



Remoción de compuestos fenólicos de un sistema de agua residual sintética por la peroxidasa de nabo, *Brassica napus*

Phenolics removal of a synthetic wastewater system by turnip, *Brassica napus*, peroxidase

Julio C. Arellano Barragán¹, Steban A. Ilich Zerpa¹, Marco L. Salazar Castillo¹ y Icela M. Rodríguez Haro²

¹Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal, ²Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú

RESUMEN

Se determinó la capacidad de la peroxidasa de *Brassica napus* "nabo" para remover el fenol de un agua residual sintética. Para ello, se extrajo la enzima utilizando un licuestrator y se obtuvo un extracto crudo y una solución parcialmente purificada de la peroxidasa, se les determinó la concentración de proteínas, la actividad de peroxidasa y la actividad específica; luego, se procedió a determinar la capacidad tanto del extracto crudo como de la solución parcialmente purificada de POD para remover el fenol (por polimerización) conteniendo peróxido de hidrógeno en el sistema. Se encontró que el proceso de purificación parcial de la POD con sulfato de amonio al 90% aumenta la actividad específica de 102,45 a 194,94 U.mg⁻¹ (90,28% más que el extracto crudo) y que la capacidad de remoción de fenol es de 61,35% para el extracto crudo y 66,66% para la solución parcialmente purificada, respectivamente; se concluye que la POD de nabo es una importante fuente de POD con una importante capacidad de remoción de fenol, siendo suficiente trabajar con el extracto crudo en dicho proceso.

Palabras clave: POD, nabo, *Brassica napus*, Fenol, remoción.

ABSTRACT

Capacity of *Brassica napus* peroxidase "turnip" to remove the phenol from a synthetic sewage was determined. For this, the enzyme was extracted using a licuoextractor and was obtained a crude extract and a partially purified solution of peroxidase. It was determined the protein concentration, the peroxidase activity and specific activity. After that, it was determined the capacity of both the crude extract and the partially purified solution of POD to remove phenol (by polymerization) containing peroxide hydrogen in the system. It was found that the partial purification process of POD with ammonium sulfate at 90% increases the specific activity from 102.45 to 194.94 U.mg⁻¹ (90.28% more than the crude extract). Furthermore, the removal capacity of phenol was 61.35% for the crude extract and 66.66% for the partially purified solution, respectively. It was concluded that the POD of turnip is an important source of POD with a significant capacity for removal of phenol so it is sufficient to work with the crude extract in this process.

Keywords: POD, turnip, *Brassica napus*, Phenol removal.



INTRODUCCIÓN

La peroxidasa (EC 1.11.1.7; Peróxido de hidrógeno oxirreductasa, POD) es una de las enzimas que controlan el crecimiento fisiológico de las plantas, su diferenciación y desarrollo. Es bien conocido que esta enzima participa en la construcción y lignificación de la pared celular, la biosíntesis de etileno a partir del ácido 1- aminociclopropanocarboxílico y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), la regulación de niveles de auxina, la protección contra el deterioro de tejidos e infección por microorganismos patógenos, la oxidación de ácido indolacético, etc.¹⁻³. Por ello, existe un creciente interés por la POD debido a sus múltiples aplicaciones prácticas (industria maderera, industria de alimentos, bioquímica clínica, etc.). Actualmente, cerca de un 90% de los *Kits* para análisis inmunoenzimático se preparan a partir de peroxidasa⁴; además, se ha venido utilizando para preparar electrodos específicos con POD inmovilizada sobre su superficie, que tienen aplicación en análisis ambiental⁵.

La actividad de la peroxidasa varía ampliamente de una especie a otra; por ejemplo, la del fruto de balazos (*Monstera deliciosa*) depende del grado de madurez; en cambio, la de las hojas de la palma de botella (*Roystonea regia*) se mantiene constante todo el año. Asimismo, de algunas especies su actividad es alta, como es el caso de la raíz de batata, *Ipomoea batatas* y de las hojas de: pasto guinea, *Panicum maximum*, dormidera, *Mimosa pigra*, higuera, *Ricinus communis* y diversas especies de palmas. Además, mediante técnicas de isoelectroenfoque se han hallado peroxidases aniónicas (pI 3.4 – 5.6) tanto en la raíz de batata como en las palmas analizadas⁶.

