



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCÁTALISIS

**TRANSFORMACIÓN DE PLAGUICIDAS POR EL
SISTEMA LACASA-MEDIADOR DE *Coriolopsis gallica***

T E S I S

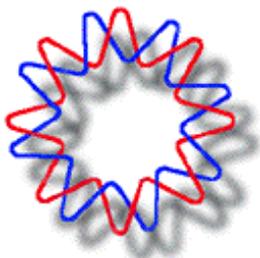
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

M A E S T R O E N C I E N C I A S

P R E S E N T A

I. Q. Cristina del Carmen Torres Duarte

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Rafael Vázquez Duhalt



CUERNAVACA, MORELOS.

2009



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.

Ley de Fapple

(Sobre la perversión de los objetos inanimados)

De todo objeto inanimado, prescindiendo de su composición, configuración o propósito, se puede esperar que actúe en cualquier momento de forma totalmente insospechada, ya sea por razones enteramente oscuras o más bien absolutamente misteriosas.

Agradecimientos

Al Dr. Rafael Vázquez Duhalt, por su valioso apoyo e invaluable orientación durante la realización de este proyecto. Gracias por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación.

A los miembros del comité tutorial, Dr. Edmundo Castillo Rosales, Dr. Leobardo Serrano Carreón y Dr. Rafael Vázquez Duhalt, por contribuir a mi formación con sus aportaciones durante la realización de este proyecto.

A los miembros del jurado, Dr. Mario Rocha Sosa, Dr. Alfredo Martínez Jiménez, Dra. María del Refugio Trejo Hernández y Dr. Jorge Luis Folch Mallol. Su minuciosa revisión y crítica contribuyeron a mejorar este trabajo.

Al M. B. Raunel Tinoco Valencia y a la Biol. Rosa Román Miranda, por su valioso apoyo técnico, paciencia y amistad durante la estancia en el laboratorio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (170935) por la beca otorgada para la realización de los estudios de Maestría en Ciencias Bioquímicas.

A mis papás, por estar siempre conmigo, por educarme y enseñarme a nunca conformarme. Siempre mi fortaleza.

A mis hermanas Susy y Luly, y mis cuñados Richie y Edel, por ser siempre un buen ejemplo, guía y apoyo.

A Tita, Mimí, Kikito y Galita, niños preciosos, por ser una gran motivación para ser mejor y heredarles un mundo digno para ustedes.

A Jonathan, por tu cariño a pesar de la distancia.

A mis compañeros de laboratorio y amigos Adri, Lore, Rau, Liz, Alexis, Abraham, Julio, Cris, Javier, Bere, Martha, Sergio, Marco, Eli, Marce, Rosa y Lucía, por hacer de mi estancia en este laboratorio una de las mejores etapas de mi vida.

A mis amigos Oscar, Pol, Chío, Magda, Alexis, Miguel, Juan Carlos y David, por estar conmigo en las buenas y en las malas, y hacerme sentir como en casa.

ÍNDICE GENERAL

Índice general	I
Índice de tablas	III
Índice de figuras	IV
Resumen	VI
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. Plaguicidas	3
2.1.1. Degradación de plaguicidas	5
2.1.2. Degradación enzimática de plaguicidas	7
2.2. Lacasas	8
2.2.1. Lacasa de <i>Coriolopsis gallica</i>	10
2.3. Mediadores redox	11
3. Hipótesis	16
4. Objetivos	16
4.1. Objetivo general	16
4.2. Objetivos particulares	16
5. Protocolo experimental	17
5.1. Materiales	17
5.1.1. Enzima	17
5.1.2. Reactivos	17
5.1.3. Equipo	17
5.2. Métodos	18
5.2.1. Caracterización de la lacasa	18
5.2.2. Transformación de plaguicidas	18
5.2.3. Medición de potencial redox	20

5.2.4. Identificación de los productos de transformación.....	20
6. Resultados y Discusión	22
6.1. Caracterización de la lacasa	22
6.2. Selección del mediador	23
6.3. Caracterización de la transformación del siringaldehído por la lacasa	26
6.3.1. Actividad enzimática de la lacasa sobre el siringaldehído.....	26
6.3.2. Identificación de los productos de transformación.....	28
6.4. Ensayos de transformación de los plaguicidas por el sistema lacasa-siringaldehído	33
6.5. Identificación de los productos de transformación por el sistema lacasa-siringaldehído.....	39
6.5.1. Bromoxinil.....	39
6.5.2. Diclorofen	42
6.6. Efecto de la relación mediador:plaguicida en la transformación del diclorofen	51
7. Conclusiones.....	57
8. Perspectivas	59
9. Bibliografía	60
10. Apéndices.....	65
10.1. Información general de algunos plaguicidas.....	65
10.2. Masas de algunas pérdidas comunes de iones moleculares en espectrometría de masas	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los principales plaguicidas.....	4
Tabla 2. Longitudes de onda utilizadas para el monitoreo de las reacciones de transformación.	19
Tabla 3. Actividades de transformación de diferentes plaguicidas por acción de la lacasa utilizando diferentes mediadores.....	25
Tabla 4. Potencial redox de los plaguicidas transformados por el sistema lacasa-siringaldehído.	35
Tabla 5. Energías de disociación de enlace del hidrógeno fenólico de los plaguicidas transformados por el sistema lacasa-siringaldehído.	37
Tabla 6. Actividad enzimática de la lacasa sobre la siringaldazina en presencia de DMBQ.	38
Tabla 7. Distribución de pesos moleculares de los compuestos presentes en el extracto de reacción del diclorofen.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo catalítico de la lacasa.....	10
Figura 2. Estructura del sitio catalítico de la lacasa de <i>Coriolopsis gallica</i> UAMH 8260	11
Figura 3. Ciclo catalítico del sistema lacasa-mediador.....	12
Figura 4. Ejemplos de mediadores de la lacasa.....	12
Figura 5. Ruta de transferencia de electrones (ET).....	13
Figura 6. Ruta de transferencia de radical hidrógeno (HAT).....	14
Figura 7. Análisis de la muestra de lacasa por SDS-PAGE	22
Figura 8. Gel de actividad de la lacasa contra ABTS.	23
Figura 9. Mediadores ensayados	24
Figura 10. Comparación del cromatograma control y de la reacción de transformación del siringaldehído por la lacasa.	26
Figura 11. Actividad enzimática de la lacasa en la transformación del siringaldehído.....	28
Figura 12. Espectro de masas y patrón de fraccionamiento para la DMBQ.....	29
Figura 13. Espectro de masas y patrón de fraccionamiento para el 2,6- dimetoxibenceno-1,4-diol.	30
Figura 14. Mecanismo propuesto para la oxidación del siringaldehído por acción de la lacasa.....	30
Figura 15. Curva estándar de DMBQ.....	31
Figura 16. Producción de DMBQ por acción de la lacasa sobre el siringaldehído.....	32
Figura 17. Aparición de producto por acción de la lacasa sobre el siringaldehído.....	33
Figura 18. Estructura química de los plaguicidas analizados.....	34
Figura 19. Actividad de transformación de los plaguicidas diclorofen, niclosamida, bromoxinil, y bromofenoxim por el sistema lacasa- siringaldehído.....	34
Figura 20. Correlación entre el potencial redox y la actividad máxima de los plaguicidas transformados por el sistema lacasa-siringaldehído.	36
Figura 21. Correlación entre la energía de disociación de enlace del hidrógeno fenólico y la actividad máxima de transformación de los plaguicidas.	37
Figura 22. Comparación del cromatograma control y de la reacción de transformación del bromoxinil por el sistema lacasa-siringaldehído.	39

Figura 23. Estructura propuesta para el producto de transformación del bromoxinil y su patrón de fraccionamiento obtenido por espectrometría de masas.....	40
Figura 24. Mecanismo propuesto para la transformación del bromoxinil por el sistema lacasa-siringaldehído.	41
Figura 25. Comparación del cromatograma control y de la reacción de transformación del diclorofen por el sistema lacasa-siringaldehído.	42
Figura 26. Estructura propuesta para el producto de reacción del diclorofen y su patrón de fraccionamiento obtenido por espectrometría de masas.	43
Figura 27. Mecanismo propuesto para la transformación del diclorofen por el sistema lacasa-siringaldehído.	44
Figura 28. Cromatograma del extracto de reacción de la transformación del diclorofen analizado por GC.....	45
Figura 29. Estructura propuesta para el producto de PM 290 y su patrón de fraccionamiento obtenido por espectrometría de masas.....	46
Figura 30. Estructura propuesta para el producto de PM 324 y su patrón de fraccionamiento obtenido por espectrometría de masas.....	47
Figura 31. Estructura propuesta para el producto de PM 320 y su patrón de fraccionamiento obtenido por espectrometría de masas.....	47
Figura 32. Estructura propuesta para el producto de PM 306 y su patrón de fraccionamiento obtenido por espectrometría de masas.....	48
Figura 33. Estructura propuesta para el producto de PM 282 y su patrón de fraccionamiento obtenido por espectrometría de masas.....	49
Figura 34. Estructura propuesta para el producto de PM 264 y su patrón de fraccionamiento obtenido por espectrometría de masas.....	49
Figura 35. Productos de transformación del diclorofen identificados por GC-MS.....	50
Figura 36. Comparación del cromatograma control y de la reacción de transformación de diclorofen por el sistema lacasa-siringaldehído.	52
Figura 37. Actividad de transformación del diclorofen, a diferentes proporciones de mediador:sustrato.	53
Figura 38. Producción de DMBQ, a diferentes proporciones de mediador:sustrato.	54
Figura 39. Aparición de producto a diferentes proporciones de mediador:sustrato	54
Figura 40. Aparición de productos relacionados con el diclorofen, a diferentes proporciones de mediador:sustrato.....	55

RESUMEN

La contaminación por plaguicidas es un fenómeno que afecta a todos los ecosistemas. Estos compuestos se distribuyen a lo largo de la cadena alimenticia y ejercen sus efectos negativos en los organismos, entre los que sobresalen el cáncer, malformaciones y modificaciones en la reproducción. Además, son compuestos recalcitrantes, por lo que es necesario encontrar diferentes alternativas para su degradación. Las enzimas purificadas producidas por hongos ligninolíticos han resultado ser especialmente eficientes en la degradación de compuestos recalcitrantes. Entre ellas, la lacasa sobresale por ser la más adecuada para su uso a gran escala debido a que sólo requiere de oxígeno para llevar a cabo la catálisis. Aunque su aplicación se ha visto limitada por tener un bajo potencial redox en comparación con las peroxidasas, su rango de sustratos se puede ampliar utilizando mediadores, los cuales pueden oxidar compuestos por mecanismos que no están disponibles para la enzima.

En este trabajo exploramos el uso de diferentes mediadores para la transformación de plaguicidas organohalogenados. Entre los distintos mediadores estudiados, las mayores actividades de transformación se obtuvieron con los mediadores naturales acetosiringona y siringaldehído. Utilizando el sistema lacasa-siringaldehído fue posible transformar los plaguicidas bromoxinil, niclosamida, bromofenoxim y diclorofen. Para el diclorofen se encontró que uno de los productos de transformación se obtiene como resultado de una deshalogenación oxidativa, el cual es un proceso muy interesante en la biorremediación porque puede ser aplicado en la transformación de contaminantes halogenados, que son compuestos muy tóxicos y recalcitrantes. Tanto para el diclorofen como para el bromoxinil se encontró la formación de aductos entre el siringaldehído y los plaguicidas. Esta reacción sugiere que *in situ*, los plaguicidas podrían unirse a los componentes del humus del suelo, y de esta manera disminuir su movilidad en el ambiente y por consiguiente, su toxicidad. Por lo anterior, el sistema lacasa-mediador se presenta como una alternativa atractiva para la transformación de plaguicidas organohalogenados.

1. Introducción.

La población mundial está en constante crecimiento y por ende, la demanda de alimentos. La agricultura enfrenta el reto de obtener altas tasas productivas para lo cual ha recurrido al uso de sustancias exógenas, que aunque benéficas a corto plazo, ejercen un efecto negativo en el ambiente. Este problema es especialmente significativo en México por ser un país con una importante actividad agrícola.

Los plaguicidas causan numerosos problemas, entre los que destacan su acumulación y persistencia en el ambiente además del riesgo que representan para la salud humana. El panorama no parece mejorar ya que las plagas van generando resistencia y cada vez se requiere de sustancias químicas más sofisticadas, lo que va aunado a su resistencia a la degradación.

El efecto negativo de los plaguicidas fue especialmente evidente con el caso del DDT, uno de los plaguicidas más conocidos. A partir de 1939 se utilizó de forma masiva para combatir a los insectos transmisores del tifus y de la malaria. Para los años setenta se prohibió su uso tras demostrarse los efectos negativos que ejercían sobre diferentes especies, incluyendo el humano. Sin embargo, el DDT es un plaguicida muy recalcitrante a la degradación y, después de su prohibición en muchos países, todavía se pueden encontrar rastros en diferentes ecosistemas. Aunque los plaguicidas que se utilizan en la actualidad están diseñados para ser menos persistentes, es importante explorar alternativas para degradar los restos que se han acumulado por años así como estrategias eficientes y amigables con el ambiente para restaurar los sitios contaminados.

Se ha estudiado ampliamente la eliminación de plaguicidas empleando desde tratamientos fisicoquímicos hasta la biorremediación. La fitorremediación es una opción atractiva, pero su aplicación se ha visto limitada porque es un proceso que puede tomar años en lograr resultados significativos. En los últimos años, ciertos tipos de hongos han captado el interés de diversos grupos de investigación. En particular, los hongos ligninolíticos han mostrado ser eficientes en la degradación de gran variedad de compuestos recalcitrantes

gracias a su batería de enzimas extracelulares que incluyen a la lignino peroxidasa, la manganeso peroxidasa, la peroxidasa versátil y la lacasa.

La lacasa ha sido aplicada en la transformación de gran variedad de xenobióticos por tener baja especificidad de sustrato y por utilizar oxígeno como aceptor final de electrones. Desafortunadamente tiene un potencial redox más bajo que las peroxidasas, lo que limita su capacidad de transformar sustratos más persistentes. Este problema se ha solucionado a través del uso de mediadores de oxido-reducción, que son moléculas pequeñas que permiten oxidar este tipo de sustratos por mecanismos que no están disponibles para la lacasa.

En este trabajo exploramos la transformación de plaguicidas halogenados utilizando la lacasa del hongo *Coriolopsis gallica* como una alternativa de biorremediación. Así mismo, exploramos la búsqueda de nuevos mediadores que mejoren la transformación de estos compuestos de interés ambiental.

2. Antecedentes.

2.1. Plaguicidas.

Un plaguicida se define como cualquier producto químico destinado a combatir parásitos, animales o plantas, que amenacen los cultivos agrícolas, la ganadería o la salud humana. De esta definición se excluyen los medicamentos y productos farmacéuticos, y se consideran sólo los productos que se emplean para combatir parásitos externos [1].

Desde su aparición en el mercado en el siglo XIX, los plaguicidas sintéticos han sido utilizados extensivamente tanto en la agricultura como para combatir insectos y otros animales vectores de enfermedades transmisibles [2]. Sin embargo, su uso indiscriminado ha ido acompañado de efectos adversos debido a su persistencia en el ambiente, su bioacumulación en la cadena alimenticia y los riesgos que representan para las especies no blanco. Aunque la mayoría de los nuevos plaguicidas son menos persistentes o bioacumulables, algunos son más móviles en el ambiente. Se calcula que sólo el 5% de los plaguicidas atacan a su organismo blanco; el resto es arrastrado al agua o se disipa en el suelo o el aire [3]. Muchos de los plaguicidas utilizados en el suelo pueden terminar contaminando ambientes acuáticos. Incluso se han encontrado rastros de plaguicidas en lluvia, niebla y nieve [4].

Hay diversas maneras de clasificar a los plaguicidas. Con base en el organismo sobre el que actúan, los plaguicidas se clasifican en insecticidas, acaricidas, herbicidas, raticidas, fungicidas, nematocidas, moluscicidas, entre otros [5]. También se clasifican con relación a la familia química que suministra mayor información sobre su toxicidad. En general, se tiende a hacer una clasificación combinando ambos criterios [2].

Tabla 1. Clasificación de los principales plaguicidas.

Insecticidas	Organoclorados
	Organofosforados
	Carbamatos
	Piretroides
Fungicidas	Organoclorados
	Organomercuriales
Herbicidas	Bipiridílicos
	Organoclorados
	Otros
Raticidas	Dicumarínicos

Los efectos adversos en la salud que se presentan por la exposición a plaguicidas son diversos, como problemas respiratorios, desórdenes en la memoria, daños dermatológicos, cáncer, depresión, déficit neurológico, abortos, y defectos de nacimiento [6].

La mayoría de los plaguicidas, incluyendo los organofosforados, carbamatos y organoclorados, pueden ser neurotóxicos, pero los organofosforados han sido diseñados con ese fin; incluso, son usados como armas químicas [7]. Estos plaguicidas son de vida corta en el ambiente y de acción rápida sobre su organismo blanco. Afectan primariamente el sistema nervioso al inhibir la enzima acetilcolinesterasa, cuya función principal es el rompimiento del neurotransmisor acetilcolina. Al acumularse este metabolito, se incrementa la transmisión de impulsos nerviosos lo que lleva al desgaste del nervio, y finalmente a la falla general del sistema nervioso [8].

