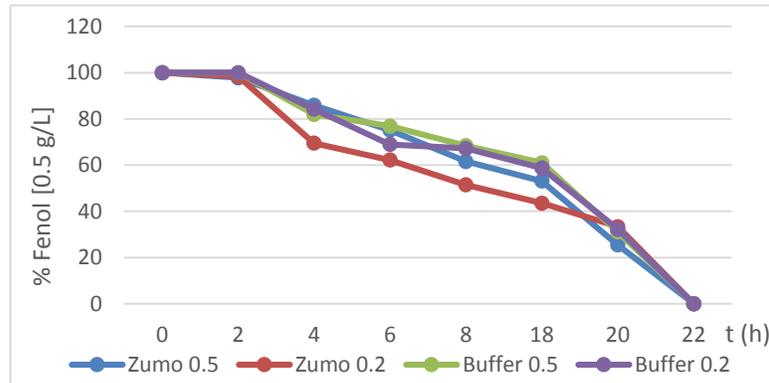
Gráfica 9. Remoción de fenol [0.5 g/L] segundo uso de los cuatro tipos de cápsulas conservadas húmedas a 4°C por 17 h.

En la gráfica 10 se observa que los cuatro tipos de cápsulas remueven el 100% de fenol en 20 h, pero las cápsulas Zumo 0.2 remueven el 30% del contaminante en 4 h.



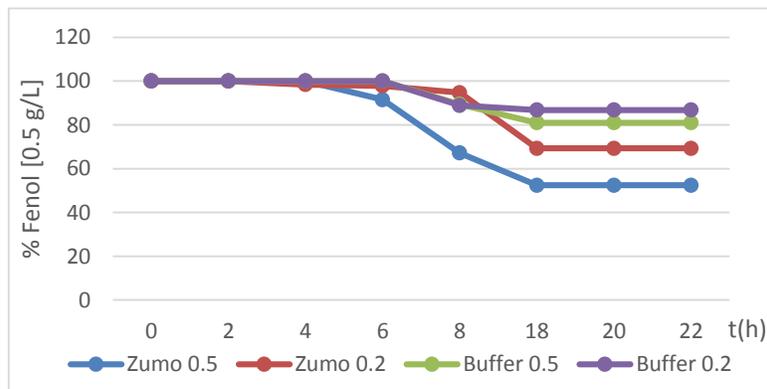
Gráfica 10. Remoción de fenol [0.5 g/L] tercer uso de los cuatro tipos de cápsulas conservadas húmedas a 4°C por 17 h.

En la gráfica 11 se observa que los cuatro tipos de cápsulas tienen casi el mismo tiempo de remoción de fenol, logrando el 100% de polimerización a las 22 h.



Gráfica 11. Remoción de fenol [0.5 g/L] cuarto uso de los cuatro tipos de cápsulas conservadas húmedas a 4°C por 17 h.

En la gráfica 12 se observa que a las 22 h de reacción las cápsulas Zumo 0.5 remueven el 47% de fenol, mientras que Zumo 0.2 solo el 30% y Buffer 0.2 y 0.5 el 15%.



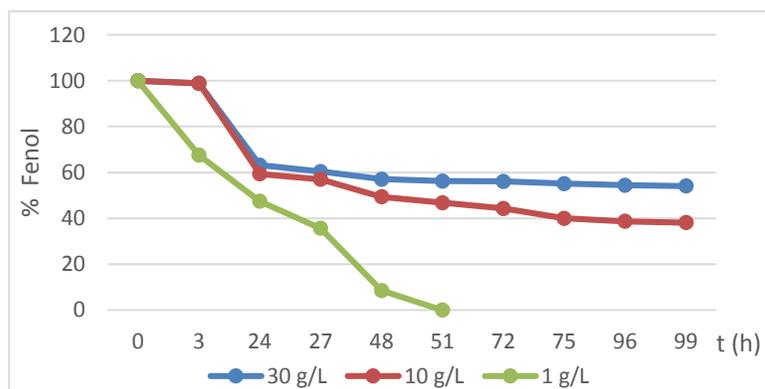
Gráfica 12. Remoción de fenol [0.5 g/L] quinto y último uso de los cuatro tipos de cápsulas conservadas húmedas a 4°C por 17 h.

7.5 Análisis estadístico de la remoción de fenol con los cuatro tipos de cápsulas

Con un 95% de confianza la prueba de ANOVA para comprar los porcentajes de remoción de fenol en los 5 ciclos de biorremediación demuestran que no hay diferencia significativa entre los cuatro tipos de cápsulas enzimáticas, y si hay diferencias significativas al comparar la actividad de las cápsulas elaboradas con extracto buffer o zumo de brócoli (Anexo II).