Es de destacar a la peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase o HRP), que tiene actualmente grandes aplicaciones en técnicas inmunoquímicas y de diagnóstico clínico debido a su gran estabilidad, facilidad de conjugación con las inmunoglobulinas y sencillez para detectarla por métodos colorimétricos utilizando un gran número de reactivos. Asimismo, el extracto crudo de nabo presenta una elevada actividad de peroxidasa (9,60 U/mg) comparativamente con otras fuentes vegetales, por lo cual parece ser una fuente alternativa para la obtención de esta enzima^{7, 8}.

Al mismo tiempo, la actividad industrial desarrollada por el hombre ha provocado que se desechen grandes cantidades de compuestos tóxicos afectando a la flora y fauna de las regiones involucradas. Los compuestos fenólicos están presentes en efluentes de desecho de varias industrias como la de conversión del carbón, conservación de la madera, farmacéutica, textil, manufactura del papel, cervecera, fabricación de resinas, así como la industria química y del petróleo, entre otros. La mayoría de éstos compuestos son tóxicos y han sido clasificados como contaminantes peligrosos. Debido a esto es importante eliminar estos contaminantes de los efluentes; además, el método no debe provocar la formación de productos secundarios tóxicos, no ser costoso, presentar una gran especificidad por los compuestos fenólicos, fácil de manipular, no peligroso y que además no provoque alteraciones ecológicas⁹.

En la actualidad para eliminar los contaminantes fenólicos efluentes se emplean varios métodos, entre ellos: extracción con solventes, degradación microbiana, adsorción con carbón activado, incineración y radiación con luz ultravioleta¹⁰. Muchos de estos tratamientos presentan más de uno de los inconvenientes anteriormente mencionados, y una alternativa para este problema ha sido el uso de enzimas. Se ha usado las peroxidases de rábano picante, frijón de soya y de organismos como *Coprinus macrorhizus*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Arthromyces ramosus*, para la remoción de compuestos fenólicos, encontrándose resultados hasta de un 99%. Esto debido a que las peroxidases son capaces de catalizar la oxidación de compuestos aromáticos en presencia de peróxido de hidrógeno, y los radicales libres fenoxi generados durante la catálisis reaccionan entre si para formar dímeros, trímeros, etc. que dan lugar a largos oligómeros¹¹. Estos oligómeros son menos solubles que sus monómeros precursores y tienden a precipitar. Dados los excelentes resultados obtenidos por las peroxidasa de otras fuentes, se piensa que la peroxidasa de una fuente alternativa como el nabo, puede proporcionar buenos resultados por la relativamente elevada concentración de ésta enzima en el vegetal. y ser una alternativa más viable en nuestro país. La producción agrícola de nabo en Trujillo, ha registrado un importante aumento en los últimos años (Información personal).

Se ha conseguido eliminar satisfactoriamente de agua residual sintética conteniendo fenol y compuestos fenólicos como el cresol, bisfenol-A y el 2- clorofenol por polimerización catalizada por la peroxidasa en estado soluble, y también inmovilizada por atrapamiento en alginato de calcio, con resultados interesantes como el 98%^{8, 10, 12}.



Aproximadamente el 15% de las enzimas conocidas (unas 2,500) están disponibles comercialmente¹³. Sin embargo, solo 40-50% de estas enzimas, en su mayoría hidrolasas, se fabrican a escala industrial a partir de microorganismos, plantas y animales. Las enzimas se emplean en diversos procesos industriales de: alimentos, detergentes, destilerías, medicina y analítica; todo indica que el número de enzimas que se emplearán en el futuro en dichos procesos irá aumentando exponencialmente¹⁴. La superfamilia de las peroxidasa animales y la superfamilia de las peroxidasa bacterianas, fúngicas y de plantas, cuyos componentes a pesar de mostrar en algunos casos una identidad de secuencia baja, presentan el mismo plegamiento y están evolutivamente relacionados^{15,18,19,20,21}.