De los plaguicidas citados en la Tabla 1, hacemos especial referencia a los insecticidas organoclorados por su importancia comercial y ambiental. Son compuestos aril, carbocíclicos o heterocíclicos que actúan como insecticidas de ingestión y de contacto. Fueron los primeros insecticidas químicos orgánicos utilizados de forma masiva a escala internacional por ser muy eficaces y económicos. Actualmente su uso se ha visto muy restringido en los países

desarrollados tras comprobarse su capacidad de bioacumulación y persistencia ambiental [2].

Aunque las intoxicaciones agudas por plaguicidas organohalogenados son cada vez más raras a medida que se van desplazando del mercado, todavía se registran casos de intoxicaciones leves por la ingesta de alimentos con residuos de plaguicidas. Se han referido diversos síntomas asociados a la exposición a largo plazo como dermatitis, alteraciones digestivas (náuseas y vómitos), astenia, irritación de las mucosas respiratorias y conjuntivales, y síntomas neurológicos (cefaleas, vértigo y pérdida de equilibrio) [2]. Su bioacumulación está favorecida por su alta liposolubilidad y porque las vías metabólicas no permiten su eliminación. Se absorben por la piel y por las vías respiratoria y digestiva. Son muy afines a los tejidos grasos donde tienden a acumularse en proporción inversa al grado de biotransformación orgánica y de excreción. Además del tejido adiposo, se concentran en otros tejidos ricos en grasas neutras como la glándula adrenal, manifestando un efecto estrogénico [2].

Las intoxicaciones agudas por plaguicidas pueden tratarse con una evacuación gástrica; hasta ahora no existe algún tratamiento antidótico y muchas veces los tratamientos de eliminación son ineficaces. En muchos países en desarrollo como México donde aún se usan plaguicidas organohalogenados que se han prohibido en otros países, las intoxicaciones no son raras; esto, aunado a su persistencia en el ambiente y su amplia distribución, hacen que la exposición a estos compuestos sea un riesgo latente. Es entonces que la degradación de éstos plaguicidas cobra vital importancia.

2.1.1. Degradación de plaguicidas

Se han estudiado diversas estrategias para la degradación de plaguicidas en el suelo, siendo las tres más importantes las reacciones fotoquímicas, la degradación abiótica y la biodegradación [9].

Existe una gran variedad de trabajos referentes a la fotodegradación de plaguicidas. En general, las estrategias de fotodegradación se basan en la transferencia de energía a la molécula para llevarla a un estado excitado a partir

del cual puede sufrir, entre otros procesos, homólisis, heterólisis o fotoionización. La energía que reciben por la luz del sol suele ser tan baja que es necesario irradiar directamente al plaguicida con luz UV lo que aumenta considerablemente el costo del tratamiento. Es posible transferir la energía necesaria al plaguicida utilizando compuestos que se excitan a longitudes de onda mayores; este proceso se conoce como fotosensibilización, pero al igual que los procesos fotocatalíticos, presentan el inconveniente de que los compuestos intermediarios utilizados (fotosensibilizadores o metales catalíticos) suelen ser biotóxicos. También se pueden utilizar procesos de oxidación avanzados, que consisten en la abstracción de un electrón o de un radical hidrógeno del plaguicida por un radical OH^{\bullet} obtenido por la fotólisis de algún compuesto intermediario como ozono o peróxido de hidrógeno. El problema que se presenta en este caso es que los productos de reacción pueden ser tanto o más peligrosos que los propios plaguicidas [10]. Aunque con estos procesos se logran altas tasas de transformación, presentan el inconveniente de ser costosos e incluso nocivos para el ambiente.

Hasta ahora, la remoción de contaminantes mediante microorganismos o plantas tiene como principal limitante su escasa habilidad para crecer en ambientes altamente contaminados con químicos orgánicos e inorgánicos. Además, la naturaleza hidrofóbica de la mayoría de los plaguicidas es un obstáculo importante para su absorción por microbios o plantas [4]. Aunque las plantas poseen mecanismos enzimáticos muy útiles para degradar muchos plaguicidas, su aplicación ha sido principalmente para la bioextracción de contaminantes inorgánicos como lo son metales pesados. Dado que el crecimiento de las plantas depende de diversos factores ambientales como disponibilidad de nutrientes y agua, tipo de suelo, pH, entre otros, los máximos beneficios de la fitorremediación pueden lograrse en aplicaciones a largo plazo [11].

Por otro lado, las bacterias de los géneros *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Burkholderia* y *Pseudomonas* se han utilizado en procesos de biorremediación. Sin embargo, las condiciones anaeróbicas a las que están expuestas en el suelo genera bajas tasas de supervivencia [4]. Además, la presencia de otros contaminantes pueden inhibir el crecimiento y la actividad de

las comunidades microbianas. Es por ello que se ha explorado la utilización de enzimas aisladas de los organismos capaces de transformar los plaguicidas.

2.1.2. Degradación enzimática de plaguicidas

Existe una gran variedad de enzimas aisladas de diferentes especies de bacterias y hongos capaces de degradar diferentes tipos de plaguicidas [8, 12]. Por ejemplo, las carboxilesterasas (CbEs) son eficientes en la degradación de carbamatos y piretroides al hidrolizar ésteres carboxílicos [13].

Entre los diferentes tipos de plaguicidas, los organofosforados son los más biodegradables por lo que ha sido relativamente más fácil aislar enzimas capaces de degradarlos. Por ejemplo, del género de bacterias *Agrobacterium* ha sido posible aislar enzimas degradadoras de organofosforados, las cuales se modificaron para expandir el rango de sustratos hacia organofosforados alifáticos [14]. Las fosfotriesterasas (PTE) son las enzimas más estudiadas en la degradación de organofosforados por su alta eficiencia y actualmente se estudia su aplicación en la producción de antídotos contra intoxicaciones, la biorremediación de materiales de desecho, la biodegradación de residuos de plaguicidas y el desarrollo de biosensores de organofosforados [12]. Diferentes tipos de hidrolasas también juegan un papel importante en la degradación de plaguicidas organofosforados, como la organofosforado hidrolasa (OPH) de *Pseudomonas diminuta* MG y *Flavobacterium* sp., y la hidrolasa OPCH2 de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* [13, 15].

Los hongos ligninolíticos, también llamados de la pudrición blanca, mineralizan la lignina, un compuesto extremadamente recalcitrante, por medio de un proceso oxidativo obligadamente aeróbico. Este proceso está basado en la producción de radicales libres generados por la acción de enzimas extracelulares, llamadas enzimas modificadoras de la lignina que incluyen a la lignino peroxidasa, la manganeso peroxidasa, la peroxidasa versátil y la lacasa [16, 17]. Estas enzimas han resultado eficientes en la transformación de un gran número de xenobióticos incluyendo hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), fenoles clorados, bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas, compuestos organofosforados,

nitrotoluenos, cloroanilinas, colorantes, y otros compuestos que representan un riesgo para el ambiente [17], por lo que resultan atractivas para la transformación de plaguicidas. La peroxidasa versátil del hongo ligninolítico *Bjerkandera adusta* mostró ser capaz de transformar plaguicidas organohalogenados a través de una deshalogenación oxidativa [3].

La lacasa es de especial interés porque a diferencia de las peroxidases, no requiere de peróxido para llevar a cabo la catálisis por lo que resulta más atractiva para su aplicación a gran escala. Sin embargo, hasta ahora su aplicación en la transformación de plaguicidas ha sido posible sólo cuando se ha utilizado junto con el mediador ABTS. Utilizando este sistema, se logró la transformación del agente nervioso VX, del insecticida análogo diisopropil-amiton y del plaguicida dymron [18, 19].

2.2. Lacasas.

La lacasa (EC 1.10.3.2, *p*-difenol:dioxígeno oxidorreductasa) debe su nombre a que fue primeramente aislada del árbol de laca, *Rhus vernicifera* [20]. La presencia de lacasa en otras plantas superiores es escasa. También se ha aislado de algunas bacterias, pero principalmente se encuentra en hongos [21].

La lacasa fúngica típica es una proteína de aproximadamente 60-70 kDa con un punto isoeléctrico ácido de alrededor de pH 4.0, con un óptimo de actividad entre 50°C y 70°C [22]. Es una glicoproteína cuya porción de carbohidratos consiste, en la mayoría de los casos, de manosa, N-acetilglucosamina y galactosa, y constituye cerca del 45% de la masa en las lacasas de plantas y entre el 10% y el 20% en las lacasas fúngicas. Se ha propuesto que la glicosilación es responsable de la estabilidad estructural de la enzima. También se ha dicho que protege a la enzima de la proteólisis y la inactivación por radicales libres [23].

La lacasa pertenece al grupo de oxidasas cobre-azul. Es una enzima monomérica que usualmente contiene 4 átomos de cobre unidos a 3 sitios redox, clasificados de acuerdo a sus características espectroscópicas [24]:

1. Sitio tipo 1 (T1) mononuclear, cuyas características espectroscópicas y electrónicas son similares a la de los centros cobre azules que se encuentran en las proteínas de transferencia de electrones. Su presencia le confiere el color azul a la enzima en solución y se caracteriza por una banda de absorción a 600 nm ($\epsilon \sim 5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, [23]). En ausencia del cobre responsable del color, se llaman lacasas amarillas o blancas [22].
2. Sitio tipo 2 (T2) mononuclear, que presenta una geometría metálica trigonal y propiedades de resonancia paramagnética nuclear comparables con los complejos tetragonales de Cu(II).
3. Sitio tipo 3 (T3) dinuclear, con un estado basal diamagnético que se origina del acoplamiento antiferromagnético fuerte entre los dos iones Cu(II), debido a la presencia de un ión hidroxilo que puentea.

El potencial redox de la lacasa depende del organismo de origen, variando entre 0.5 y 0.8 V [25]. Se ha propuesto que el ligando axial que coordina al cobre T1 es el responsable del potencial redox. Cuando la fenilalanina es el residuo axial, la enzima es de alto potencial redox, mientras que las de medio y bajo potencial tienen una leucina o una metionina, respectivamente; sin embargo, al hacer mutaciones en estos residuos, no se ven cambios significativos en los potenciales [23]. Piontek y colaboradores [26] sugieren que la distancia del enlace entre una de las histidinas que coordinan al cobre T1 es responsable del potencial redox. Al aumentar la distancia del enlace, la contribución del par de electrones libres del nitrógeno disminuye, dejando al cobre deficiente de electrones, desestabilizando de los estados de oxidación más altos y aumentando el potencial redox.

En la Figura 1 se muestra un esquema del ciclo catalítico de la lacasa, la cual actúa por un mecanismo enzimático de ping-pong que inicia cuando el cobre del sitio T1 oxida al sustrato, preferencialmente fenoles y anilinas, y se genera un radical libre [20]. El electrón extraído es transferido a través de un motivo tripéptido His-Cys-His conservado en las lacasas. El electrón llega al sitio T2/T3 donde el oxígeno molecular es reducido a agua [22]. El resultado general de este proceso

es la reducción de una molécula de oxígeno a 2 moléculas de agua y la oxidación de 4 moléculas de sustrato para producir 4 radicales [25]. Aunque una gran variedad de compuestos pueden ser oxidados por la lacasa, su rango de sustratos está limitado por su bajo potencial redox comparado con el de las peroxidasa [27].

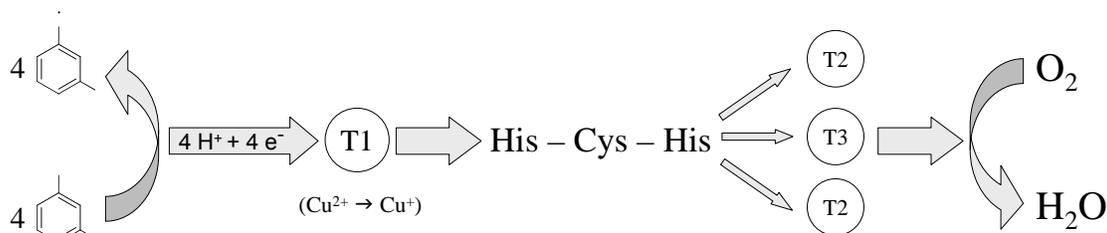


Figura 1. Ciclo catalítico de la lacasa.

2.2.1. Lacasa de *Coriopsis gallica*.

Calvo y colaboradores [28] reportaron la producción de lacasa por el basidiomiceto *Coriopsis gallica* que resultó interesante por su capacidad de transformar diferentes colorantes industriales. La proteína se caracterizó bajo condiciones desnaturalizantes y se determinó un peso de 84.1 kDa. Se identificaron 4 isoenzimas con puntos isoeléctricos de 4.15, 4.20 y 4.27 (dos de ellas tienen el mismo pI). Su actividad máxima se obtuvo a pH 3, y a una temperatura de 70°C , con actividad estable a 28°C . Su vida media de actividad fue de 32 días a 37°C y 8 días a 60°C .

En la lacasa de *Coriopsis gallica* UAMH 8260 (University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium) se determinó una sola isoenzima con un pI de 3.4, un peso molecular de 66 kDa determinado por SDS-PAGE, y de 56.6 kDa determinado por MALDI-TOF, un contenido de carbohidratos de 21% (w/w, equivalentes de glucosa), y 3.3 átomos de cobre por molécula de lacasa [29]. Aunque el potencial redox de esta lacasa no se ha determinado, de acuerdo a su secuencia de aminoácidos reportada (PDB 2vds) [30], esta lacasa comparte los motivos conservados de las secuencias de las lacasas de alto potencial redox [23]. En la Figura 2 se muestra un diagrama del sitio catalítico de esta lacasa. Se puede observar que contiene el motivo His-Cys-His conservado a través del cual pasan

los electrones extraídos por el cobre T1 hacia el sitio T2/T3. Además, esta lacasa contiene los 4 átomos de cobre coordinados por histidinas.

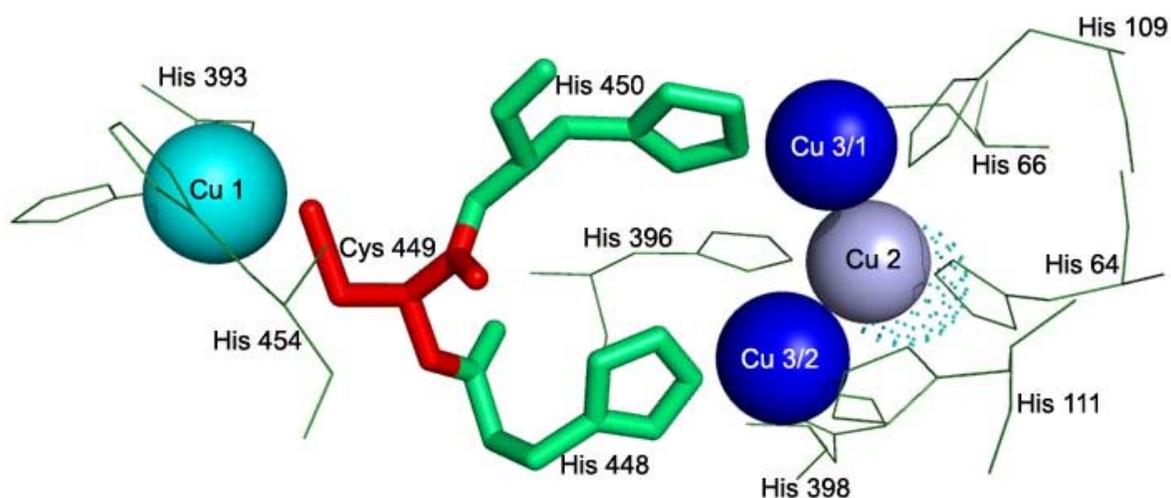


Figura 2. Estructura del sitio catalítico de la lacasa de *Corioloipsis gallica* UAMH 8260 [30].

Trabajos realizados previamente en nuestro laboratorio han mostrado que esta lacasa es eficiente en la transformación de una gran variedad de colorantes industriales [31], por lo que resultó interesante explorar su aplicación en la transformación de otros xenobióticos. Estudios posteriores mostraron que esta lacasa es eficiente en la decoloración de efluentes textiles [28] y en la transformación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) [29, 32], aunque en ambos casos su actividad mejoró significativamente en presencia de mediadores.

2.3. Mediadores redox.

El rango de sustratos de la lacasa puede ampliarse utilizando mediadores redox. Un mediador es una molécula pequeña de bajo peso molecular que actúa como una especie de receptor de electrones: una vez que es oxidado por la enzima, se difunde lejos del sitio catalítico y a su vez, oxida cualquier sustrato que, debido a su tamaño o polaridad, no podría entrar directamente al sitio catalítico; de hecho, el mediador oxidado puede trabajar por medio de un mecanismo de oxidación que no está disponible para la enzima [27, 33]. El ciclo propuesto para el sistema lacasa-mediador, se presenta en la Figura 3.

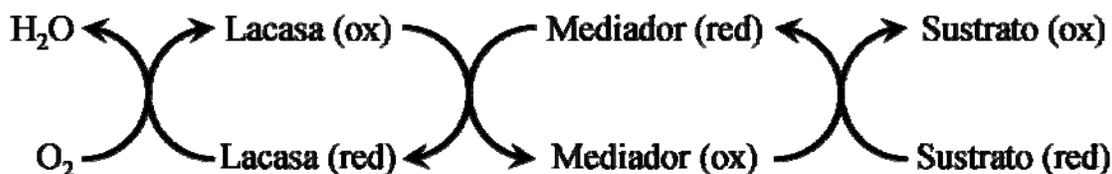


Figura 3. Ciclo catalítico del sistema lacasa-mediador.