7.6 Biorremediación de agua residual sintética con 1, 10, y 30 g/L de fenol y cápsulas de zumo de brócoli y 0.2M de CaCl₂

Las concentraciones más tóxicas de fenol provienen de las aguas residuales de la industria química, petroquímica y de la elaboración de pinturas y resinas sintéticas; se ha reportado que las sosas gastadas en la refinación de hidrocarburos contienen hasta 30 g/L de fenol (Olguín-Lora y col., 2003), usando las cápsulas Zumo 0.2 que presentaron el mayor porcentaje de biotransformación para la remoción de fenol en concentraciones consideradas altamente tóxicas 1, 10 y 30 g/L (Olguín-Lora y col., 2003, Nakamoto y Machida, 1992) se obtuvieron los siguientes resultados.



Gráfica 13. Remoción de fenol con cápsulas de zumo de brócoli y 0.2M de CaCl₂

En la gráfica 13 se observa que la mayor remoción del contaminante ocurre a las 24 h de reacción. En el tratamiento de 30 g/L hay una remoción del 45% que equivale a 17.64 g/L, después de este tiempo la reacción de polimerización es mínima; en la concentración de 10 g/L a las 24 h la remoción es del 41% (5.06 g/L) y se alcanza el

61% (6.14 g/L) de remoción a las 99 h, en la concentración de 1 g/L a las 24 h la remoción es del 53% y es constante hasta polimerizar el 100% de fenol en 51 h.

En la figura 12 se muestran las celdas de cuantificación de fenol antes del proceso de biotransformación, el color magenta intenso indica una alta concentración de fenol.

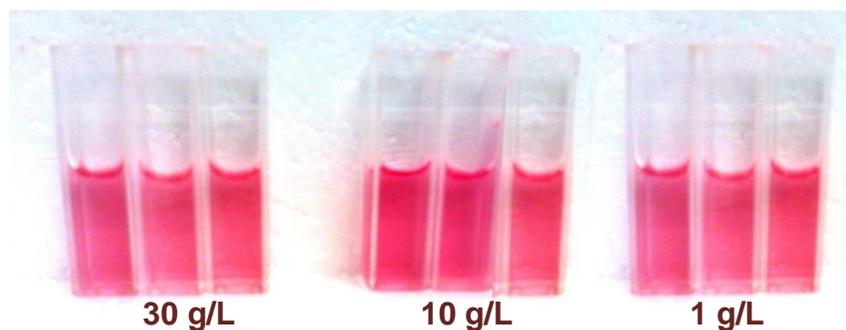


Figura 12. Determinación de fenol con 4-AAP antes de la biorremediación.

En la figura 13 se muestran las celdas de cuantificación de fenol después del proceso de biotransformación, en las concentraciones de 30 y 10 g/L aún se desarrolla color por lo que sólo una parte del contaminante fue removida, pero en la de 1 g/L el color ha desaparecido demostrando que la remoción de fenol fue completa.

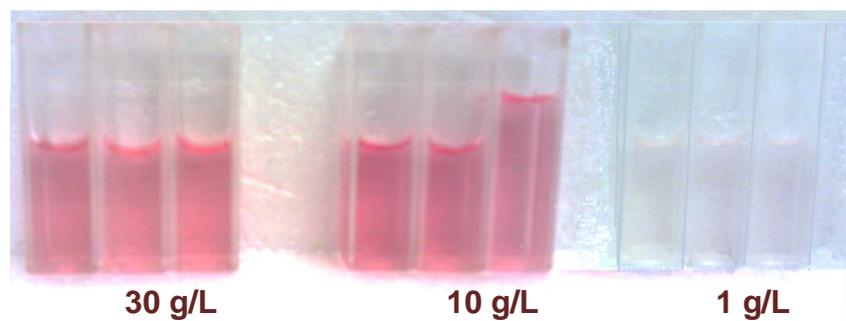
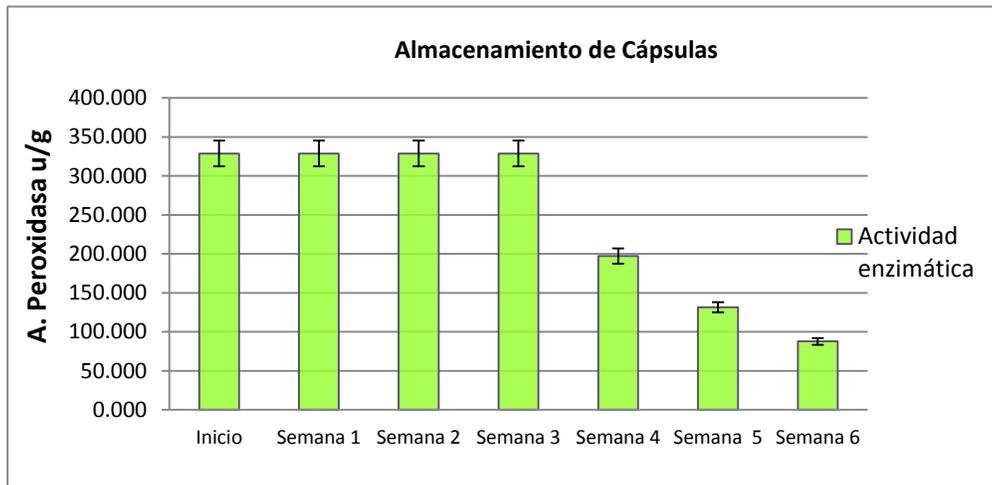