A partir del análisis estructural de las diferentes peroxidasa cristalizadas, hasta la fecha se han podido identificar una serie de residuos implicados en la ruptura heterolítica del H₂O₂ 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. El H₂O₂ accede al centro activo y se une como sexto ligando hexacoordinado al hierro del hemo. Por tanto, esta posición tiene que estar libre en la enzima nativa, para que se pueda iniciar el ciclo catalítico. En esta tarea parecen estar implicados los residuos hidrofílicos del lado distal, capaces de estabilizar una extensa red de moléculas de H₂O, mediante una red de puentes de hidrógeno que, junto con el fuerte enlace Fe-Nε2 entre el hierro y la histidina proximal, impiden que alguna de estas moléculas interaccione con el hierro^{23,24,25}.

Las peroxidasa catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos. Estos van desde metaloproteínas (como el citocromo c) o polímeros de gran tamaño (como la lignina), hasta pequeñas moléculas aromáticas (sustrato de peroxidasa de plantas y hongos) o iones inorgánicos (como Mn²⁺, sustrato de peroxidasa producidas por los hongos ligninolíticos). La especificidad de estas enzimas frente a los diferentes sustratos depende de dos factores: (i) Potencial de reducción de las diferentes formas de la enzima (compuestos I y II) con respecto al potencial de reducción de los sustratos: esta propiedad está determinada por la capacidad de la enzima para estabilizar los elevados estados de oxidación del hierro durante el ciclo catalítico, que se debe tanto al fuerte carácter aniónico del quinto ligando del hierro (histidina proximal) como a la naturaleza hidrofílica de los residuos de lado distal del hemo y a las interacciones electrostáticas en el lado interior de la molécula²⁶, (ii) propiedades estructurales de la proteína, que determinan los sitios de unión a los sustratos: esta especificidad está probablemente modulada por algunos cambios en la superficie de las peroxidasa y por sustituciones en un pequeño número de aminoácidos, sin llegar a provocar un cambio significativo a nivel de la estructura secundaria y del plegamiento global de la proteína²⁷.

El nabo ha sido hasta la llegada de la patata desde el Nuevo Mundo una hortaliza de importancia básica en Europa, y de hecho cumplía una función similar en la alimentación, como ingrediente de asados, guisos, purés, o simplemente como guarnición de numerosos platos. Con la popularidad de la patata comenzó a declinar su consumo hasta quedar casi en el olvido. Hoy en día, aunque se ha recuperado un poco su cultivo, ya no goza del mismo éxito de antaño. En realidad, su carne y sabor suave son un buen complemento culinario, especialmente de las carnes grasas. Por otro lado, presenta un ciclo biológico diferente al de la mayoría de las hortalizas, motivo por el cual se puede aprovechar para su cultivo los espacios de la huerta que dejan otras plantas^{28,29,30,31}.

La peroxidasa de rábano picante (*A. rusticana* L.), ha sido una de las más estudiadas en este campo y con la que se ha obtenido hasta un 99% de remoción de compuestos fenólicos presentes en agua. Las investigaciones realizadas con otras fuentes de peroxidasa de origen tanto microbiano como vegetal, presentan una buena efectividad en la remoción de fenoles tanto en extractos crudos como usando una preparación de mayor pureza, de la misma fuente; por ello se pretende elevar la capacidad de la peroxidasa de nabo para eliminar dichos compuestos fenólicos y así proponer una fuente alternativa más económica que la peroxidasa comercial, por su alta disponibilidad y relativamente alta concentración de peroxidasa. Las peroxidasa tanto de nabo como de otros vegetales de alta disponibilidad en el Perú, están siendo estudiadas por un grupo de investigación del Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, mostrando características cinéticas y de estabilidad que posibilitan enormemente su utilización.