Es importante resaltar la diferencia con el término de potenciador o “enhancer”, el cual se refiere a compuestos que aumentan la actividad y variedad de sustratos disponibles para la enzima, pero que caen fuera del ciclo catalítico al ser consumidos durante la reacción, es decir, el mediador no regresa a su estado reducido. Es común que se utilice el término mediador de manera indistinta para denominar a estos compuestos. Estrictamente hablando, sólo los complejos de metales de transición son verdaderos mediadores de la lacasa, mientras que todos los sustratos orgánicos son esencialmente potenciadores de la enzima [34].

El mediador debe ser un buen sustrato para la lacasa para que pueda ser oxidado fácilmente al estado de mediador oxidado (Med_{ox}), y se lleve a cabo la oxidación no enzimática del sustrato [35]. En la Figura 4 se muestran algunos mediadores que han probado ser eficientes en la transformación de diferentes xenobióticos [25].

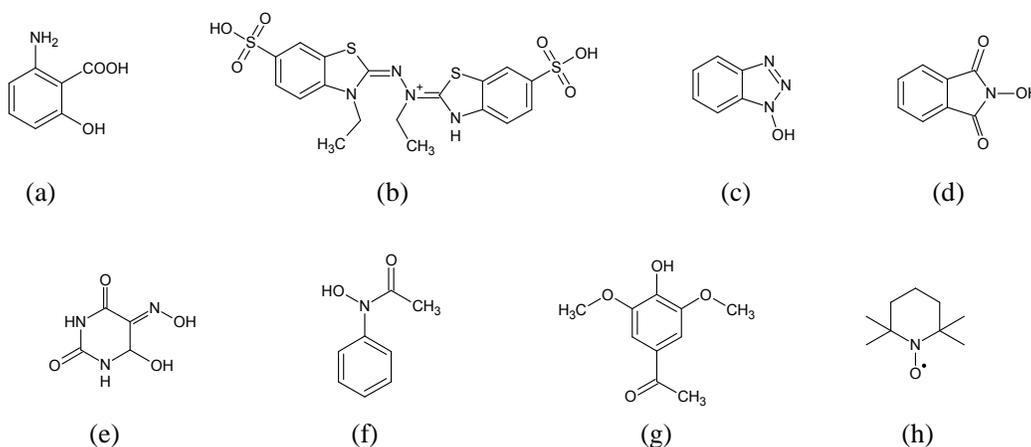


Figura 4. Ejemplos de mediadores de la lacasa: (a) ácido 3-hidroxi-antranílico (HAA); (b) ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS); (c) N-hidroxi-benzotriazol (HBT); (d) N-hidroxi-ftamida (HPI); (e) ácido violúrico (VLA); (f) N-hidroxi-acetanilida (NHA); (g) ácido siríngico; (h) TEMPO.

Se ha propuesto que el mecanismo por el cual el mediador oxida al sustrato depende de su estructura química. Fabrini y colaboradores [35] estudiaron los mecanismos de oxidación utilizando alcoholes aromáticos como modelo; con base en el tipo de productos de transformación obtenidos con los distintos mediadores, propusieron dos mecanismos de reacción: el de transferencia de electrones (ET) y el de transferencia de radical hidrógeno (HAT).

En el mecanismo ET, el mediador en su estado Med_{ox} sustrae un electrón del sustrato, el cual posteriormente sufre la deprotonación del radical catiónico intermediario provocando la conversión del alcohol a un aldehído (Figura 5). La reactividad se correlaciona con los potenciales de oxidación de los sustratos. El ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) actúa de acuerdo a este mecanismo. El ABTS presenta dos estados de oxidación, $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ($E^{\circ}=0.69\text{ V}$) y ABTS^{++} ($E^{\circ}=1.1\text{ V}$); por el alto potencial del dicatión, este mediador es capaz de transformar gran variedad de compuestos [36].

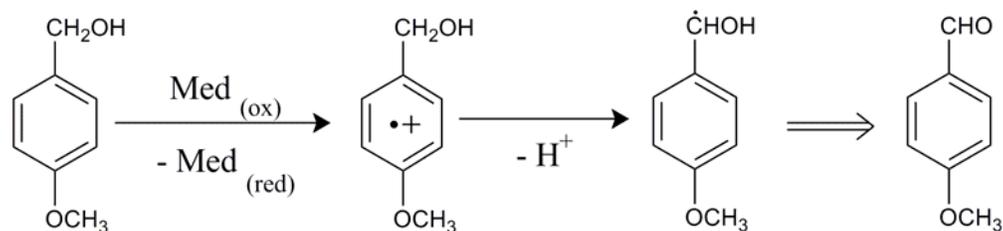


Figura 5. Ruta de transferencia de electrones (ET).

En el mecanismo HAT, el mediador es transformado a un radical oxil por acción de la lacasa. El radical sustrae un protón del sustrato y regresa a su estado inicial. En este mecanismo, el potencial redox del sustrato tiene una relevancia mínima, siendo la energía de disociación de enlace del hidrógeno el factor determinante de la reactividad del sustrato [35, 37]. El 1-hidroxibenzotriazol (HBT) actúa mediante este mecanismo, y se ha observado que es capaz de oxidar sustratos que no son transformados al utilizar el ABTS como mediador.

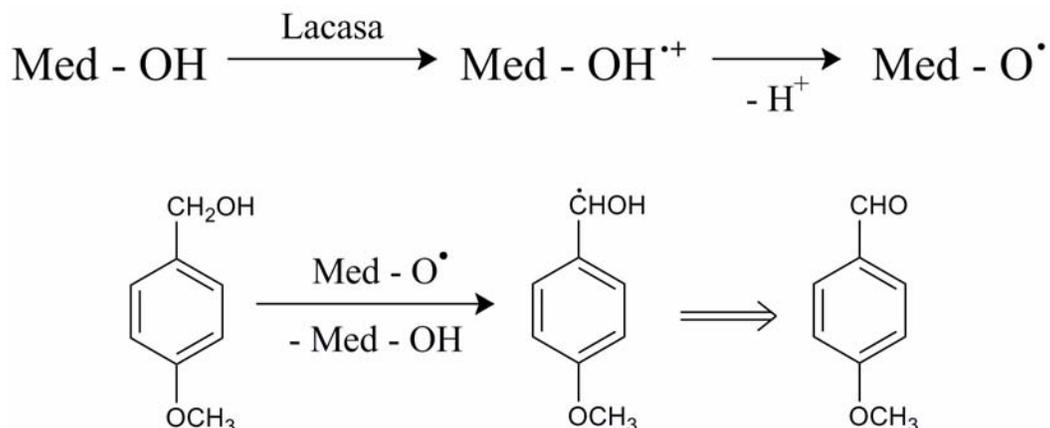


Figura 6. Ruta de transferencia de radical hidrógeno (HAT).

Un requisito importante para un buen mediador es la reversibilidad de su oxidación/reducción, que se basa principalmente en la estabilidad del radical. En el caso particular de las aplicaciones de degradación de la lignina, los requisitos principales del mediador son el número de ciclos redox, que no haya polimerización secundaria, y que los productos de oxidación no sean tóxicos [38].

En un inicio, los mediadores que se ensayaban resultaban ser falsos mediadores llegando a utilizarse en excesos molares de 20 a 1 ya que se consumían o degradaban durante el curso de la reacción [38]. Además, algunos de ellos resultan ser muy costosos, lo que los hace poco viables para aplicaciones industriales; es por ello que se ha explorado la utilización de mediadores naturales. Durante la degradación de la lignina, se generan grandes cantidades de fenoles naturales como ácido ferúlico, siringaldehído, pirogallol, ácido hidroxibenzóico, o catecol, los cuales son los sustratos principales para las reacciones de acoplamiento que llevan a la formación del humus [39]. Estos compuestos han surgido como una alternativa más barata, y se han explorado como mediadores en diversos procesos de transformación, especialmente para HAPs [40, 41], colorantes [39], y algunos plaguicidas [42].

Es importante resaltar que la eficiencia del sistema lacasa-mediador depende de la combinación de factores lacasa-mediador-sustrato. Es común que un mismo mediador presente diferencias significativas en la transformación de distintos

xenobióticos a causa de las diferencias estructurales de los distintos sustratos. También al utilizar diferentes lacasas con un mismo mediador, la eficiencia de éste puede cambiar, principalmente debido a las diferencias en el potencial redox entre la lacasa y el mediador, lo que disminuye la velocidad de transferencia de electrones. Además, la afinidad de la enzima por el mediador puede variar dependiendo del organismo de origen de la lacasa [43]. Con lo anterior, al explorar el uso de nuevos mediadores para aplicaciones específicas, se requiere de un trabajo extensivo en la caracterización de su eficiencia y los productos de transformación obtenidos. En este trabajo, exploramos la búsqueda de nuevos mediadores para la transformación de plaguicidas organohalogenados.

3. Hipótesis

El uso de mediadores permitirá mejorar la oxidación de plaguicidas organohalogenados por medio del sistema lacasa-mediador de *Corioloopsis gallica*.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Identificar y estudiar nuevos mediadores para la transformación de plaguicidas por el sistema lacasa-mediador de *Corioloopsis gallica*.

4.2. Objetivos particulares

1. Estudiar las propiedades catalíticas del sistema lacasa-mediador, en presencia de diferentes mediadores sobre diferentes plaguicidas.
2. Analizar e identificar por espectrometría de masas los productos de las reacciones.
3. Proponer los mecanismos de las reacciones lacasa-mediador.

5. Protocolo experimental

5.1. Materiales

5.1.1. Enzima.

La enzima lacasa del hongo ligninolítico *Corioloopsis gallica* UAMH 8260 se produjo en el laboratorio de acuerdo a Pickard y colaboradores [32] y se purificó de acuerdo a Rodríguez y colaboradores [31].

5.1.2. Reactivos.

Los plaguicidas 2,4-DB, bromofenoxim, bromoxinil, diclorofen, dinoterb, diurón, linurón, pentaclorofenol, picloram y propanil, así como los mediadores ensayados, fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MI). El plaguicida niclosamida se compró a Chem Service (West Chester, PA). Todos los plaguicidas fueron adquiridos como estándares analíticos de la más alta pureza disponible.

Los solventes orgánicos grado HPLC fueron adquiridos de Fisher Scientific (Springfield, NJ). Los demás reactivos se obtuvieron de J. T. Baker (Phillipsburg, NJ) como grado reactivo.

5.1.3. Equipo.

Las mediciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Beckman modelo DU 650. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se llevó a cabo en un equipo Perkin Elmer equipado con una bomba Serie 200 y un detector UV de arreglo de diodos modelo 235 C. Los datos se procesaron con el software Turbochrom (Perkin Elmer). Se utilizaron las columnas analíticas (100 mm x 2.1 mm, 5 µm) ODS Hypersil (Hewlett Packard), (250 mm x 4 mm, 5 µm) Nucleosil (Macherey-Nagel), y (150 mm x 2.1 mm, 5 µm) Narrow-Bore (Agilent Technologies). Para la purificación de compuestos se utilizó una columna preparativa (250 mm x 10 mm, 5 µm) C18 (Vydac).

Para el análisis de los productos de reacción se utilizó un cromatógrafo de gases (GC; Agilent, modelo 6890 *Network*) acoplado a un espectrómetro de masas (MS; Agilent, modelo 5973 *Network*). Para hacer la inyección de la muestra directamente al MS se utilizó un equipo de inserción directa (Scientific Instrument Services, modelo 73DIP-1).

5.2. Métodos

5.2.1. Caracterización de la lacasa.

La enzima purificada fue analizada por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). La imagen obtenida se procesó en el programa computacional ImageJ (National Institutes of Health, USA). Además, la muestra fue analizada por electroforesis no desnaturizante en un gel de poliacrilamida (PAGE) y se tiñó con una solución 0.5 mM de ABTS para identificar las proteínas con actividad de lacasa.

El contenido de proteína en las preparaciones de lacasa fue determinado por el método de Bio-Rad utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. La actividad de lacasa se midió espectrofotométricamente como el aumento en la absorbancia a 530 nm utilizando una concentración 50 μM de siringaldazina ($64,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [44]) como sustrato en amortiguador de acetatos 100 mM, pH 4.5. Una unidad de enzima fue definida como la cantidad de lacasa que oxida 1 μmol de siringaldazina por minuto.

5.2.2. Transformación de plaguicidas.

La transformación enzimática de los plaguicidas se llevó a cabo en tubos de ensayo de 13 mm x 100 mm. La mezcla de reacción contenía 80%(v/v) de amortiguador de acetatos 100 mM pH 4.5, 20%(v/v) acetonitrilo (ACN) para permitir la solubilidad del plaguicida, 200 μM de plaguicida, concentraciones variables de mediador, y unidades conocidas de enzima. Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente (20-25°C). La mezcla fue agitada al inicio de la reacción, a los 5 minutos y a los 10 minutos, tiempo al cual fue tomada la

muestra y analizada por HPLC. Para el diclorofen, bromoxinil y siringaldehído, la elución se realizó con un gradiente escalonado agua-metanol de la siguiente manera: 30% metanol por 2 min, se aumentó a 50% en 8 min y se mantuvo por 1 min. En 5 min se aumentó a 80% de metanol y se mantuvo por 5 min. En 1 min se regresó a 30% de metanol y se mantuvo por 7 min. Para la niclosamida y el bromofenoxim la elución se logró con un gradiente agua-ACN con o sin acidificar con 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA), dependiendo del plaguicida analizado. La elución comenzó con 100% agua por 2 min y se utilizó un gradiente lineal de 15 min hasta 80% de ACN. En 1 min se regresó a 100% agua y se mantuvo durante 7 minutos. La cantidad de sustrato transformado fue calculada en relación al porcentaje de decremento en el área del pico observado tomando como 100% el área observada antes de la transformación (concentración inicial 200 μM). Las longitudes de onda de absorbancia utilizadas se muestran en la Tabla 2. La transformación de los plaguicidas se expresó como nanomoles de plaguicida consumidos por minuto por unidad de enzima ($\text{nmol min}^{-1} \text{U}^{-1}$), y se reporta el promedio de al menos 3 réplicas independientes.

Tabla 1. Longitudes de onda utilizadas para el monitoreo de las reacciones de transformación.

Compuesto	Longitud de onda (nm)	Compuesto	Longitud de onda (nm)
2,4-DB	285	Linurón	250
Bromofenoxim	225	Niclosamida	330
Bromoxinil	250	Pentaclorofenol	300
Diclorofen	280	Picloram	225
Dinoterb	260	Propanil	250
Diurón	250	Siringaldehído	305

La determinación de los parámetros cinéticos se hizo utilizando el programa computacional EnzFitter (Biosoft, Cambridge, UK).

5.2.3. Medición de potencial redox

Las mediciones de potencial redox se llevaron a cabo por voltamperometría cíclica. La concentración promedio de los compuestos fue de 100 mM, disueltas en ACN anhidro. Se utilizó un disco de platico como electrodo de trabajo; como electrodo auxiliar se utilizó un disco de carbono vitrificado, mientras que como electrodo de referencia se utilizó una barra de plata/cloruro de plata empleando doble puente, con una solución 100 mM de perclorato de tetrabutilamonio. Las mediciones se hicieron a 500 mV min^{-1} utilizando una solución estándar de ferroceno/ferrocinio 100 mM, $E^\circ = 0.56 \text{ V/ENH}$.

5.2.4. Identificación de los productos de transformación.

Para identificar los productos de transformación del diclorofen, siringaldehído y bromoxinil, el sistema de reacción se escaló a 100 ml y se mantuvo en agitación para favorecer la aireación del medio de reacción. Las reacciones se monitorearon por HPLC, y cuando el sustrato se agotó, la reacción se detuvo añadiendo 100 ml de tetrahidrofurano (THF). No se logró la transformación completa del bromoxinil y la reacción se detuvo cuando se llegó al equilibrio. Para separar las fases se saturó con cloruro de sodio granular. Se tomó la fase orgánica y se eliminó el solvente por evaporación con vacío. Una vez seca, la muestra se disolvió en THF y se analizó por GC-MS.

Para aumentar la volatilidad de algunos productos, se realizó una silanización del extracto de reacción tomando entre 2 y 10 mg de muestra disueltos en 200 μl de THF y agregando 400 μl de N, O-bis(Trimetilsilil)acetamida. Las muestras se incubaron a 70°C por 30 minutos. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y fueron analizadas por GC-MS.

Para el bromoxinil fue necesario purificar los compuestos obtenidos del extracto de la reacción. La muestra se inyectó al HPLC y se utilizó una columna preparativa. La muestra se eluyó utilizando el gradiente agua:metanol descrito anteriormente, con un flujo de 3 ml/min. Se colectaron 4 fracciones y se eliminó el

Protocolo experimental

solvente con una bomba de alto vacío. El sólido se disolvió en metanol y fue analizado por espectrometría de masas.

Para el diclorofen también fue necesario purificar los productos por HPLC. Esto se hizo inyectando la totalidad de la reacción al HPLC y los productos se separaron en una columna analítica utilizando el gradiente agua:ACN antes descrito. Las diferentes fracciones colectadas se saturaron con cloruro de sodio granular para separar las fases. Se tomó la fase orgánica y se evaporó el solvente bajo flujo de nitrógeno. El sólido se disolvió en ACN y fue analizado por espectrometría de masas.