Figura 13. Determinación de fenol con 4-AAP después de la biorremediación.

7.7 Actividad de las cápsulas almacenadas.

Se registró la actividad de las cápsulas el día de su elaboración y posteriormente cada semana hasta que la actividad enzimática fue mínima (gráfica 14), a partir de la 5 semana se observaron cambios de coloración en las cápsulas (Fig.14).



Gráfica 14. Actividad de las cápsulas de Zumo 0.2 CaCl₂ almacenadas en agua a 4° C



Figura 14. A la izquierda las cápsulas antes de ser almacenadas con coloración verde brillante y a la derecha después de 6 semanas de almacenarse a 4°C se vuelven lechosas y opacas.

VIII. ANALISIS DE RESULTADOS

Después de inmovilizar las peroxidasa, es evidente la reducción de su actividad enzimática con respecto al extracto vegetal; éste es un efecto secundario de la inmovilización, independientemente del tipo de técnica empleada, como se observa en el trabajo de González y col. (2007) donde hay una reducción en la actividad enzimática del extracto crudo de nabo liofilizado inmovilizado en cápsulas elaboradas por dos métodos: el primero es una inmovilización física en alginato de calcio y el segundo es una inmovilización química por medio de enlace covalente con resina Affi-Gel, ambos tipos de cápsulas fueron utilizadas para la remoción de fenol 0.8 y 1.2 mg/L.

En el caso del extracto de brócoli también se observó una disminución de la actividad peroxidasa, probablemente la reducción en la actividad enzimática del extracto se deba a los siguientes factores: precipitación de proteínas durante el proceso de la encapsulación y que esta precipitación ocurra cuando el Ca^{2+} sustituye al Na^+ en los extremos carboxílicos del alginato (Hernández y col., 2005), fugas de enzimas por los espacios del alginato (Alemzadeh, 2009) o el tiempo que la cápsula permanece en el baño de cloruro de calcio provoca que la enzima sea desplazada al interior y este atrapada (Avendaño y col., 2013).

Los cuatro tipos de cápsulas remueven el fenol, pero las cápsulas elaboradas con zumo y $\text{CaCl}_2 0.2\text{M}$ son las que tienen la cinética de remoción más rápida removiendo por completo el contaminante 0.2 g/L en 4 h y 0.5 g/L en 8 h, en el cuadro 3 y 4 se muestra el porcentaje de fenol removido por las cápsulas de peroxidasa, en ambas concentraciones se tomó el tiempo de mayor remoción como punto de referencia para ver la eficacia de la reutilización de las cápsulas.

Cuadro 3. Porcentaje remoción de fenol 0.2 g/L en 4 h por medio de cápsulas enzimáticas.

Cápsulas	1° Uso	2° Uso	3° Uso	4° Uso	5° Uso
Zumo 0.5 CaCl ₂	100%	100%	75%	45%	4%
Zumo 0.2 CaCl ₂	100%	100%	77%	70%	19%
Buffer 0.5 CaCl ₂	100%	100%	69%	33%	7%
Buffer 0.2 CaCl ₂	100%	100%	77%	50%	3%

En la concentración del fenol 0.2 g/L las cápsulas mantienen su eficacia en los dos primeros usos, para el tercer uso la remoción es del 100% pero aumenta el tiempo de reacción a 6 h usando las cápsulas de zumo 0.2M, en los ciclos posteriores disminuye la eficiencia de todas las cápsulas removiendo en el 4° el 100% en 8 h y en el 5° solo el 90% en 24 h.

Cuadro 4. Porcentaje remoción de fenol 0.5 g/L en 8 h por medio de cápsulas enzimáticas.