Por esta razón, la aplicación de las peroxidasa de nabo en la eliminación de compuestos fenólicos tendrá en el futuro una eficiencia similar, o mejor en la biorremediación de compuestos fenólicos,



comparada con las peroxidasa comerciales. Asimismo, en un futuro muy próximo será posible: (i) la obtención de peroxidasa de nabo, con igual o mejor calidad que otras peroxidasa comerciales obtenidas a partir de rábano picante y de cáscara de soja, a fin de sustituirlas gradualmente en un mercado biotecnológico nacional e internacional ya establecido, (ii) la presentación de tecnologías de proceso aplicables a otras materias primas biológicas propias de nuestra región, para la obtención de peroxidasa y/o de otras enzimas con aplicaciones biotecnológicas, (iii) la presentación de productos naturales, recuperación y revalorización del nabo, (iv), la mejora continua en servicios de consultoría y de desarrollo de aplicaciones biocatalíticas, sobre peroxidasa de nabo y sobre otras enzimas en estado soluble, (v) la producción de peroxidasa solubles a partir del nabo, destinadas a empresas que las utilizan en aplicaciones biotecnológicas, como diagnóstico clínico, mediante análisis enzimático e inmunoenzimático, análisis enzimático de fármacos, elaboración de productos de panadería, blanqueo de papel, decoloración de ropa vaquera, incorporación a detergentes para lavado de tejidos, degradación de contaminantes, síntesis de reactivos químicos, etc, (vi) desarrollo de aplicaciones bioanalíticas de peroxidasa, como kits de análisis enzimático o biosensores enzimáticos para análisis clínicos de glucosa, colesterol, triglicéridos y ácido úrico, así como para análisis de fenoles y anilinas utilizados como fármacos y reactivos químicos, y (vii) desarrollo de aplicaciones biocatalíticas de peroxidasa como biorreactores enzimáticos para la degradación de vertidos industriales, contaminados con fenoles y anilinas perjudiciales para el medio ambiente, o bien para la síntesis estereoespecífica de fenoles y anilinas con utilidad biotecnológica.

El propósito de la presente investigación fue estudiar la capacidad de la peroxidasa de *Brassica napus* “nabo” para remover el fenol de agua residual sintética, lo que permitirá tener una fuente vegetal abundante en la región para producir enzima y fin de aplicarla en el proceso de remover el fenol y compuestos fenólicos del agua residual producidos en las diferentes industrial locales, regionales y nacionales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material de estudio

- Peroxidasa (POD), de *Brassica napus* L. “nabo”
- Agua residual sintética (100,00 mM de fenol, p.a.)

Obtención del extracto crudo de peroxidasa de nabo

Para el estudio se seleccionaron raíces de nabo, frescas, y las que no presentaron signos de maltrato o períodos largos de almacenamiento. Las muestras fueron analizadas el mismo día de su recolección, previamente lavadas con agua destilada, para remover cualquier suciedad y materiales extraños y conservados en refrigeración. El extracto crudo se obtuvo por extracción directa de 1Kg de nabo en un licuestrator (Oster), se filtró 2 ó 3 veces al vacío con papel whatman de poro decreciente y, finalmente se centrifugó por 10 minutos a 3500 rpm. Luego, el sobrenadante obtenido fue diluido con igual volumen de buffer fosfato 20 mM pH 6, este se denominó **extracto crudo de POD** y se conservó a 0°C.

Medición de la actividad de peroxidasa³²

Se llevó a cabo en espectrofotómetro Spectronic-20 a temperatura ambiente (25°C). La solución de enzima (50 µL) fue adicionada a 4 mL de buffer fosfato 10 mM de pH 7.0 conteniendo guayacol (20mM) y H₂O₂ (4.4 mM) como sustratos. Se midieron los cambios de absorbancia debidos a la oxidación de guayacol por la peroxidasa por 2 minutos. La determinación se realizará por triplicado. Una Unidad Enzimática (UE) para Peroxidasa fue definida como el incremento de una unidad de cambio de absorbancia/minuto bajo condiciones estándares.

Purificación parcial de la Peroxidasa de nabo

Para la purificación parcial de la POD de nabo se realizó con sulfato de amonio [(NH₄)₂SO₄], 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. 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; luego se centrifugó a 4000 rpm, durante 30 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió y dializó en agua bidestilada hasta eliminar el exceso de sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄. Para comprobar que se ha eliminado todo el sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄ se usó cloruro de bario (BaCl₂), 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 peroxidasa de nabo.

Determinación de la Concentración de las Proteínas en la Peroxidasa³³

Se trabajó con el método colorimétrico de Bradford. El dosaje se realizó por triplicado. Para la curva de calibración se usará como estándar seroalbúmina bovina (BSA).