6. Resultados y Discusión

6.1. Caracterización de la lacasa.

En el presente trabajo proponemos la transformación de plaguicidas utilizando el sistema lacasa-mediador. Es importante establecer que la actividad enzimática observada se deba únicamente a la acción de la lacasa. Para ello analizamos por SDS-PAGE la pureza de la preparación de lacasa obtenida de un cultivo de *Coriolopsis gallica* UAMH 8260. Como se observa en la Figura 7, se identificó la presencia de varias proteínas. Las más importantes corresponden aproximadamente a los tamaños de 20, 32, 42, 55 y 60 kDa. La imagen fue analizada con el programa computacional ImageJ (National Institutes of Health, USA) y se determinó que la proteína más abundante es la de 60 kDa, representando el 37% de la proteína presente. De acuerdo con su peso molecular esta proteína corresponde a la lacasa que tiene un tamaño de 66 kDa determinado por SDS-PAGE [29].

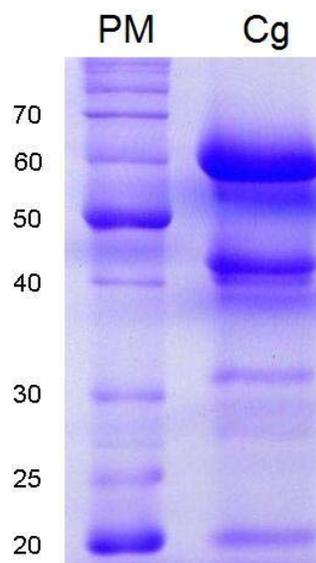


Figura 1. Análisis de la muestra de lacasa por SDS-PAGE (PM: marcador de peso molecular; Cg: *Coriolopsis gallica*).

Aunque se ha reportado que el basidiomiceto *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 produce una sola isoforma de lacasa [45], quisimos descartar la presencia de otras

proteínas que presentaran actividad de lacasa. Para ello la preparación fue analizada por electroforesis no desnaturizante. El gel se tiñó con una solución de ABTS, un sustrato típico para la lacasa. Como se puede observar en la Figura 8, sólo se encontró una enzima con actividad de lacasa, lo que nos indica que las otras proteínas presentes en el extracto no juegan un papel en la catálisis como lacasas.



Figura 2. Gel de actividad de la lacasa contra ABTS.

La preparación de lacasa fue caracterizada en términos de unidades de actividad de lacasa en la transformación de siringaldazina, otro sustrato típico de la lacasa. El extracto más concentrado de proteína contenía 1428 U/ml, a partir de la cual se prepararon diluciones para los diferentes ensayos. Así, para los ensayos enzimáticos se agregaron cantidades conocidas de enzima en términos de unidades de lacasa, definiendo una unidad como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de siringaldazina por minuto.

6.2. Selección del mediador.

Existe una gran variedad de compuestos tanto naturales como sintéticos que funcionan como mediadores de la lacasa. El ABTS y el HBT son los mediadores ampliamente estudiados y que han sido tomados como modelos para proponer los mecanismos de reacción [36]. Estos compuestos han demostrado su eficiencia en la transformación de gran variedad de xenobióticos, aunque al ser buenos sustratos para la lacasa, son consumidos durante la reacción y caen fuera del ciclo

propuesto para el sistema lacasa-mediador [46]. Es por ello que la búsqueda de mediadores se ha ampliado, con especial atención en mediadores naturales [22].

En la Figura 9 se muestran algunos mediadores, tanto naturales como sintéticos, que han mostrado ser eficientes en la transformación de xenobióticos como HAP y colorantes. Los mediadores ABTS, HBT y TEMPO son mediadores sintéticos, mientras que la acetosiringona, el ácido cinámico, el ácido gálico, el alcohol coniferílico, el siringaldehído y la vainillina son mediadores naturales.

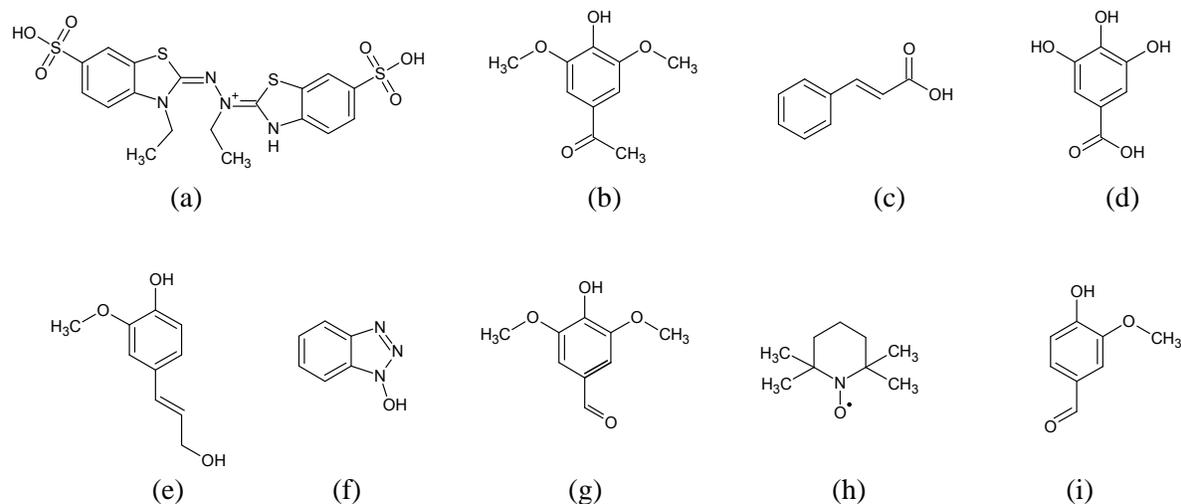


Figura 3. Mediadores ensayados: (a) ABTS; (b) acetosiringona; (c) ácido cinámico; (d) ácido gálico; (e) alcohol coniferílico; (f) N-hidroxi-benzotriazol (HBT); (g) siringaldehído; (h) TEMPO; (i) vainillina.

Primeramente nos dimos a la tarea de identificar cuál de los mediadores anteriores es el más eficiente en la transformación de plaguicidas organohalogenados, tomando como modelo los plaguicidas niclosamida, linurón y diclorofen. Es importante hacer notar que ninguno de los plaguicidas ensayados es sustrato de la lacasa, es decir que éstos no son transformados por la lacasa sin la presencia de un mediador. Los resultados de la actividad de transformación se muestran en la Tabla 3.

A las concentraciones de mediador ensayadas, los mediadores sintéticos ABTS, HBT y TEMPO fueron capaces de oxidar los plaguicidas probados, pero con menor actividad que el siringaldehído y la acetosiringona, los cuales mostraron las actividades más altas en la transformación de los plaguicidas. Acetosiringona fue el mejor mediador en la transformación de la niclosamida,

mostrando velocidades de transformación de 6 a 100 veces más altas que siringaldehído y TEMPO, respectivamente. En el caso de diclorofen, el siringaldehído mostró ser mejor que acetosiringona, ácido cinámico y TEMPO.

Tabla 1. Actividades de transformación de diferentes plaguicidas por acción de la lacasa utilizando diferentes mediadores.

Mediador	Concentración de mediador (mM)	Actividad de transformación (nmol min ⁻¹ U ⁻¹)		
		Diclorofen	Niclosamida	Linurón
Siringaldehído	3	1014.2	109.5	0.68
Acetosiringona	2	600.4	632.9	1.51
Ácido cinámico	1	284.0	NR	ND
ABTS	3	65.5	4.39	NR ^a
TEMPO	2	48.7	17.4	ND ^b
HBT	5	32.3	6.37	0.73
Vainillina	3	9.06	NR	NR
Alcohol coniferílico	3	NR	NR	NR
Ácido gálico	3	NR	NR	NR
Sin mediador	0	NR	NR	NR

^a NR: Sin transformación del plaguicida

^b ND: No determinado

La presencia de sustituyentes metoxi en las posiciones 3 y 5 del siringaldehído y de la acetosiringona les pueden conferir una ventaja sobre los otros mediadores, dado que estos sustituyentes tienen un efecto electro-donador que disminuyen el potencial redox siendo fácilmente oxidados por la lacasa, haciéndolos mediadores rápidos y eficientes. Además, el tiempo de vida del radical es mayor ya que los sustituyentes metoxi en el anillo aromático son un impedimento estérico para la formación de estructuras tipo bifenilo por condensación de radicales, como sucede con otros tipos de fenoles [39].

Entre los mediadores naturales, el siringaldehído ha probado ser el más eficiente en la transformación de fenoles clorados al transformarlos en su totalidad y con mayor rapidez que otros mediadores [47]. También demostró ser eficiente en la transformación de colorantes [39] y del plaguicida ciprodinil [42]. Por otro

lado, el siringaldehído es un compuesto no tóxico, que incluso se encuentra en el vino como un componente importante del aroma [48]. Por ello, el siringaldehído fue elegido como modelo de estudio para el sistema lacasa-mediador.

6.3. Caracterización de la transformación del siringaldehído por la lacasa

El siringaldehído es un componente de la lignina que también es un buen sustrato para la lacasa [22]. Para poder proponer mecanismos de reacción, es importante conocer la forma en que la lacasa está actuando sobre este mediador caracterizando su actividad enzimática y la identificación de los productos de transformación.

6.3.1. Actividad enzimática de la lacasa sobre el siringaldehído.

Primeramente se hicieron ensayos de actividad en la transformación del siringaldehído por acción de la lacasa. En la Figura 10 se muestran los cromatogramas control y de la reacción, utilizando una concentración inicial de siringaldehído 500 μ M y medido a 305 nm.

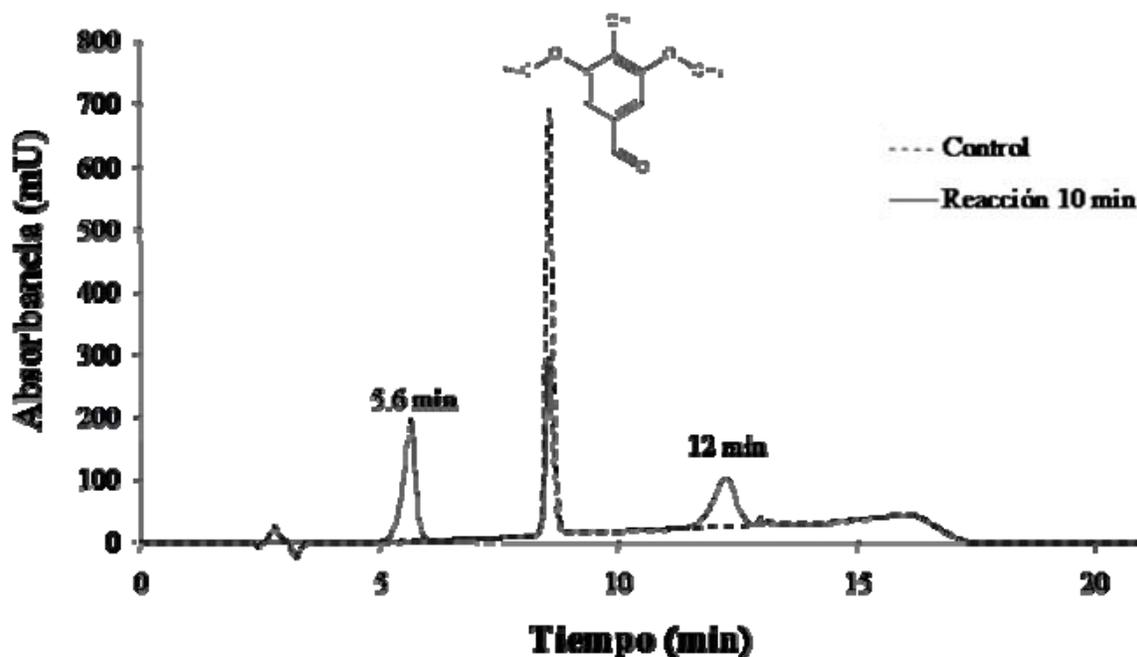


Figura 4. Comparación del cromatograma control y de la reacción de transformación del siringaldehído por la lacasa.

En el control se observa un solo pico con tiempo de retención de 8.6 minutos correspondiente al siringaldehído. Después de 10 minutos de reacción, se observa la aparición de 2 productos, con tiempos de retención de 5.6 y 12 minutos.

La cinética de transformación del siringaldehído se presenta en la Figura 11. Como se puede observar, la transformación del siringaldehído sigue una cinética de Michaelis-Menten y fue posible ajustarlo a este modelo utilizando el programa EnzFitter con una $R^2 = 0.977$. Los parámetros cinéticos obtenidos fueron $v_{\text{máx}} = 229.43 \text{ nmol min}^{-1} \text{ U}^{-1}$ y $K_M = 401 \text{ }\mu\text{M}$. Considerando que la proteína que se usó en estos ensayos no está totalmente pura (37% de lacasa), fue necesario hacer cálculos posteriores para obtener el valor de k_{cat} que resultó ser de 53 s^{-1} . De esta manera, se obtuvo un valor de eficiencia catalítica de $k_{\text{cat}}/K_M = 1.34 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$. De acuerdo a los valores de eficiencia reportados para el siringaldehído con la lacasa de *P. cinabarinus* [39], la eficiencia obtenida es 1 orden de magnitud menor. En estos trabajos las reacciones se llevaron a cabo sólo en amortiguador y en nuestro caso utilizamos ACN en el medio de reacción. Se sabe que el uso de solventes afecta la actividad de la enzima, aunque el efecto no debería ser tan marcado puesto que, a la concentración utilizada de ACN, ha sido reportado que la eficiencia de la lacasa de *C. gallica* UAMH 8260 disminuye en un 20% [44]. Previamente se reportaron resultados para la transformación del siringaldehído con la misma cepa de *C. gallica*, y los valores numéricos coinciden con los obtenidos por Vandertol-Vanier y colaboradores [29], pero con 3 órdenes de magnitud de diferencia; esto se puede deber a que hay incongruencia en las unidades de la tabla publicada de este trabajo.

La actividad máxima obtenida es de $187.6 \text{ nmol min}^{-1} \text{ U}^{-1}$ a una concentración de 1.2 mM. Para concentraciones mayores se observa una ligera disminución de la actividad, que se puede deber a limitación por oxígeno. Según la estequiometría de la reacción, se requiere de 1 mol de oxígeno para llevar a cabo la oxidación de 4 moles de sustrato. Considerando que la solubilidad del oxígeno a 25°C es de 0.258 mM, y asumiendo que no se disuelve más oxígeno, la concentración máxima estequiométrica de sustrato que puede reaccionar, es de 1 mM. A

concentraciones más altas de sustrato, el oxígeno puede ser limitante y causar la disminución en la actividad, aunque en este caso no es muy significativa.

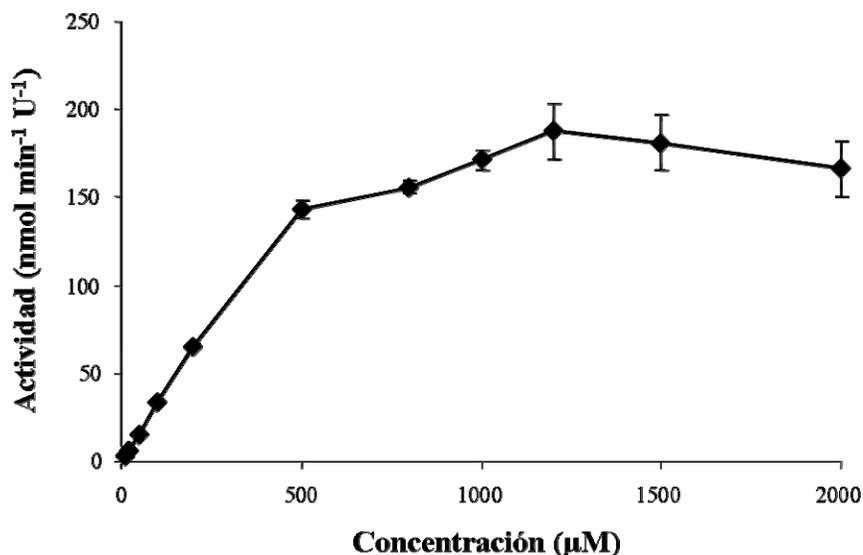


Figura 5. Actividad enzimática de la lacasa en la transformación del siringaldehído.

6.3.2. Identificación de los productos de transformación.

Para poder identificar cuáles son los posibles intermediarios del siringaldehído que están actuando en la transformación de los plaguicidas, se identificaron los productos de transformación del siringaldehído como único sustrato. De acuerdo con el cromatograma de la Figura 10, se observan 2 productos después de la transformación por la lacasa. Para identificar la naturaleza de estos productos, la reacción se escaló a 100 ml y el extracto obtenido fue analizado mediante GC-MS. Se identificó un compuesto mayoritario con un peso molecular de 168 Da. Su espectro de masas y las fragmentaciones correspondientes se muestran en la Figura 12. La pérdida de un grupo metilo ($15\ m/z$) da lugar al fragmento de $153\ m/z$. La posterior pérdida de un grupo $C=O$ ($28\ m/z$) da lugar al fragmento de $125\ m/z$. Al romperse la molécula y perder un grupo metoxi ($31\ m/z$) y dos carbonos, se forma el fragmento de $112\ m/z$. El fragmento más abundante es de $69\ m/z$ que corresponde al rompimiento de la molécula por la mitad y la pérdida simultánea de un grupo metilo. De acuerdo con este patrón, el compuesto fue identificado como 2,6-dimetoxibenzoquinona (DMBQ), un producto de la oxidación del siringaldehído

que ya había sido reportado previamente [49]. La DMBQ es un compuesto de gran importancia comercial porque se ha demostrado que tiene cualidades antimicrobianas y anticancerígenas [50, 51].