Cápsulas	1° Uso	2° Uso	3° Uso	4° Uso	5° Uso
Zumo 0.5 CaCl ₂	100%	84%	47%	38%	33%
Zumo 0.2 CaCl ₂	100%	100%	57%	48%	5%
Buffer 0.5 CaCl ₂	100%	73%	38%	32%	10%
Buffer 0.2 CaCl ₂	100%	79%	42%	33%	11%

Para la concentración de 0.5 g/L las cápsulas que mantienen el porcentaje de remoción en el mismo tiempo (100% en 8 h) en el primer y segundo uso son las de Zumo 0.2 CaCl₂, en los ciclos siguientes se logra remover el 100% del fenol hasta las 20 h y en el quinto uso solo se remueve el 60% en 24 h.

En estudios similares como el de Domínguez (2009) que utiliza vegetales en secciones con la concentración de fenol 0.47 g/L (470 ppm) en 48 h, se logra una remoción de 0.423 g/L en el primer uso y para el segundo uso la eficacia disminuye a 0.1 g/L de fenol removidos y no fue posible realizar un tercer uso debido a que el material vegetal se desintegró en la muestra problema durante la reacción.

En este trabajo con los cuatro tipos de cápsulas de peroxidasas se logró la remoción completa del contaminante a 0.2 g/L en 2 ciclos de 4 h y para 0.5 g/L sólo las cápsulas de Zumo 0.2 CaCl₂ logran remover en dos ciclos la misma concentración en 8 h.

Después de una semana de uso continuo las cápsulas perdieron su actividad enzimática y fue notorio un cambio de color, de verde claro pasaron a blanco lechoso y la consistencia de las cápsulas firmes paso a ser suave y fácil de deshacer, también se detecto un cambio en el olor probablemente por la degradación de los componentes vegetales.

Para las concentraciones de 1, 10 y 30 g/L se utilizaron las cápsulas que presentaron la cinética más rápida de remoción de fenol, en el cuadro 5 se muestran los gramos removidos de fenol en 24 h.

Cuadro 5. Gramos de fenol removidos con 5 g de cápsulas de peroxidasas a las 24 h para 1, 10 y 30 g/L.

Cápsulas de peroxidasas	Fenol 1 g/L	Fenol 10 g/L	Fenol 30 g/L
Zumo 0.2M CaCl ₂	0.53	5.1	12.3

En el cuadro cuatro se observa que las concentraciones de 10 y 30 g/L son las que biotransforman más gramos de fenol, esto se debe a que al incrementarse la concentración del sustrato aumenta la velocidad de reacción de las enzimas y la probabilidad de formación del complejo enzima-sustrato, este proceso continua hasta que no haya más enzimas disponibles y el proceso llega a un punto en el que la velocidad de reacción ya no aumenta y se detiene.

En la biorremediación con peroxidasas de contaminantes altamente tóxicos como el fenol es común el uso de aditivos como: alginato, gelatina y polietilenglicol (PEG) para favorecer la remoción del contaminante y evitar la adsorción de la enzima por los productos polimerizados, en un trabajo similar de Nakamoto y Machida (1992), usando HPR purificada (10 mg/L), gelatina y PEG logran la remoción del 90% de 10 y 30 g/L de fenol en 20 h.

Usando 5 g cápsulas (16.44 u/g) elaboradas solo con zumo de brócoli y 0.2M CaCl₂ se logra remover, sin más aditivos que el alginato, el 50% del contaminante.

Quintanilla-Guerrero y col., (2008b) reportan que a mayores concentraciones de fenol la eficiencia de la remoción disminuye hasta en un 90% incluso adicionando PEG para

potencializar la actividad enzimática, las concentraciones usadas (10 g/L y 30 g/L) en este experimento son extremadamente altas pero presentan un porcentaje favorable de polimerización. El alginato además de inmovilizar a la enzima también actúa como agente protector.

La concentración del alginato y el tiempo de reacción con el cloruro de calcio también es importante para la elaboración de cápsulas eficientes; la reacción de estos compuestos produce una gelificación interna, al mezclarse las soluciones de alginato y cloruro de calcio, existe un gradiente osmótico entre el interior de la esfera y el baño de cloruro de calcio, que actúa como una fuerza motriz para que el calcio pueda migrar a través de la matriz de alginato y tenga lugar la gelificación interna. Como consecuencia de esta gelatificación si se deja la mezcla de alginato más de 3 minutos en el baño de cloruro de calcio, el proceso continua hacia el interior, gelificando también la parte interna como se observa en la Figura 15, 30 segundos es el tiempo óptimo para conseguir la gelificación de la membrana externa y mantener el interior líquido (Avendaño y col., 2013).

Las cápsulas de peroxidasa se dejaron en el baño de cloruro de calcio por 1 minuto por lo tanto las cápsulas tienen una cubierta de alginato delgada y se conserva la mayor parte del interior líquido.