Cálculo de la Actividad Específica de la Peroxidasa

La Actividad Específica se calculó dividiendo el valor de las unidades de actividad enzimática presentes en 1 mL, entre los mg de proteína existente en 1 mL de la suspensión de peroxidasa.

Remoción de compuestos fenólicos³⁴

Para evaluar la remoción de los compuestos fenólicos, se prepararon 3 mL de una solución buffer de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,0 que contenía 50 μ L del extracto rudo de POD y otro sistema con solución parcialmente purificada, alícuotas de 25 μ L el agua residual sintética – contaminante fenólico (20,1 mM de fenol). Se agregaron 300 μ L peróxido de hidrógeno en una concentración de 12,3 mM e inmediatamente se colocaron en agitación a 25°C durante 20 horas. Se realizaron registros de espectros de absorción y luego se centrifugaron y se separaron los polímeros fenólicos de la POD y se lavaron con una solución de NaCl 2M y buffer fosfato 0,01 M - pH 7,0. El porcentaje de remoción del fenol se determinó a partir de su espectro de absorción UV (Espectrofotómetro GÉNESIS 10 UV) antes y después del proceso de polimerización a una longitud de onda de 270 nm antes y después de haber centrifugado.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se observan los datos obtenidos de la Peroxidasa (POD) de nabo (*Brassica napus* L.) relacionada con el peso de muestra, concentración de proteínas, actividad enzimática y actividad específica. Así, 1g de muestra de **extracto crudo** contiene hay 9,06 mg.mL⁻¹ de proteínas, 928,26 unidades de enzima (POD) y una actividad específica de 102,45, y 1 g de POD parcialmente purificada contiene 2,63 mg.mL⁻¹ de proteínas, 512,70 unidades de enzima (POD) y una actividad específica de 194,94 respectivamente.

En la Tabla 2, se muestra el porcentaje de remoción de fenol por la Peroxidasa de *B. napus* L. “nabo” en extracto crudo y parcialmente purificada con [(NH₄)₂SO₄] al 90%, encontrándose un 61,35% y un 66,66% respectivamente.

Tabla 1: Unidades de Peroxidasa y Actividad específica de *Brassica napus* L. “nabo” relacionada con peso de muestra y concentración de proteínas.

Muestra (raíz, g)	Proteínas (mg . mL ⁻¹)	Unidades enzima U . mL ⁻¹	Actividad específica U . mg ⁻¹
1, Extracto crudo POD	9,06	928,26	102,45
1, Purificación parcial [(NH ₄) ₂ SO ₄]	2,63	512,70	194,94

DISCUSIÓN

La diversidad de hortalizas cultivables y silvestres que crecen en Trujillo-Perú, es muy grande. La mayor parte de éstas especies, en la región, no ha sido estudiada ni biológica ni bioquímicamente. Para evaluar el contenido de Peroxidasa (POD) en hortalizas a fin de encontrar fuentes para la obtención preparativa de esta enzima, se seleccionó la raíz de *Brassica napus* L. (nabo), donde se obtuvo actividades específica del extracto crudo 102,45 U-POD / mg proteína, valor de importancia frente aquellos encontrados en otras fuentes de plantas tropicales⁶. Es indudable que un proceso de purificación más profundo eleva el contenido de enzima en la muestra (precipitación con sulfato de



amonio 90% = 194,94 U-POD / mg proteína); además, si es que se toma en cuenta que en el proceso de purificación se eliminan contaminantes proteicos no enzimáticos y se eleva la concentración relativa de la POD.

Tabla 4: Porcentaje de remoción de fenol por la Peroxidasa (POD) de *Brassica napus* L. "nabo".