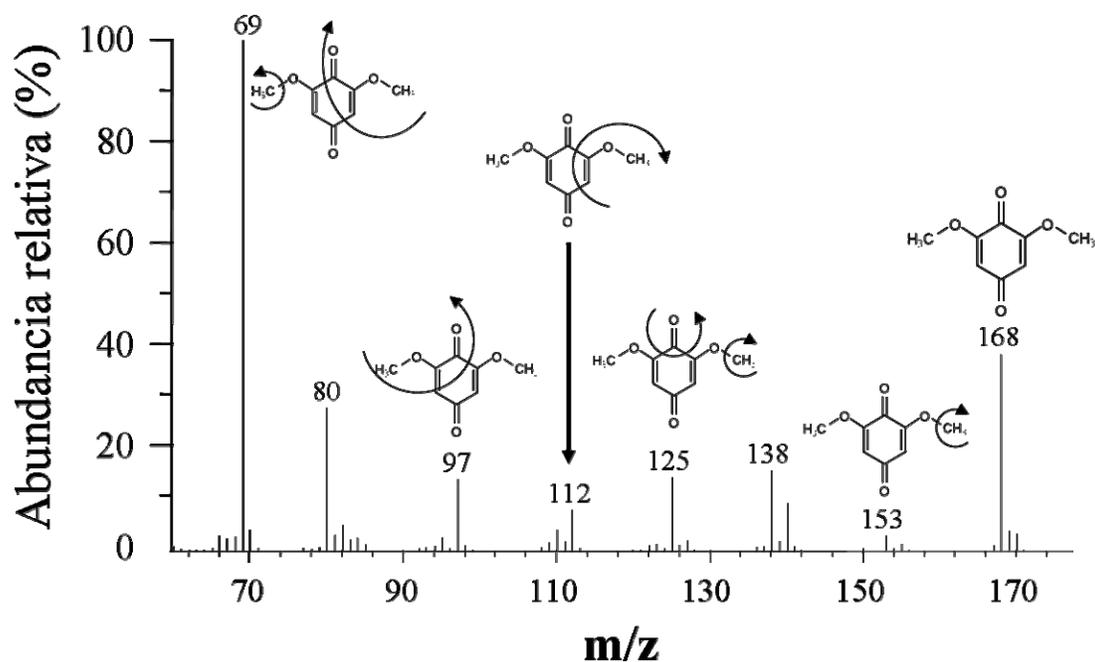


Figura 6. Espectro de masas y patrón de fraccionamiento para la DMBQ.

El otro producto se encontró en menor proporción. Su espectro de masas se muestra en la Figura 13. El ión molecular es de 170 m/z , y al perder un grupo metilo, se obtiene el fragmento de 155 m/z . La pérdida simultánea de un grupo metoxi y un carbono dan lugar al fragmento de 127 m/z . La pérdida posterior de otro carbono da lugar al fragmento de 115 m/z . El espectro de masas de este producto corresponde al del 2,6-dimetoxibenceno-1,4-diol que es la hidroquinona correspondiente a la DMBQ.

Estos compuestos se encuentran presentes durante la degradación de la madera, como resultado de la transformación enzimática del siringaldehído durante la degradación de la lignina [52]. En la Figura 14 se muestra el mecanismo propuesto para esta reacción. Park y colaboradores [47] reportaron que por acción de peroxidasas y birnesita se da la formación de estos mismos radicales, aunque no reportaron los productos finales de la reacción. De acuerdo al mecanismo propuesto, hay 4 posibles radicales que pueden oxidar al plaguicida, siendo el

primer intermediario un radical fenoxilo. Ha sido reportado que los radicales fenoxilo pueden actuar con el mismo mecanismo que actúa el radical N-oxil producido por la lacasa sobre el HBT [39]. Estos radicales actúan sustrayendo un protón del sustrato, es decir, por medio de la ruta HAT.

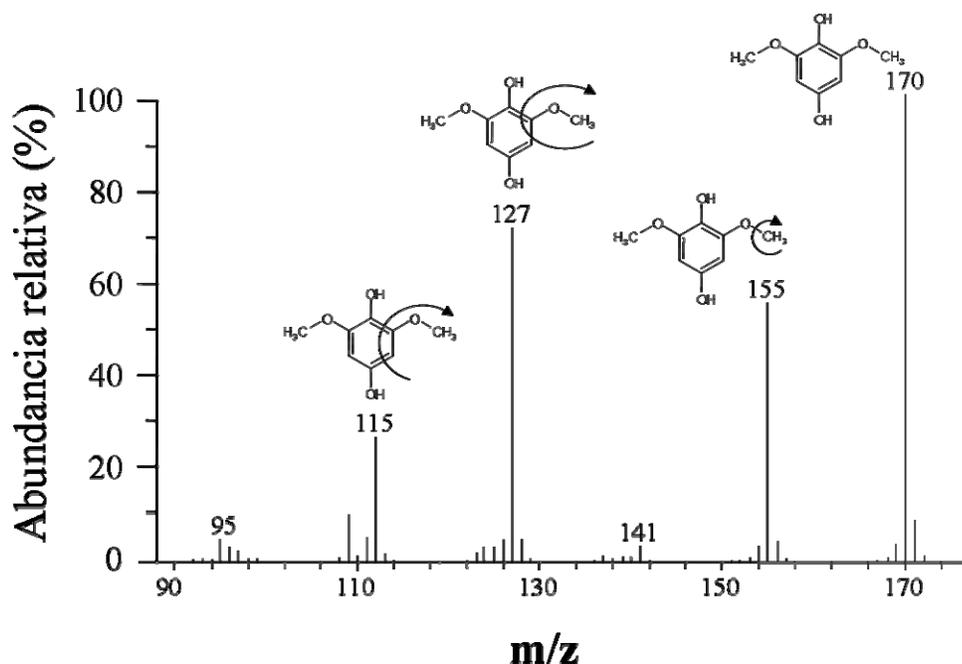


Figura 7. Espectro de masas y patrón de fraccionamiento para el 2,6-dimetoxibenceno-1,4-diol.

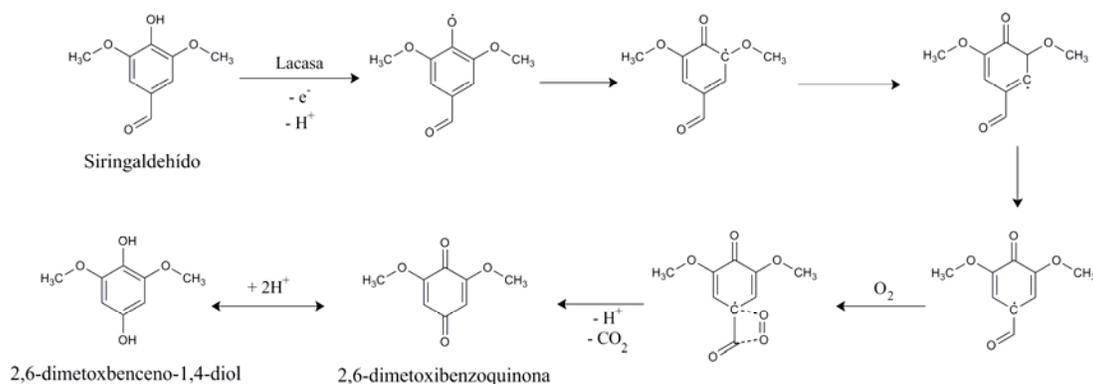


Figura 8. Mecanismo propuesto para la oxidación del siringaldehído por acción de la lacasa.

Conociendo la naturaleza de los productos, se procedió a hacer análisis con estándares para determinar las concentraciones de los productos. El pico con

tiempo de retención de 5.6 minutos obtenido en el HPLC corresponde a la DMBQ. El tiempo de retención de un estándar de 2,6-dimetoxibenceno-1,4-diol no coincidió el tiempo de retención del segundo producto, por lo que se sospecha que se trata de un isómero aún no identificado.

En la Figura 15 se muestra la curva estándar para la DMBQ, que relaciona la concentración del compuesto con el área observada por HPLC. Posteriormente se estimó la actividad de producción de DMBQ en relación a la concentración de siringaldehído. Los resultados se muestran en la Figura 16.

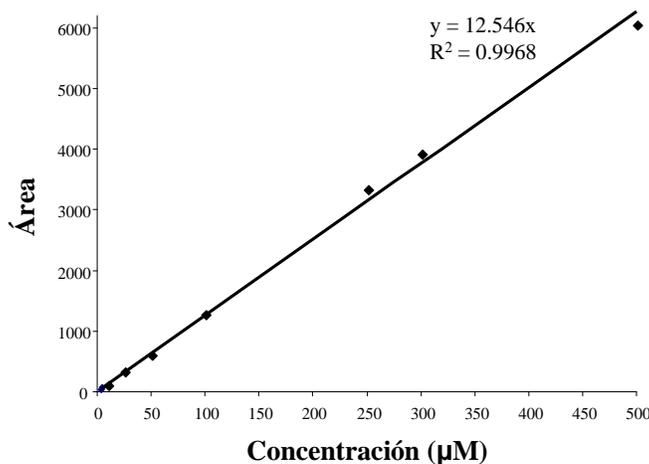


Figura 9. Curva estándar de DMBQ.

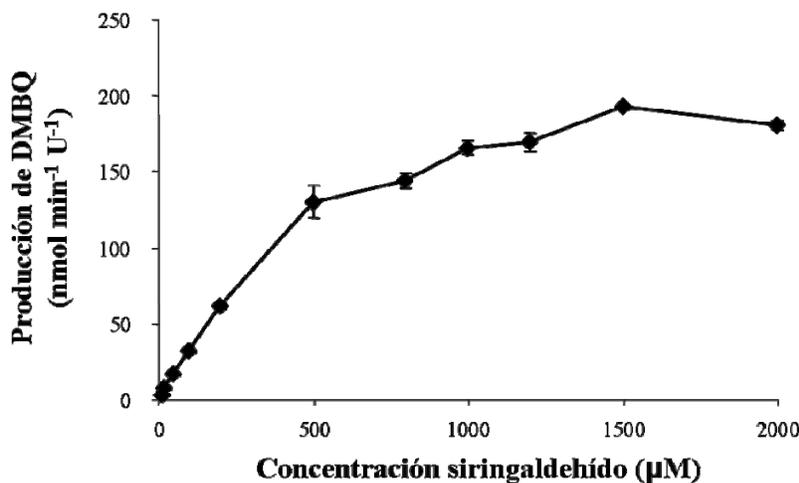


Figura 10. Producción de DMBQ por acción de la lacasa sobre el siringaldehído.

En este caso, el máximo de actividad se alcanza a una concentración de 1.5 mM ($191.9 \text{ nmol min}^{-1} \text{ U}^{-1}$). Al comparar estos valores con las actividades obtenidas para el siringaldehído, observamos que la DMBQ representa más del 95% del producto obtenido en todos los casos, por lo que el otro producto puede ser considerado como minoritario. En la Figura 17 se muestra el perfil de aparición del producto con tiempo de retención de 12 minutos, y dado que no se conoce la química exacta del compuesto, la actividad se describe en términos relativos al área máxima observada por HPLC. Se puede observar que tanto la desaparición del siringaldehído como la aparición de sus productos siguen el mismo perfil.

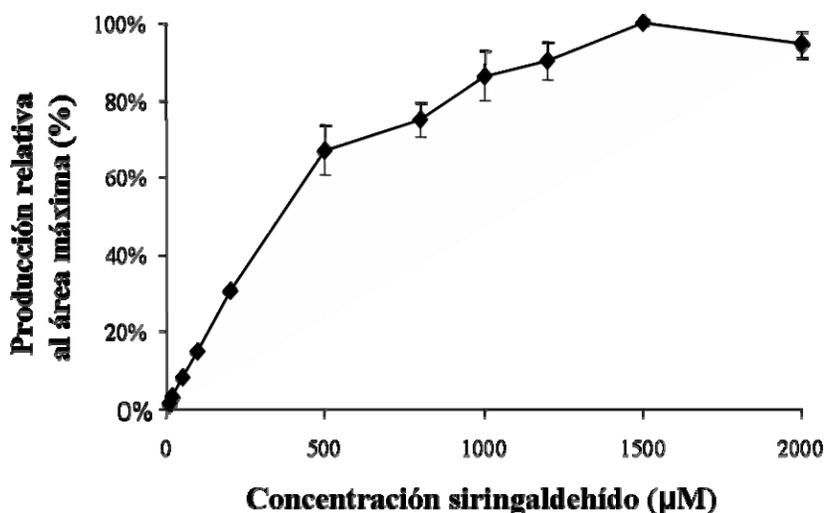


Figura 11. Aparición de producto (tiempo de retención de 12 min) por acción de la lacasa sobre el siringaldehído.

6.4. Ensayos de transformación de los plaguicidas por el sistema lacasa-siringaldehído.

Se seleccionaron varios plaguicidas organohalogenados (Figura 18) entre los que se encuentran herbicidas, fungicidas, insecticidas, nematocidas y moluscicidas, todos ellos de importancia comercial y ambiental [53].

De los 11 plaguicidas ensayados, el sistema lacasa-siringaldehído fue capaz de transformar al bromofenoxim, bromoxinil, diclorofen y niclosamida. Los resultados se presentan en la Figura 19.

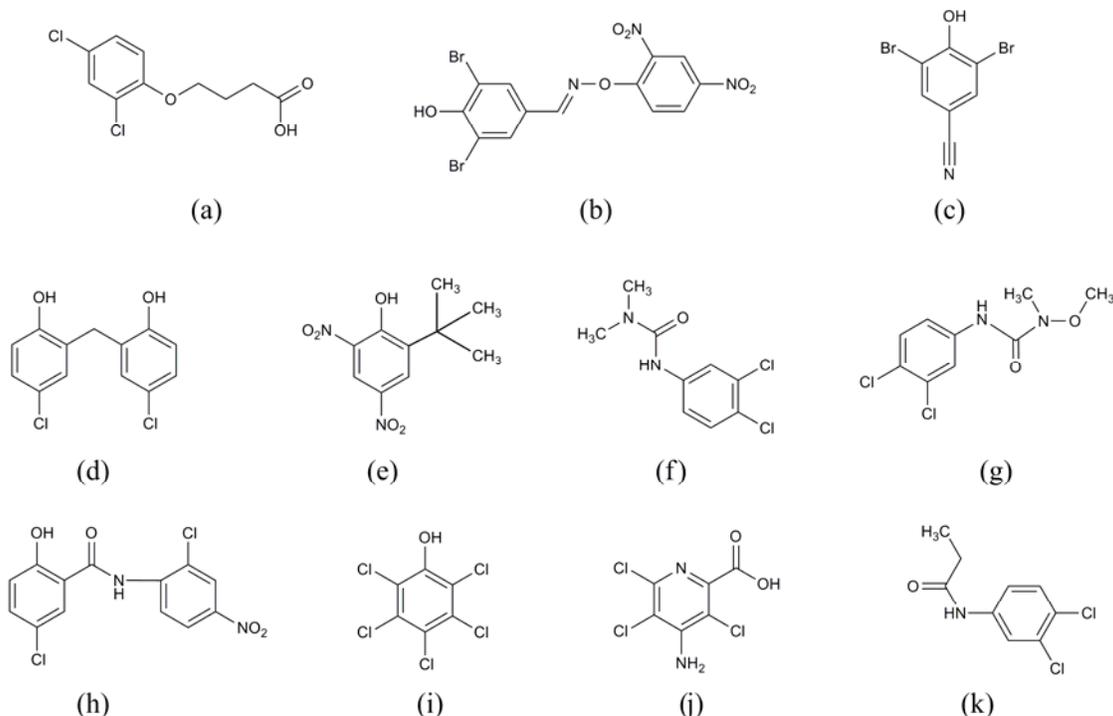


Figura 12. Estructura química de los plaguicidas analizados: (a) 2,4-DB; (b) bromofenoxim; (c) bromoxinil; (d) diclorofen; (e) dinoterb; (f) diurón; (g) linurón; (h) niclosamida; (i) pentaclorofenol; (j) picloram; (k) propanil.

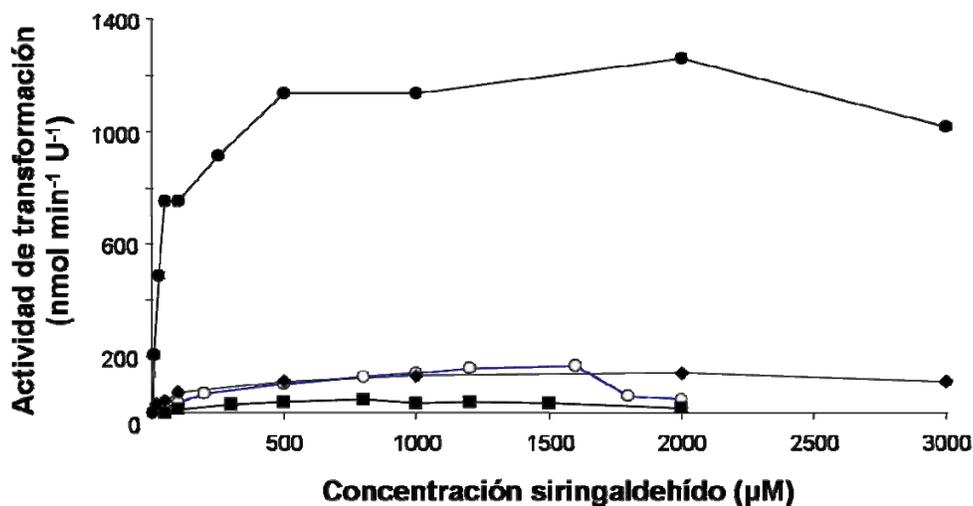


Figura 13. Actividad de transformación de los plaguicidas (●) diclorofen, (◆) niclosamida, (■) bromoxinil, y (○) bromofenoxim por el sistema lacasa-siringaldehído.