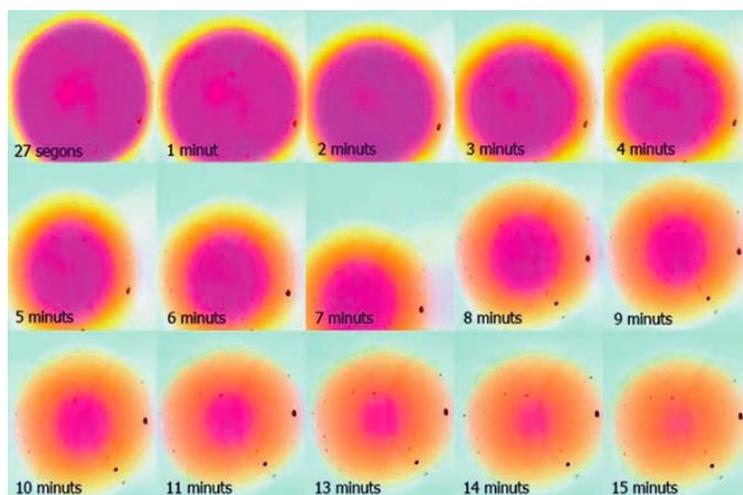


Figura 15. Esferificación vista al microscopio electrónico. Foto de Mans y Castells, 2011.

Los trabajos de biorremediación de fenol por medio de peroxidasas vegetales en su mayoría, manejan concentraciones menores a 0.5 g/L, son pocos los trabajos realizados con concentraciones superiores a 1.5 o 10 g/L que son las concentraciones que podemos encontrar en aguas residuales industriales. Las enzimas que utilizan en esos tratamientos por lo general son HRP comerciales, si son de otro vegetal estas peroxidasas son purificadas o parcialmente purificadas. Se ha demostrado que usar el zumo o secciones vegetales: bagazo o cortes de tallo, hoja o cáscara (que es la forma en que de manera natural se encuentran inmovilizadas las enzimas) en la biorremediación de agua residual es viable. Domínguez (2009) utiliza extracto con buffer de fosfatos y secciones de brócoli para la remoción de fenol y 4-clorofenol (0.47g/L) removiendo el 52% del contaminante con extracto y el 70% con las secciones de brócoli. Hernández (2011) utiliza zumo y bagazo de brócoli para la biorremediación del colorante índigo carmín en agua residual (0.5, 1 y 2 g/L) removiendo el 90% del contaminante.

En este trabajo se usó el extracto en buffer de fosfatos porque es uno de los más utilizados para la obtención de las peroxidasas, la desventaja que tiene este método es que sólo se obtienen las peroxidasas solubles, dejando en el bagazo otras enzimas que también actúan en la biotransformación.

IX. CONCLUSIONES

- ✎ Los meses en los que los vegetales presentan su mayor actividad enzimática son abril y noviembre; se demostró que los zumos son los que presentan mayor actividad peroxidasa.
- ✎ Para que las cápsulas sean adecuadas para la remoción de fenoles el extracto con que se elaboran debe tener una actividad superior a 250 u/g ya que el proceso de inmovilización reduce su actividad al 50%; en este trabajo se demostró que las cápsulas tienen mejores resultados si se elaboran con el zumo del vegetal.
- ✎ Las cápsulas pueden utilizarse hasta 5 veces con concentraciones de menos de 1 g de fenol, pero su eficacia disminuye a partir del 3er uso. En concentraciones superiores (1 g/L a 30 g/L) solo se pueden utilizar una vez debido a que aumenta la velocidad de reacción de la enzima sobre el sustrato y el proceso termina con todas las enzimas disponibles.
- ✎ Las cápsulas pueden ser almacenadas húmedas a 4°C por tres semanas sin perder su actividad.
- ✎ El tallo de brócoli es generalmente desechado por lo que utilizarlo como fuente alternativa de peroxidasas es viable y más accesible que las peroxidasas comerciales.
- ✎ Este método de obtención, inmovilización y aplicación de las enzimas para el tratamiento de aguas con fenol es económicamente rentable y no genera problemas de disposición de residuos ya que las cápsulas al ser elaboradas con alginato son biodegradables.

X. RECOMENDACIONES

- ☞ Evaluar la capacidad de biotransformación de fenol en diferentes pHs usando las cápsulas “Zumo 0.2”.
- ☞ Evaluar la capacidad de biotransformación de las cápsulas con diferentes compuestos fenólicos (2-clorofenol, 4-clorofenol, etc.).
- ☞ Realizar pruebas de biorremediación con mezclas de colorantes textiles y fenol.
- ☞ Probar las cápsulas con muestras de aguas residuales reales contaminadas con fenol.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Alemzadeh, I., & Nejati, S. (2009). Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase. *Journal of Hazardous Materials*, 166(2), 1082-1086.