Contaminante	POD	Absorbancia		% Remoción
Fenol (λ : 270 nm)	<i>Extracto crudo</i>	Inicial: 0,282 (absorbancia al tiempo cero min ó antes de iniciar la reacción)	Final: 0,109 (se filtró después de 20 horas de iniciada la reacción)	61,35
	<i>Purificación parcial en [(NH₄)₂SO₄]- 90%</i>	Inicial: 0,282 (absorbancia al tiempo cero min ó antes de iniciar la reacción)	Final: 0,094 (se filtró después de 20 horas de iniciada la reacción)	66,66

Un punto a destacar de esta investigación, es que el empleo de la POD no sólo se limitaría a cuestiones ambientales, ya que la alta calidad y pureza con la que se puede obtener esta enzima la convierte en candidata para utilizarla también en cuestiones clínicas. Cabe resaltar que se ha obtenido una POD a bajo costo, con el fin de utilizarla para la remoción de contaminantes del agua de tipo fenólico, y con ello contribuir con una alternativa viable y barata para tratar las aguas residuales de dicho sector. Aún no se ha logrado cumplir tales propósitos en un 100%, sin embargo, se ha obtenido una enzima similar en características a la peroxidasa patrón de Horseradish, la cual de acuerdo con reportes científicos internacionales es ampliamente utilizada por su versatilidad en diferentes procesos.

La capacidad de la POD en la eliminación de fenol presente en un agua residual sintética, se encuentra entre un 61,35 y 66,66% para el extracto crudo y la solución parcialmente purificada de POD, lo que demuestra que el nabo es una excelente fuente para extraer POD con buena capacidad para eliminar dicho aromático en estudio.

La remoción del 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 la inactivación de la POD sería causada por las altas concentraciones de radicales libres que se generan en la reacción, por lo que la falta de peróxido de hidrógeno no es un factor limitante de la conversión del fenol. Por otro lado, es importante mencionar que a concentraciones bajas de fenol, éste no es removido completamente ni tampoco se vería favorecido por la prolongación de tiempo de reacción.

Es importante continuar el estudio de la POD de nabo en su aplicación con otros compuestos fenólicos tóxicos como el pentaclorofenol y aminas aromáticas, entre otros contaminantes tan peligrosos para nuestro medio ambiente.

También será importante lograr la purificación total de la peroxidasa de nabo (*Brassica napus* L.) y su almacenamiento sin pérdida de actividad enzimática, ya que esta enzima abre un amplio campo para su aplicación en la industria química, de los alimentos y en la medicina.