Observamos que para todos los plaguicidas, a concentraciones altas de siringaldehído hay una caída en la actividad. Podemos descartar una limitación por oxígeno puesto que cuando está presente sólo el siringaldehído, la enzima

mantiene una actividad muy similar hasta concentraciones de 2 mM (Figura 11). Se sabe que los halógenos pueden funcionar como inhibidores de la lacasa [54]; sin embargo, descartamos esta posibilidad porque aunque durante la transformación de los plaguicidas se puede dar la liberación de bromo o cloro al medio, las concentraciones son muy bajas (máximo 200 μM), y la I_{50} de estos compuestos es del orden molar. Es posible que esta caída de actividad se deba a una inhibición de la lacasa por algún otro producto de la transformación de los plaguicidas.

El sistema lacasa-siringaldehído mostró la mayor actividad de transformación contra el diclorofen, seguido por bromofenoxim, niclosamida y bromoxinil. Es importante resaltar que las actividades máximas de transformación obtenidas se lograron a concentraciones de siringaldehído 1 mM, aunque la actividad es muy cercana a la máxima a concentraciones 500 μM . Esto es, se utilizó una proporción mediador:sustrato de 2.5 a 1, una de las más bajas reportadas hasta ahora para el sistema lacasa-mediador [41, 55].

Según los mecanismos propuestos por Fabrini y colaboradores [35], la diferencia en el potencial redox puede ser la fuerza motriz para la oxidación del sustrato. Por ello se buscó correlacionar la actividad máxima de transformación de los plaguicidas con su potencial redox. Los valores de potencial redox se determinaron experimentalmente por voltamperometría cíclica. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 2. Potencial redox de los plaguicidas transformados por el sistema lacasa-siringaldehído.

Plaguicida	Potencial Redox (Volts)	Actividad máxima ($\text{nmol min}^{-1} \text{U}^{-1}$)
Bromofenoxim	1.817	166.23
Bromoxinil	1.787	48.77
Diclorofen	1.532	1,257.61
Niclosamida	1.652	141.98

Durante la realización de este proyecto, Ayala y colaboradores [56] publicaron un método para estimar el potencial redox de las peroxidasas basado en la teoría de Marcus y Sutin (1985). Esta teoría propone que existe una dependencia

semilogarítmica entre la velocidad de transferencia de electrones y la propiedad termodinámica motriz, en este caso la diferencia en el potencial redox. En la Figura 20 se muestra la gráfica que relaciona el potencial redox de los plaguicidas con el logaritmo de la actividad máxima de transformación observada para ese plaguicida. Los valores se normalizaron con respecto a la actividad máxima, que en este caso fue con el diclorofen. Como se puede observar, hay una baja correlación entre el potencial redox y la actividad máxima de degradación ($R^2 = 0.600$). Esto nos sugiere que la transferencia de electrones juega un papel mínimo en la oxidación de los sustratos por el mediador, por lo que podemos descartar que actúe por medio de la ruta ET.

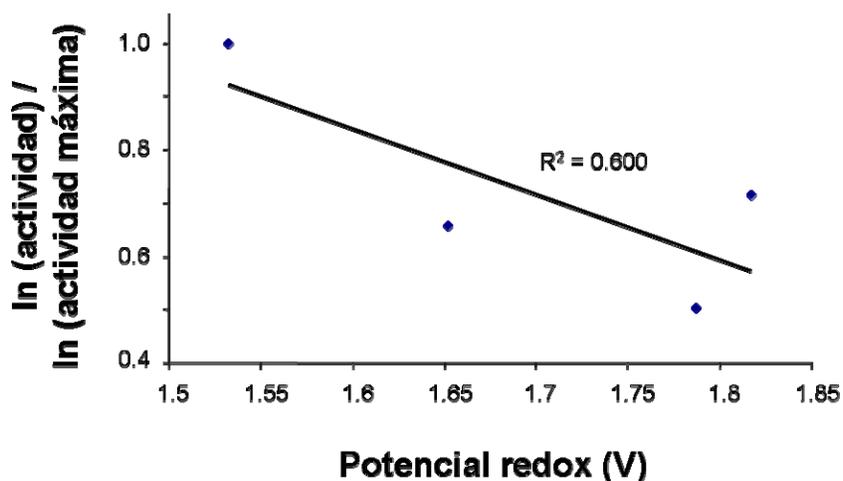


Figura 14. Correlación entre el potencial redox y la actividad máxima de los plaguicidas transformados por el sistema lacasa-siringaldehído.

El otro mecanismo propuesto es la ruta HAT, donde la energía de enlace del hidrógeno es la fuerza motriz: al aumentar la energía de enlace, la actividad de transformación disminuye [35]. Para determinar si existe una correlación más clara con esta propiedad, se hicieron cálculos teóricos de la energía de disociación de los hidrógenos fenólicos de los plaguicidas utilizando la teoría de los funcionales de la densidad (DFT) a nivel B3LYP/6-31+G(d,p). Los valores se presentan en la Tabla 5.

Tabla 3. Energías de disociación de enlace del hidrógeno fenólico de los plaguicidas transformados por el sistema lacasa-siringaldehído.

Plaguicida	Energía de disociación (kcal mol ⁻¹)	Actividad máxima (nmol min ⁻¹ U ⁻¹)
Bromofenoxim	91.4	166.23
Bromoxinil	86.8	48.77
Diclorofen	88.2	1,257.61
Niclosamida	91.3	141.98

Se determinó si existe una relación semilogarítmica entre esta propiedad y la actividad de transformación. Los resultados se muestran en la Figura 21. La correlación que existe es más baja que la obtenida con respecto al potencial redox. ($R^2 = 0.0051$). Sin embargo, cabe mencionar que el único valor que no cumple con la tendencia esperada es el bromoxinil. Es posible que los cálculos teóricos de la energía de enlace no sean iguales a los valores reales por lo que es necesario determinar experimentalmente los valores para esta propiedad.

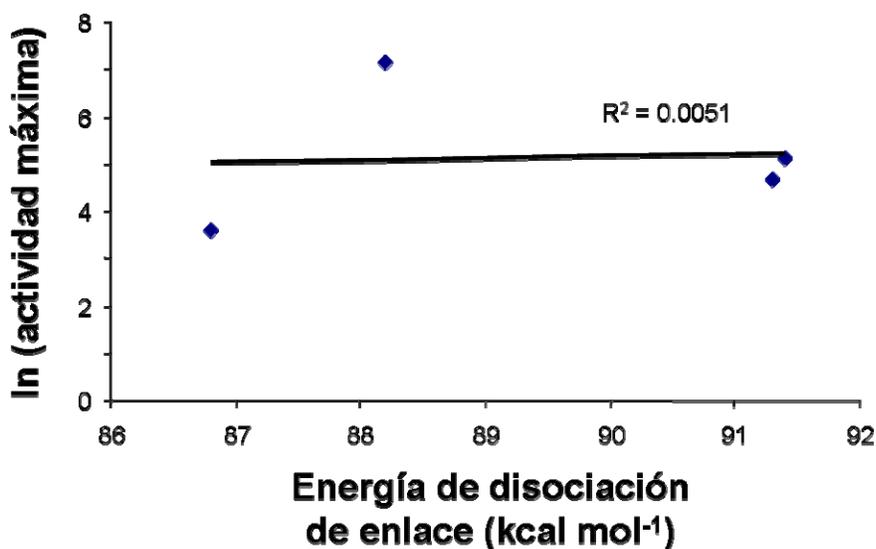


Figura 15. Correlación entre la energía de disociación de enlace del hidrógeno fenólico y la actividad máxima de transformación de los plaguicidas.

Para poder establecer por cuál mecanismo está actuando este mediador, es necesario hacer análisis posteriores ampliando el rango de sustratos, ya que los datos obtenidos no clarifican por cuál mecanismo está actuando el mediador.

En el caso particular del diclorofen, la actividad máxima observada fue de $1,257.6 \text{ nmol min}^{-1} \text{ U}^{-1}$, 6.5 veces mayor que la actividad máxima observada en la transformación de siringaldehído. Sabemos que la oxidación de los plaguicidas se da por acción del radical de siringaldehído producido por la lacasa. De acuerdo al mecanismo propuesto para el sistema lacasa-mediador, cuando el radical del mediador interactúa con el sustrato, el mediador se regenera hacia su estado reducido, evitando que el mediador se oxide por completo. Dada la similitud estructural que existe entre los compuestos, es posible que la DMBQ funcione como un inhibidor de la lacasa al competir con el siringaldehído por el sitio activo de la enzima. De esta manera, cuando el plaguicida está presente en el medio, el siringaldehído se está regenerando hacia su estado reducido y se produce DMBQ en menor proporción, obteniéndose una actividad de transformación mayor que cuando está presente sólo el mediador. Es por ello que se analizó el efecto que pudiera tener la DMBQ sobre la actividad de la lacasa. Para este caso, se utilizó siringaldazina como sustrato modelo. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 4. Actividad enzimática de la lacasa sobre la siringaldazina en presencia de DMBQ.

Concentración de DMBQ (μM)	Actividad específica (s^{-1})	Actividad relativa (%)
0	269.04	100.0
250	272.73	101.4
500	254.30	94.5

Estos resultados indican que la DMBQ no está inhibiendo la actividad de la lacasa, al menos a concentraciones que pudieran estar presentes durante la transformación del diclorofen. Será interesante explorar otras posibilidades para este aumento en la actividad con el diclorofen.

6.5. Identificación de los productos de transformación por el sistema lacasa-siringaldehído.

El objetivo primario de la transformación de contaminantes es la disminución de los efectos negativos que éstos ejercen en el ambiente. Es por ello que al estudiar nuevos métodos para su transformación es importante determinar la naturaleza de los productos obtenidos. Así mismo, conociendo las transformaciones químicas que sufrieron los compuestos, se pueden proponer los mecanismos de transformación. En este trabajo se logró identificar los productos de la transformación del bromoxinil y del diclorofen, utilizando el siringaldehído como mediador.

6.5.1. Bromoxinil.

En la Figura 22 se muestra una comparación entre el cromatograma control y después de 10 minutos de reacción, medido a 250 nm, con una concentración inicial de 1 mM de siringaldehído y 1 mM de bromoxinil. En el control, el siringaldehído eluye al minuto 10 y el bromoxinil al minuto 18.2. Después de la reacción, se puede observar la aparición de 2 picos importantes. Al minuto 7.2 aparece un compuesto que de acuerdo a los resultados previos, debe corresponder a la DMBQ. Al minuto 19.1 observamos otro compuesto que debe corresponder al producto de transformación del bromoxinil.

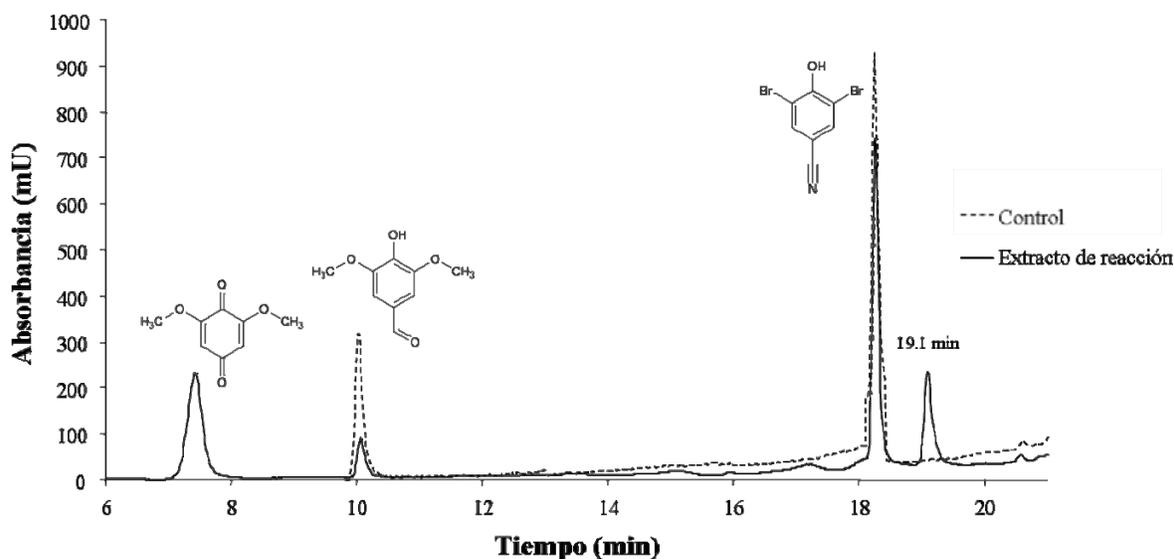


Figura 16. Comparación del cromatograma control y de la reacción de transformación del bromoxinil por el sistema lacasa-siringaldehído.

Al analizar el extracto de la reacción por GC-MS, se logró identificar el bromoxinil, el siringaldehído y la DMBQ, pero no se logró detectar el producto de transformación. Después de purificar los productos por HPLC y analizarlos por MS, el primer pico se identificó como DMBQ, como era de esperarse por los resultados previos. En la Figura 23 se muestra el patrón de fraccionamiento en MS para el compuesto con tiempo de retención de 19.1 minutos. El compuesto presentó un peso molecular de 377 m/z . La pérdida de un fragmento de masa 31 m/z equivale a la pérdida de un grupo OCH_3 dando lugar a la formación de un fragmento de 346 m/z . Por la pérdida sucesiva de un CN (26 m/z) se obtiene el fragmento de 320 m/z . La posterior pérdida simultánea de un grupo aldehído (29 m/z) y de un grupo hidroxilo (17 m/z) da lugar al fragmento de 274 m/z . El fragmento 239 m/z resulta de las pérdidas de 17 m/z , 29 m/z y 79 m/z (Br) a partir del compuesto de 377 m/z . Al romperse la molécula en 2 partes, se obtienen los fragmentos de 212 m/z y 166 m/z . Todas estas fragmentaciones se esquematizan sobre la estructura química propuesta para este compuesto.

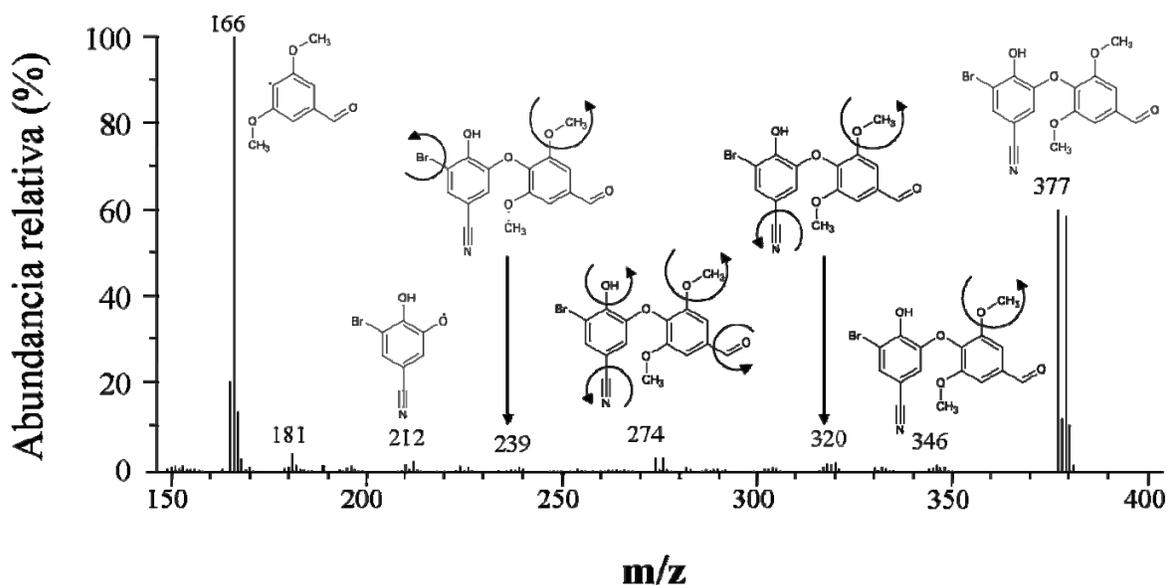


Figura 17. Estructura propuesta para el producto de transformación (PM 377) del bromoxinil y su patrón de fraccionamiento obtenido por espectrometría de masas.

Este compuesto se identificó como 3-bromo-5-(4-formil-2,6-dimetoxifenoxi)-4-hidroxibenzonitrilo y fue el único producto identificado de la transformación del bromoxinil por el sistema lacasa-siringaldehído. Su estructura química nos indica que es un aducto entre el bromoxinil y el siringaldehído, que puede resultar de la fusión de los radicales producidos durante la reacción.