Arellano B.J., Ilich Z.S., Salazar C. M., Rodríguez H.I. (2012). Remoción de compuestos fenólicos de un sistema de agua residual sintética por la peroxidasa de nabo *Brassica napus*. *REBIOL* 32(1),19-103.

Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars. Pharmaceutica*, 39(2), 23-39.

ATSDR (1998). Toxicological profile for phenol. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. *Department of Health and Human Services, Atlanta*, 127–133.

Avendaño-Romero, G., López-Malo, A., & Paolu, E. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(1), 87-96.

Baltazar M. y Moreno V. (2007). Búsqueda de nuevas peroxidasas en extractos crudos de vegetales y plantas de México. *Informe de servicio social de la FES Zaragoza: SS BIOL 07 35*

Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisen, P., Fernandez-Lafuente, R., Huguet, J., & Guisan, J. M. (1998). A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnology and bioengineering*, 58(5), 486-493.

Bayramoğlu, G., & Arıca, M. Y. (2008). Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads. *Journal of hazardous materials*, 156(1), 148-155.

Bódalo, A., Gómez, E., Hidalgo, A. M., Gómez, M., Murcia, M. D., & López, I. (2009). Nanofiltration membranes to reduce phenol concentration in wastewater. *Desalination*, 245(1), 680-686.

Bódalo, A., Bastida, J., Máximo, M. F., Montiel, M. C., Gómez, M., & Murcia, M. D. (2008). A comparative study of free and immobilized soybean and horseradish peroxidases for 4-chlorophenol removal: protective effects of immobilization. *Bioprocess and biosystemsengineering*, 31(6), 587-593.

Buitrón G., Moreno G., Moreno-Andrade I. (2007). Eliminación biológica de altas concentraciones de fenol presente en aguas residuales. *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica* 1 (2). UNAM.

Caza, N., Bewtra, J. K., Biswas, N., & Taylor, K. E. (1999). Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase. *Water Research*, 33(13), 3012-3018.

Cedillo, L. R., Hernández, C. M. M., Zapata, A. S., Balagurusamy, N., & Escareño, M. P. L. (2014). Aplicaciones de las Enzimas Inmovilizadas Application of Immobilized Enzymes. *Revista Científica*, 6(11).

Cunningham, S. D., & Berti, W. R. (1993). Remediation of contaminated soils with green plants: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 29(4), 207-212.

Deva, A. N., Arun, C., Arthanareeswaran, G., & Sivashanmugam, P. (2014). Extraction of peroxidase from waste *Brassica oleracea* used for the treatment of aqueous phenol in synthetic waste water. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(2), 1148-1154.

Domínguez Alfaro N. (2009). Fitorremediación de compuestos fenólicos en aguas residuales con peroxidasas vegetales. *Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.*

Fialova A.; Boschke E.; Bley T. (2004). Rapid monitoring of the biodegradation of phenol-like compounds by the yeast *Candida maltosa* using BOD measurements. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54(1), 69–76.

Funami, T., Fang, Y., Noda, S., Ishihara, S., Nakauma, M., Draget, K. I., Phillips, G. O. (2009). Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca²⁺ binding. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1746-1755.

García-Ochoa, F., y Santos, A. (1998). Oxidación catalítica de compuestos fenólicos en aguas residuales. *Dpto. de Ingeniería Química. Facultad de CC. Químicas. Universidad Complutense de Madrid*. 269-274.

Gianfreda L., Bollag J.M. (1994). Effect of soils on the behavior of immobilized enzymes. *Soil Science Society of American Journal* 58, 1672-1681.

González Alvarado, G.G. (2009). Estabilidad e intercambio de iones calcio en geles de alginato. *Reporte de Residencia Profesional. Departamento de Ingenierías Química y Bioquímica. Instituto Tecnológico de Durango*.

González Rodríguez, C., Quintanilla-Guerrero, F., García Almendárez, B., & Regalado, C. (2007). Métodos de inmovilización de peroxidasa de nabo y su aplicación en la detoxificación de soluciones fenólicas. *DIPA, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro*.

Harvey, P. J., & Thurston, C. F. (2001). The biochemistry of ligninolytic fungi. *British Mycological Society Symposium Series*. 23, 27-51.

Hernández E. M., López G. Y. R. y García P. A. 2005. Evaluación de derivados carboximetilados del alginato de sodio como superabsorbente. *Revista Cubana de Química*. Vol. XVII. 3: 239-240.