CONCLUSIONES

- La raíz de nabo es una fuente vegetal importante para extraer peroxidasa.
- La peroxidasa de nabo presenta una importante capacidad para remover el fenol de un agua residual sintética.
- No sería necesaria un proceso de purificación de la peroxidasa de nabo para ser utilizada en la remoción de fenol.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Krylov SN, Dunford HB. Reaction of horseradish peroxidase with indole-3-acetic acid. *Plant Peroxidases. Biochemistry and Physiology*, Univ. Agricultura, Viena y Univ. Geneva: Geneva-Vienna. 1996.
2. Farrell RL, Murtagh KE, Tien M, Mozuch MD, ET AL. Physical and enzymatic properties of lignin-peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb Technol* 1989; 11, 322.
3. Wakamatsu K, Takahama U. Changes in peroxidase activity and in peroxidase isoenzymes in carrot callus. *Physiol Plants* 1993; 88: 167.
4. Tijssen P. *Practice and Theory of Enzyme Immunoassay*, Elsevier: Amsterdam. 1985.
5. Munteanu FD, Lindgren A, Emnéus J, Gorton L, et al. Bioelectrochemical monitoring of phenols and aromatic amines in flow injection using novel plant peroxidases. *Anal Chem* 1998; 70: 2596.
6. Sakharov IY, Bautista G, Sakharova IV, Rojas A, Pletjuschjina OY. Peroxidasa de plantas tropicales. *Rev Colombiana de Química* 2001; 28: 1.
7. Mejía CL, Regalado C, García B. Purificación de peroxidasa de nabo. *J Agric & Food Chem* 2003; 51: 45-51.
8. Duarte-Vázquez MA. Purificación, caracterización bioquímica y estudios de cristalización de peroxidasa de nabo. PROPAC, UAQ, Querétaro, (Méjico). 2002.
9. Regalado C, García-Almendárez BE, Duarte-Vázquez MA. Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochem Rev* 2004; 3(1-2): 243-256.
10. Ortega M, Duarte-Vázquez MA, García BE, Regalado C. Eliminación de Compuestos fenólicos mediante su polimerización catalizada por peroxidasa de nabo (*Brassica napus* L. Var. purple top white globe). UAQ. Querétaro, (Méjico). 2003.
11. Regalado C, Quintanilla F, García BE. Immobilization of turnip peroxidase for phenolic compounds removal from a model aqueous system by oxidative polymerization. IFT Annual Meeting. Las Vegas, NV, USA. 2004. July 12-16, 250.
12. Mota JD, Quintanilla F, Regalado C. Inmovilización de peroxidasa de nabo para remoción de compuestos fenólicos de un sistema acuoso modelo por polimerización oxidativa. PROPAC. UAQ. Querétaro (Méjico). 2004.
13. Arroyo M. Inmovilización de enzimas, fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 1988. 39:2, 23-39.
14. Godfrey T, West S. *Industrial Enzymology*. Mac Millan Press. Ltda. London, England. 1996
15. Dawson, J.H. Probing structure-function relations in heme-containing oxygenases and peroxidases. *Science*. 1988. 240, 433 – 439.
16. Li HY, Poulos TL. Structural variation in heme enzymes: A comparative analysis of peroxidase on P450 crystal structure. 1994; 2: 461-464.
17. Valderrama B, Ayala M, Vázquez-Duhalt R. Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chem & Biol* 2002; 9: 555-565.
18. Wariishi H, Gold MH. Lignin peroxidase compound III. Mechanism of formation and decomposition. *J Biol Chem* 1990; 265: 2070-2077.
19. Welinder KG. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidase. *Curr Opin Struct Biol* 1992; 2: 388-393.
20. Kimura S, Ikeda-Saito M. Human myeloperoxidase and thyroid peroxidase, two enzymes with separate and distinct physiological functions, are evolutionarily related members of the same gene family-proteins. 1988; 3: 113-120.
21. Welinder KG, Gajhede M. Structure and evolution of peroxidases. University of Copenhagen and University of Geneva, Geneva. 1993.
22. Finzel BC; Poulos TL, Kraut J. Crystal structure of yeast cytochrome C peroxidase. *Biol Chem* 1984; 259: 13027-13036.
23. Vitello LB, Erman JE, Millar MA, Wang J, Krant J. Effect of arginine-48 replacement on the reaction between cytochrome c peroxidase and hydrogen peroxide. *Biochem* 1993; 32: 9807-9818.
24. Erman JE, Vitello LB, Millar MA, Shaw A, et al. Histidina 52 is a critical residue for rapid formation of cytochrome c peroxidase compound I. *Biochem* 1993; 32: 9798-9806.



25. Edwards SL, Xuong NH, Hamlin RC, Krant J. Crystal structure of cytochrome C peroxidase compound I. *Biochem* 1987; 26: 1503-1511.
26. Banci L. Structure properties of peroxidase. *J. Biotech.* 1997. 53, 253 – 263.
27. Poulos TL, Patterson WR, Sundaramoorthy M. The crystal structure of ascorbate and manganese peroxidase: The role non- haem metal in the catalytic mechanism. *Biochem Soc Trans* 1995; 23: 228-232
28. Fang H, Chen O. The cytochromes. *Water Res* 1997; 31: 2229-2242.
29. Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas (IPCS). FENOL ICSC: 0070. Fichas Internacionales de Seguridad Química. 1992.
30. Cerna L. Determinación del período crítico de competencia de las malezas con el cultivo de nabo (*brassica napus* L.) en la costa liberteña. *Rev. Antenor Orrego, Trujillo.* 2003. 14(21); 15-28.
31. Mostacero J, Mejia F, Gamarra O. Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú, Trujillo. 2002.
32. Civello PM, Martínez GA, Chaves AR, Añon MC. Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch): Partial purification and determination of some properties. *J Agric Food Chem* 1995; 43: 2596.
33. Bradford MM. A rapid and sensitive Method for the quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochem* 1976; 72: 248-254.
34. Duarte-Vázquez MA, Ortega-Tovar MA, García-Almendárez BE, Regalado C. Removal of aqueous phenolic compounds from a model system by oxidative polymerization with turnip (*Brassica napus* L. var purple top white globe) peroxidase. *J Chem Technol Biotechnol* 2003; 78(1): 42-47.