En la Figura 24 se muestra el mecanismo de reacción propuesto. Primeramente, el radical del siringaldehído sustrae el protón del bromoxinil por medio de la ruta HAT. El radical se deslocaliza a posición *orto* donde se fusiona con un radical fenoxilo del siringaldehído, liberando un ión bromuro. Finalmente un protón estabiliza la molécula dando como resultado la formación de un aducto entre el bromoxinil y el siringaldehído. El proceso de entrecruzamiento entre el mediador y su sustrato ha sido reportado con anterioridad en otros sistemas, y se propone que es un método de detoxificación dado que el producto tiene un tamaño mayor lo que disminuye la movilidad del contaminante en el ambiente [57].

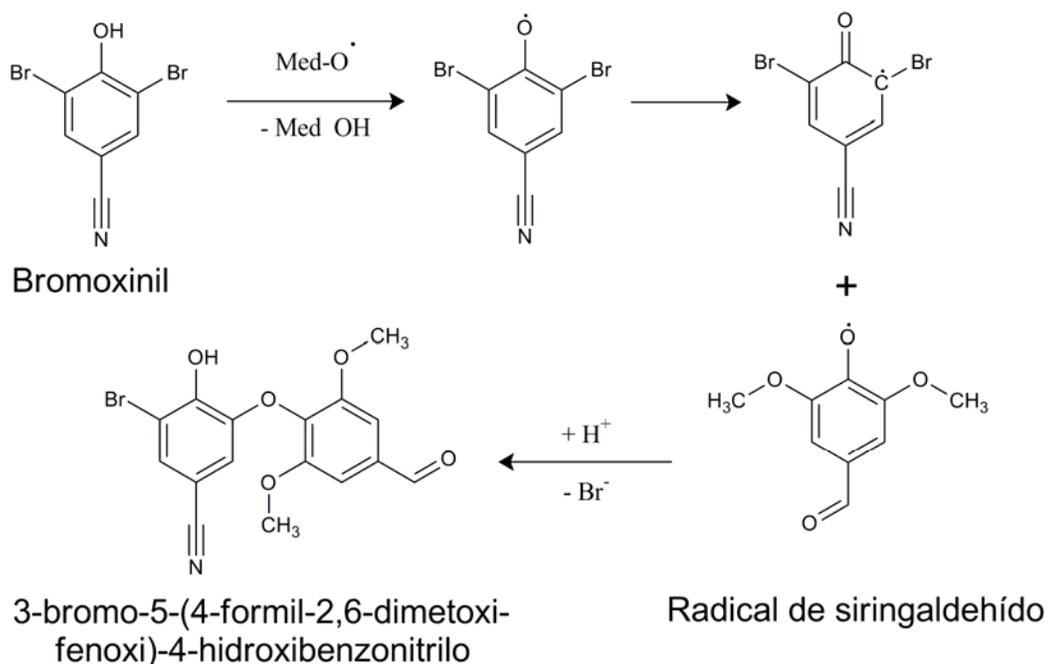


Figura 18. Mecanismo propuesto para la transformación del bromoxinil por el sistema lacasa-siringaldehído.

Como se mencionó con anterioridad y como se muestra en la Figura 22, sólo se observa un producto. Esto se puede deber a que la molécula de bromoxinil es simétrica y que posiblemente se produzca sólo un radical estable que reacciona con el primer radical producido por acción de la lacasa sobre el siringaldehído. Considerando que el mismo radical que genera el radical del bromoxinil se consume, el mediador está siendo consumido durante la reacción; esto nos explica por qué la actividad de transformación de este plaguicida es más baja que la observada con los demás plaguicidas, ya que el siringaldehído puede realizar menos ciclos de oxidación del plaguicida.

6.5.2. Diclorofen.

En la Figura 25 se muestra una comparación entre el cromatograma control y de la reacción de transformación del diclorofen, utilizando un gradiente lineal agua:ACN, medido a 280 nm, con una concentración inicial de 1 mM de siringaldehído y 2 mM de diclorofen. Se puede observar que hay un pico importante que aparece como producto de la reacción alrededor del minuto 14.5, además de otros 2 picos menores que aparecen después del minuto 15. Para identificar estos productos, se procedió a purificarlos de la reacción sin extraer por HPLC, utilizando un exceso de plaguicida (2:1 plaguicida-mediador) para asegurar una alta concentración de producto.

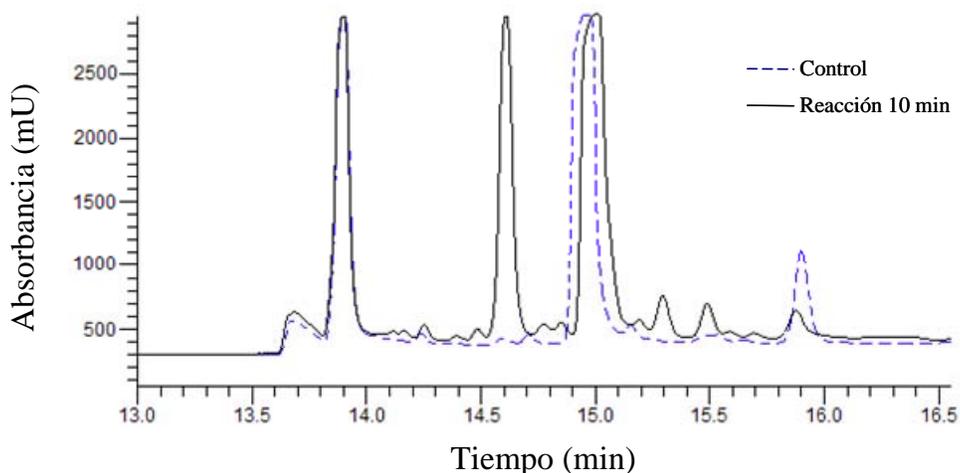


Figura 19. Comparación del cromatograma control y de la reacción de transformación del diclorofen por el sistema lacasa-siringaldehído.

En la Figura 26 se muestra el patrón de fraccionamiento en MS para el producto con tiempo de retención de 14.5 min. El compuesto analizado presentó un ión molecular de 248 m/z . La pérdida de un grupo hidroxilo da lugar a la formación de un fragmento de 231 m/z . La eliminación de un cloro (35 m/z) del ión molecular da lugar al fragmento de 213 m/z . Las pérdidas simultáneas de 28 m/z (grupo C=O) y de 35 unidades dan lugar al fragmento de 185 m/z . El fragmento de 165 unidades es el resultado de las pérdidas de 17, 35 y 28 unidades a partir del compuesto de 248 m/z . Todas estas fragmentaciones se esquematizan sobre la estructura química de cada uno de los fragmentos formados.

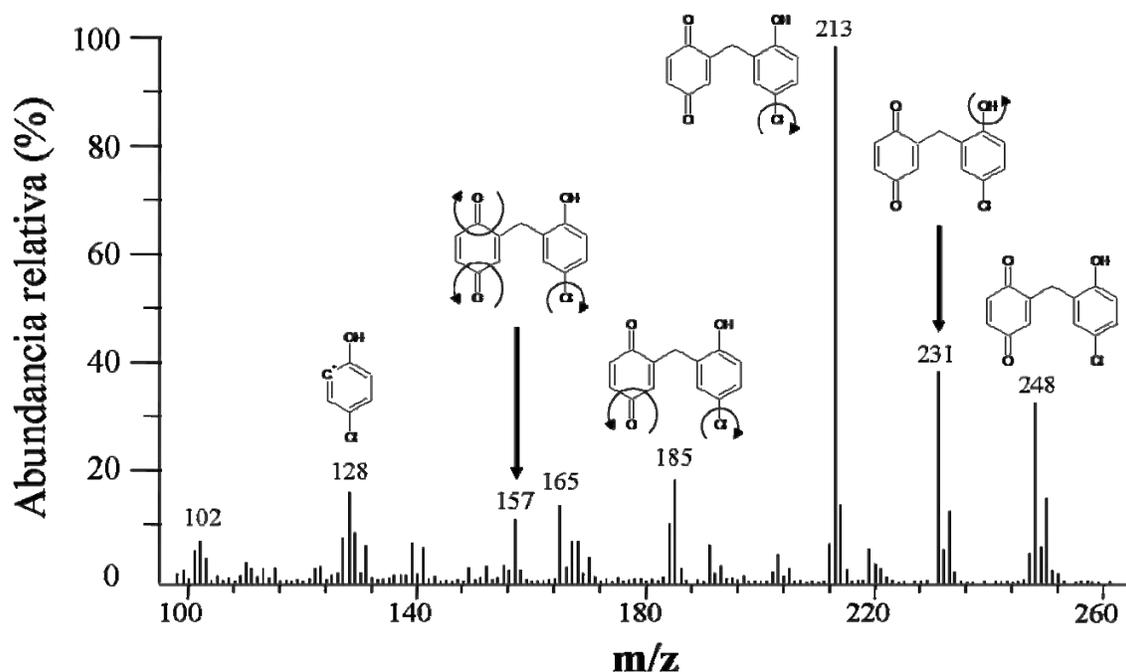


Figura 20. Estructura propuesta para el producto de reacción (PM 248) del diclorofen y su patrón de fraccionamiento obtenido por espectrometría de masas.

El principal producto de transformación del diclorofen se identificó como 4-clorofenol-2,2'-metilen quinona, que corresponde al mismo compuesto identificado por Dávila y colaboradores [3] en la oxidación del diclorofen por la acción de la manganeso peroxidasa, y corresponde a una reacción de deshalogenación oxidativa. Este tipo de deshalogenación resulta en la formación de la

parabenzoquinona correspondiente. El proceso de deshalogenación oxidativa es de gran importancia dado que la toxicidad de los compuestos está relacionada con su grado de halogenación, por lo que es de esperarse que el producto de transformación sea menos tóxico [58].

En la Figura 27 se muestra el mecanismo propuesto para esta reacción. Primero, el radical del siringaldehído sustrae el protón del diclorofen por medio de la ruta HAT. El radical se deslocaliza a posición *para* donde es atacado por un hidroxilo. Después se da la liberación de un protón y de un ión cloro, dando como resultado una deshalogenación oxidativa.

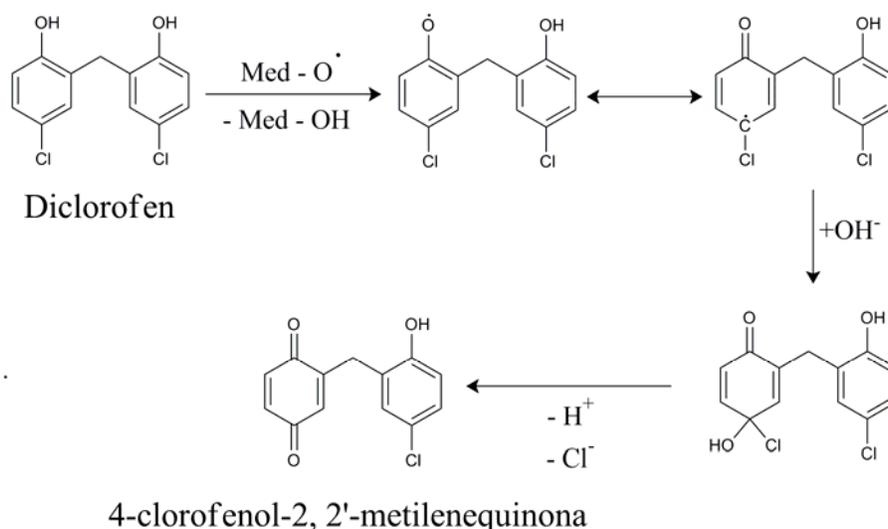


Figura 21. Mecanismo propuesto para la transformación del diclorofen por el sistema lacasa-siringaldehído.

No se pudo determinar la naturaleza de los otros picos observados por HPLC, porque probablemente se encuentran en baja concentración. Es por eso que se procedió a escalar la reacción a 100 ml utilizando proporciones equimolares de mediador:plaguicida. El extracto de la reacción se analizó por GC-MS, y el cromatograma obtenido se muestra en la Figura 28. Se lograron separar varios compuestos cuyos tiempos de retención y pesos moleculares se enlistan en la Tabla 7.

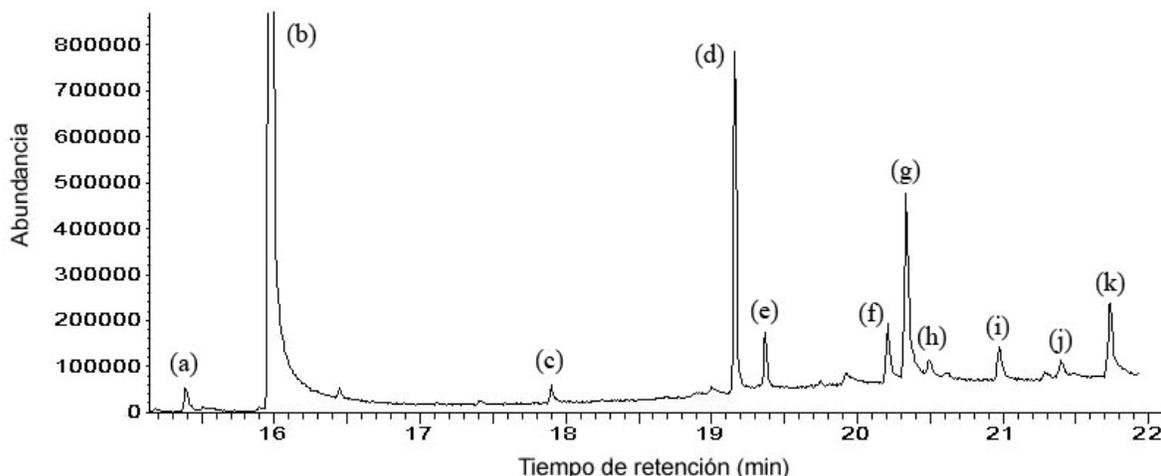


Figura 22. Cromatograma del extracto de reacción de la transformación del diclorofen analizado por GC.

Tabla 5. Distribución de pesos moleculares de los compuestos presentes en el extracto de reacción del diclorofen.

Pico	Tiempo de retención (min)	Peso molecular	Pico	Tiempo de retención (min)	Peso molecular
a	15.4	196	g	20.3	282
b	16.0	182	h	20.5	278
c	17.9	290	i	20.9	268
d	19.2	324	j	21.4	264
e	19.4	320	k	21.7	268
f	20.2	306			

El primer pico que observamos (a), fue identificado como 3, 4, 5-trimetoxibenzaldehído y es un contaminante presente en el siringaldehído. El siguiente compuesto es el más abundante con un tiempo de retención de 16 minutos (b) y corresponde al siringaldehído, lo que nos indica que el mediador no fue consumido en su totalidad durante la reacción. Los picos que aparecen a los minutos 20.9 (i) y 21.7 (k) fueron identificados como isómeros del diclorofen.

En la Figura 29 se muestra el espectro de masas correspondiente al producto con tiempo de retención de 17.9 minutos. El compuesto presentó un ión molecular

de 290 m/z . La pérdida de un cloro da lugar a un fragmento de 255 m/z . La eliminación simultánea de dos grupos metilo y un grupo aldehído producen el fragmento de 215 m/z . El fragmento de 181 m/z resulta de las pérdidas de dos grupos metilo, un grupo aldehído y un cloro. La estructura propuesta se esquematiza sobre el espectro de masas así como las fragmentaciones correspondientes.

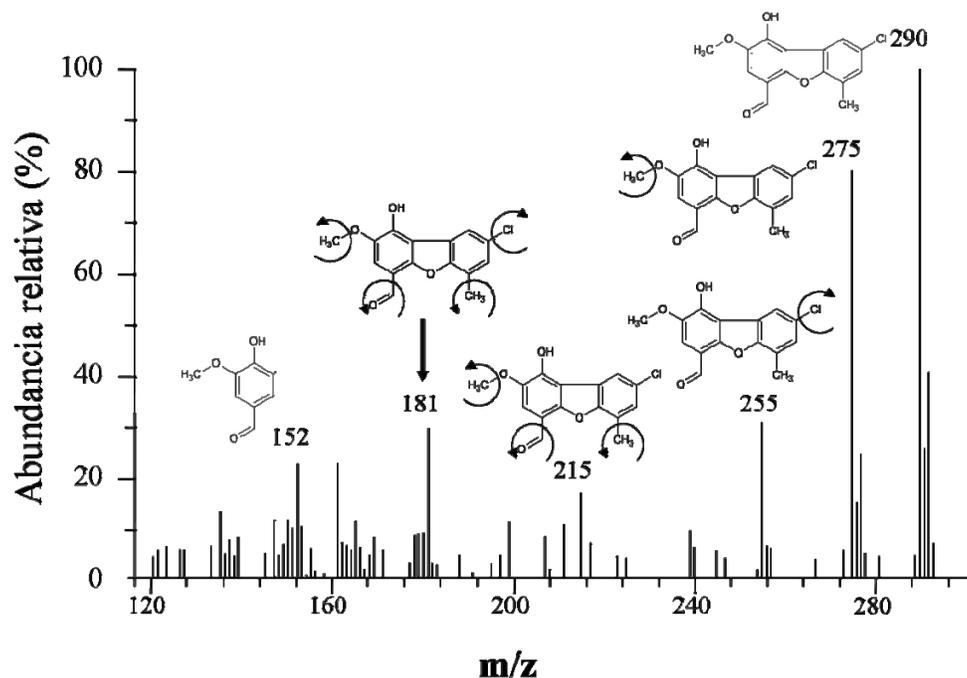


Figura 23. Estructura propuesta para el producto de PM 290 y su patrón de fraccionamiento obtenido por espectrometría de masas.