Hernández Pérez. J.A. (2011). Degradación del colorante textil azul índigo de agua artificialmente contaminada por las enzimas peroxidasas y lacasas de diferentes vegetales. *Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.*

Luna, F. V.; Fernández, A.; González, E.; Patiño, R.; Álvarez, G. (2005). Emprendiendo la fitorremediación en México. *Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Guanajuato.*

Lupo P. B., González A.C. y Maestro G. A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos.* 3 (1), 130-151.

Mancini, M., Moresi, M. y Rancini, R. (1999). Mechanical properties of alginate gels: empirical characterisation. *Journal of Food Engineering.* 39(4), 369-378.

Michalowicz J. & Duda W. (2006). Phenol-Sources and Toxicity. *Polish Journal of Environmental Studies,* 16(3), 3347-362

Moreno, D. A., López-Berenguer, C., Martínez-Ballesta, M. C., Carvajal, M., & García-Viguera, C. (2008). Basis for the new challenges of growing broccoli for health in hydroponics. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 88(8), 1472-1481.

Moreno, D. A., Pérez-Balibrea, S., Ferreres, F., Gil-Izquierdo, Á., & García-Viguera, C. (2010). Acylated anthocyanins in broccoli sprouts. *Food chemistry.* 123(2), 358-363.

Nicell, J. A., Saadi, K. W., & Buchanan, I. D. (1995). Phenol polymerization and precipitation by horseradish peroxidase enzyme and an additive. *Bioresource Technology,* 54(1), 5-16.

Norma Mexicana, N. M. X. AA-050-SCFI-2001. Análisis de agua-Determinación de fenoles totales en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas-Método de prueba.

Olguín-Lora, P., & Razo-Flores, E. (2004). Anaerobic biodegradation of phenol in sulfide-rich media. *Journal of Chemical technology and Biotechnology*, 79(6), 554-561.

Onder, S., Celebi, M., Altikatoglu, M., Hatipoglu, A., & Kuzu, H. (2011). Decolorization of naphthol blue black using the horseradish peroxidase. *Applied biochemistry and biotechnology*, 163(3), 433-443.

Pasin, B. L., Azón, C. G., & Garriga, A. M. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1), 130-151

Quintanilla-Guerrero, F., Duarte-Vázquez, M. A., García-Almendárez, B. E., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R., & Regalado, C. (2008a). Polyethylene glycol improves phenol removal by immobilized turnip peroxidase. *Bioresource technology*, 99(18), 8605-8611.

Quintanilla-Guerrero, F., Duarte-Vázquez, M. A., Tinoco, R., Gómez-Suárez, M., García-Almendárez, B. E., Vazquez-Duhalt, R., & Regalado, C. (2008b). Chemical modification of turnip peroxidase with methoxypolyethylene glycol enhances activity and stability for phenol removal using the immobilized enzyme. *Journal of agricultural and foodchemistry*, 56(17), 8058-8065.

Ramírez Cortina, C. R.; Hernández Pérez, I.; Ortiz Lozoya, C. E.; Alonso Gutiérrez, M. S. (2002). Oxidación de fenoles con peróxido de hidrógeno y ozono. *XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental Cancún, México*.

Reddy-K, R. y Reddy-P., S. 2010. Effect of different copolymers on sodium alginate microcapsules containing isoniazid. *International Journal of PharmTech Research*. 2(4):2198-2203.

Rodríguez, J. L. y Sánchez, J. (2002) Biorremediación. *Aspectos tecnológicos y aplicación al vertido del Prestige*. Universidad de Oviedo 17-21 pp.

Santos de Araujo, B. S., Dec, J., Bollag, J. M., & Pletsch, M. (2006). Uptake and transformation of phenol and chlorophenols by hairy root cultures of *Daucus carota*, *Ipomoea batatas* and *Solanum aviculare*. *Chemosphere*, 63(4), 642-651.

Shahidi, F., & Han, X. Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 33(6), 501-547.

Yang, J., Jianping, W., Hongmei, L., Suliang, Y., Zongding, H. (2005). The biodegradation of phenol at high initial concentration by the yeast *Candida tropicalis*. *Biochemical Engineering Journal*, 24, 243-247.

Zhang, Y., Liu, J., Qui, H., Shi, Y., Xia, Y., y Li, F. (2005). Immobilization of acetylcholine esterase on gold nanoparticles embedded in solgel film for amperometric detection of organophosphorous insecticide. *Annales de Microbiologie* 55, 101

XII. REFERENCIAS DE INTERNET

Anthos (2010). Sistema de información sobre las plantas de España. Consejo Superior de Investigaciones Científicas- Real Jardín Botánico. Recuperado el 11 de agosto de 2014. http://www.anthos.es/v22/index.php?page=creditos&set_locale=es

GHC (2013). Global Healing Center. Fitoquímicos encontrados en brócoli y coliflor atacan las células del cáncer de próstata. Recuperado el 11 de agosto de 2014. <http://www.globalhealingcenter.net/salud-natural/fitoquimicos-cancer-prostata.html>

INECC. (2014). Fuentes de contaminación en México. Recuperado el 2 de junio de 2014. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/372/fuentes.html>

López A. (2013). Casos Exitosos de La Tecnología Enzimática y la Biocatálisis en México. Recuperado el 5 de junio de 2014. http://www.hablemosclaro.org/Repositorio/biblioteca/b179_Casos_exitosos_de_la_tecnologia_enzimatica.pdf

Mans, C., & Castells, P. (2011). La nueva cocina científica. Investigación y ciencia. Recuperado el 30 septiembre de 2015.

<http://www.angel.qui.ub.es/mans/Documents/Textos/201110%20lyC%20La%20nueva%20cocina%20cientifica.pdf>

SAGARPA. (2011). Monografía del brócoli. Subsecretaria de Fomento a los Agronegocios. Recuperado el 30 de septiembre del 2014.

<http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Estudios/Documents/monografias/brocoli.pdf>

US EPA (2004). Environmental Protection Agency Toxic Release Inventory (TRI) program. Recuperado el 22 de Octubre de 2014.

<http://www.epa.gov/tri/chemical/index.htm>

Villegas M. (2013) Inmovilización de la peroxidasa de chayote [*Sechium edule* (Jacq.)Sw] y su potencial aplicación en la remoción de sustancias fenólicas en aguas contaminada. Recuperado el 28 de septiembre de 2015.

<http://www.journals.unam.mx/index.php/rica/article/view/25139>

XIII. ANEXOS

ANEXO I: Reactivos

- ∞ Buffer de fosfatos (pH 6.1): 11.9 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y 1.75 g de fosfato disódico (Na_2HPO_4) aforar a 1 L con H_2O destilada, conservar en refrigeración (Baltazar y Moreno, 2007).
- ∞ 4-Aminoantipirina (4-AAP): 0.08 g de 4-AAP en 10 mL de H_2O destilada (Bayramoğlu y Arica, 2008; González y col., 2006).
- ∞ Ferricianuro de Potasio ($\text{K}_3 [\text{Fe} (\text{CN})_6]$): 0.36 g de $\text{K}_3 [\text{Fe} (\text{CN})_6]$ en 10 mL de H_2O destilada (Bayramoğlu y Arica, 2008; González y col., 2006).
- ∞ CaCl_2 0.2M: 2.2 g de cloruro de calcio aforar a 100 mL de H_2O destilada.
- ∞ CaCl_2 0.5M: 5.5 g de cloruro de calcio aforar a 100 mL de H_2O destilada.

Disoluciones para agua residual sintética con diferentes concentraciones de fenol

- ∞ Agua residual sintética 0.2 g/L: 0.02 g de fenol aforar a 100 mL con H_2O destilada.
- ∞ Agua residual sintética 0.5 g/L: 0.05 g de fenol aforar a 100 mL con H_2O destilada.
- ∞ Agua residual sintética 1 g/L: 0.1 g de fenol aforar a 100 mL con H_2O destilada.
- ∞ Agua residual sintética 10 g/L: 1 g de fenol aforar a 100 mL con H_2O destilada.
- ∞ Agua residual sintética 30 g/L: 3 g de fenol aforar a 100 mL con H_2O destilada.

ANEXO II: Análisis Estadístico

Análisis de varianza de un factor para la remoción de fenol, entre la concentración de CaCl_2 0.2 y 0.5 M, y de la concentración de peroxidasas en el extracto enzimático con buffer de fosfatos y zumo de brócoli.

Descriptives

Fenol

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					Buffer	2		
Zumo	2	.006061	.0085710	.0060606	-.070947	.083068	.0000	.0121
Total	4	.016667	.0134385	.0067193	-.004717	.038050	.0000	.0303

ANOVA

Fenol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	1	.000	9.800	.089
Within Groups	.000	2	.000		
Total	.001	3			

Descriptives

Anctividad enzimatica del extracto

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					Buffer	7		
Zumo	6	498.140000	185.4997166	75.7299422	303.4699862	692.8100138	266.7300	741.7300
Total	13	319.570769	214.8345844	59.5843930	189.7475291	449.3940093	76.73000	741.7300

ANOVA

Anctividad enzimatica del extracto

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	355311.953	1	355311.953	19.686	.001
Within Groups	198534.831	11	18048.621		
Total	553846.784	12			