El compuesto con tiempo de retención de 19.2 minutos presentó un peso molecular de 324 m/z . La pérdida de un ión cloro da lugar al fragmento de 289 m/z . Las pérdidas simultáneas de dos grupos metoxi y un grupo metilo dan lugar al fragmento de 249 m/z . La posterior pérdida de dos grupos hidroxilo da lugar a la molécula de 215 m/z . La estructura propuesta y el patrón de fraccionamiento se muestran en la Figura 30.

El espectro de masas del compuesto con tiempo de retención de 19.4 minutos se muestra en la Figura 31. El compuesto presentó un ión molecular de 320 m/z . Al perder un ión cloro y un ión metilo, se obtiene una molécula de 270 m/z . Las pérdidas simultáneas de dos grupos metilo, un grupo metoxi y un grupo cetónico

dan lugar al fragmento de 231 m/z . Por último, al romperse la molécula en dos partes, se obtienen los fragmentos de 168 m/z y 152 m/z .

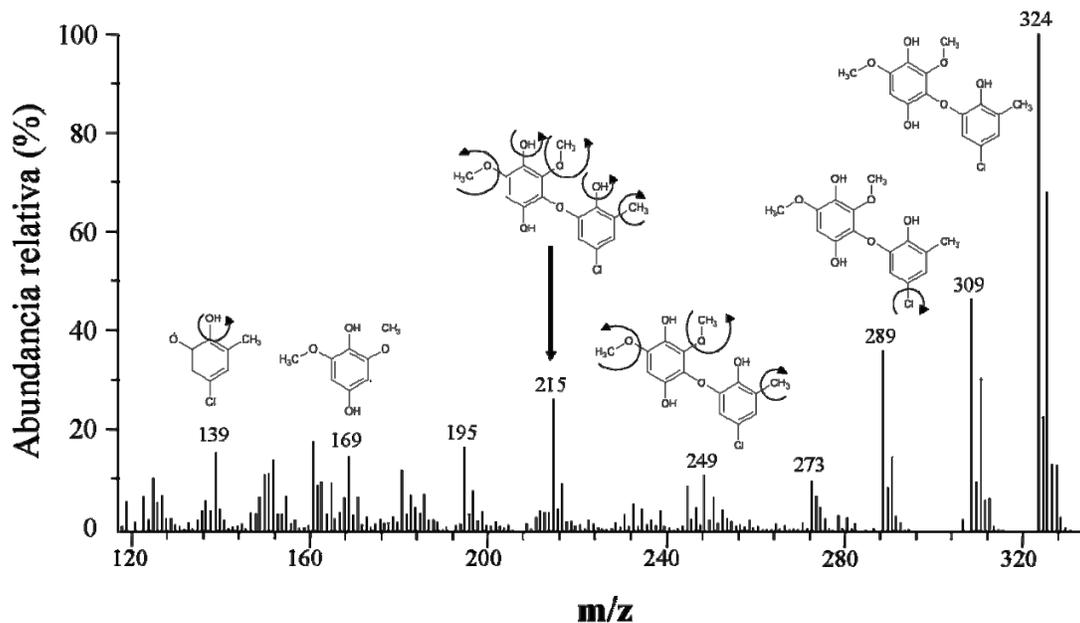


Figura 24. Estructura propuesta para el producto de PM 324 y su patrón de fraccionamiento obtenido por espectrometría de masas.

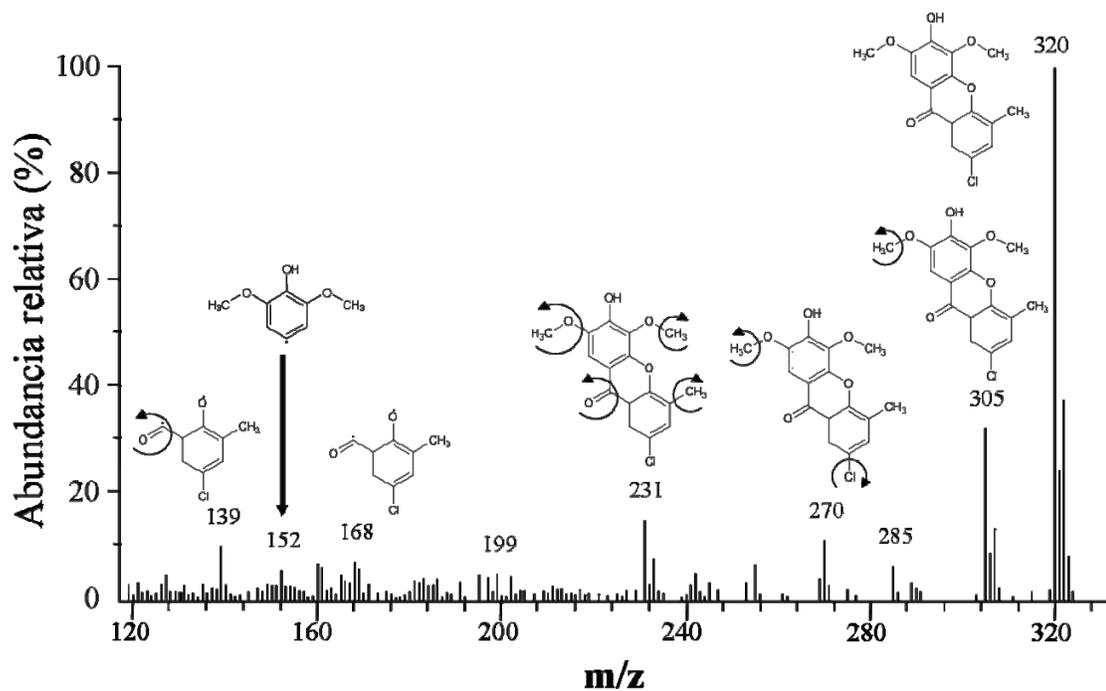


Figura 25. Estructura propuesta para el producto de PM 320 y su patrón de fraccionamiento obtenido por espectrometría de masas.

El siguiente compuesto, con tiempo de retención de 20.2 minutos, presentó un ión molecular de 306 m/z . La pérdida de un grupo cetónico da lugar a un fragmento de 278 m/z . La posterior pérdida de un grupo cloro y un grupo aldehído dan lugar a la molécula de 215 m/z , que al perder un grupo metilo y un grupo metoxi, genera el fragmento de 168 m/z .

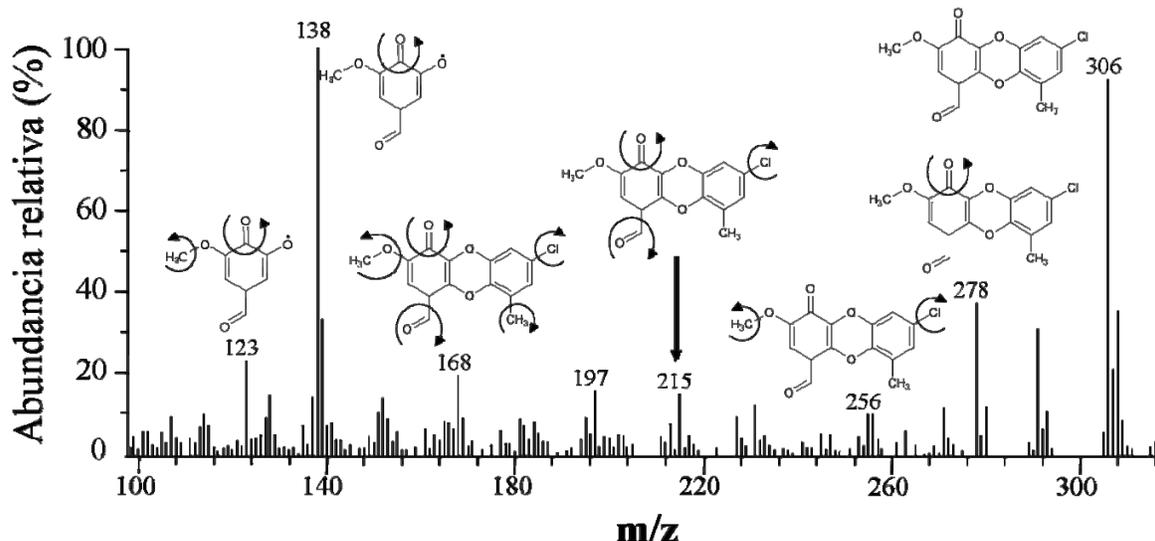


Figura 26. Estructura propuesta para el producto de PM 306 y su patrón de fraccionamiento obtenido por espectrometría de masas.

El siguiente compuesto, con tiempo de retención de 21.4 minutos, presentó un ión molecular de 282 m/z . La pérdida de un grupo cloro da lugar a un fragmento de 247 m/z . El ión más abundante observado de 142 m/z que corresponde a la mitad de la molécula. Esto nos indica que el compuesto resulta de la fusión de dos radicales de diclorofen.

Para el compuesto con peso molecular de 278 m/z no fue posible proponer una estructura. El último compuesto identificado presentó un ión molecular de 264 m/z . La pérdida de un ión cloro da lugar a un fragmento de 229 m/z . Los principales iones corresponden a la ruptura de la molécula en dos partes, dando lugar a los fragmentos de 142 m/z y 122 m/z . Su patrón de fraccionamiento y estructura propuesta se muestra en la Figura 34.

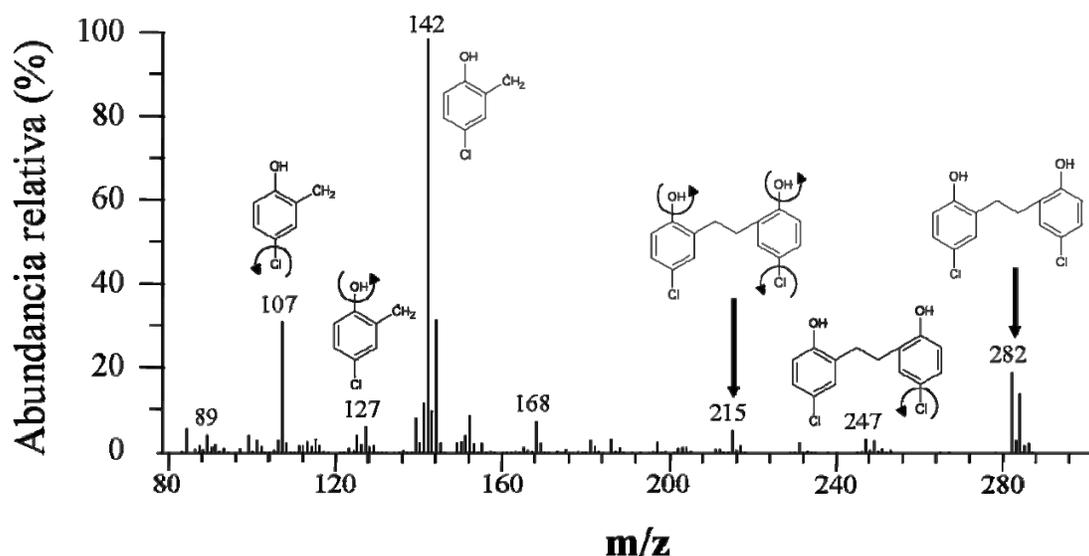


Figura 27. Estructura propuesta para el producto de PM 282 y su patrón de fraccionamiento obtenido por espectrometría de masas.

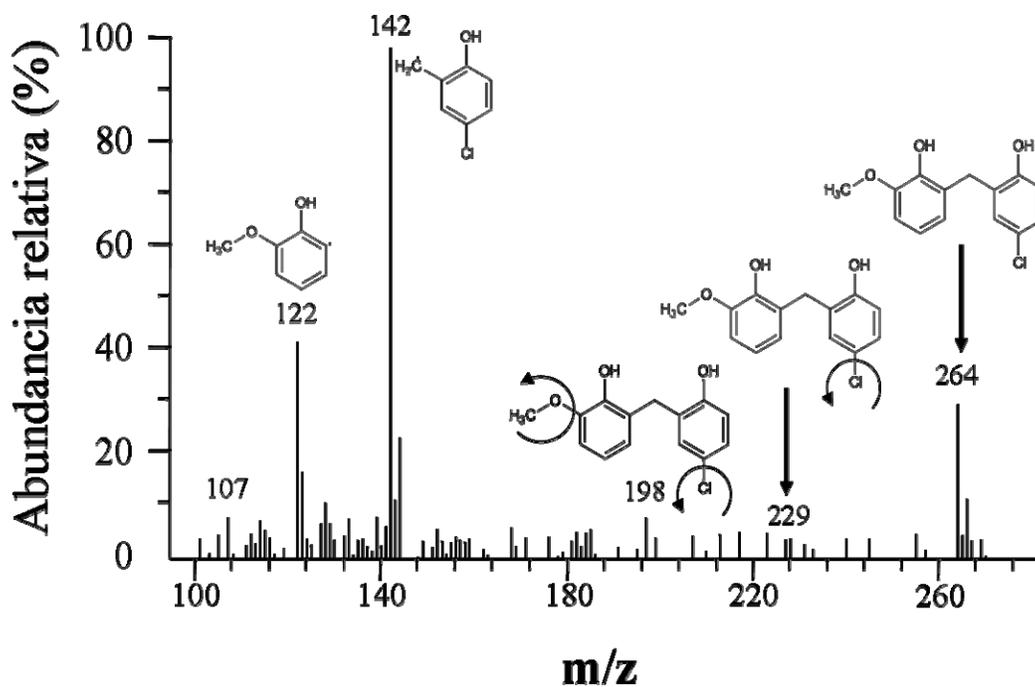


Figura 28. Estructura propuesta para el producto de PM 264 y su patrón de fraccionamiento obtenido por espectrometría de masas.

En la Figura 35 se muestra un resumen de las estructuras propuestas para los productos identificados que se enlistaron en la Tabla 7. La naturaleza de los compuestos muestra que hay formación de aductos entre el siringaldehído y el diclorofen, excepto por el compuesto (g) que resulta de la unión de 2 radicales de diclorofen.

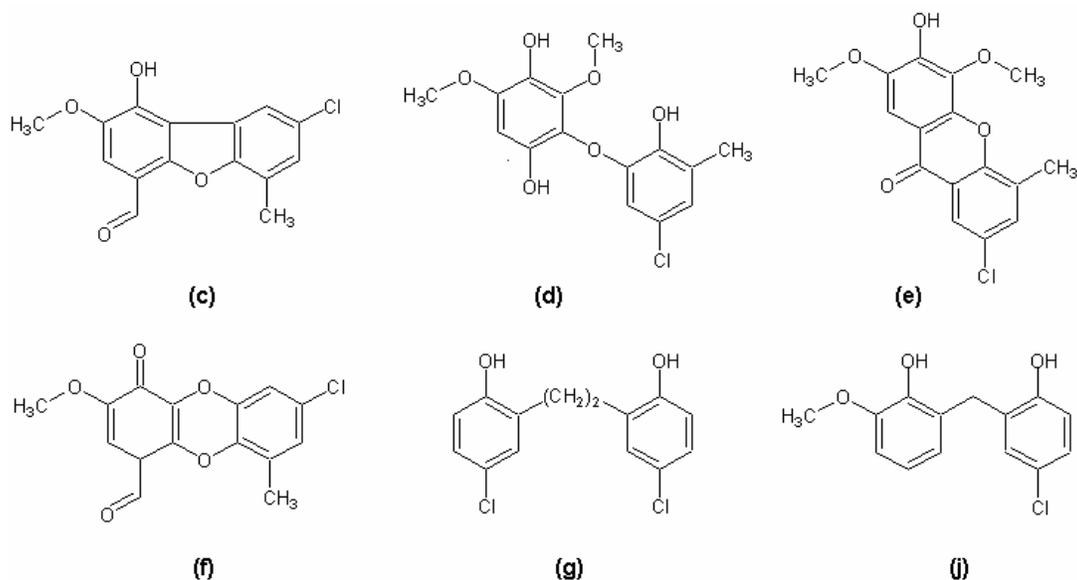


Figura 29. Productos de transformación del diclorofen identificados por GC-MS.

Bollag y colaboradores [57] demostraron que en presencia de lacasa, hay entrecruzamiento de compuestos fenólicos clorados con ácido sirínico, un monómero de la lignina. Observaron que hay dos tipos de entrecruzamientos: oligómeros quinoides, consistentes en clorofenoles unidos por enlaces éter a productos ortoquinólicos del ácido sirínico, y oligómeros fenólicos, consistentes en clorofenoles unidos por enlaces éter a los a productos descarboxilados del ácido sirínico. También se ha demostrado la formación de enlaces C-C entre el ácido sirínico y el 2,4-diclorofenol [59]. Esto nos habla de que durante la transformación de xenobióticos mediada por compuestos fenólicos se genera una gran variedad de productos dado que se trata de la unión de diferentes radicales libres. En el caso del siringaldehído con el diclorofen, obtenemos varios tipos de compuestos porque durante la reacción se forman distintos radicales debido al

reacomodo de los electrones desapareados. Por los límites de detección del equipo usado, no se pudieron identificar compuestos de tamaño superior a dímeros, pero es muy probable que durante la reacción se obtengan productos de más alto peso molecular, como se reportó en la transformación del bromoxinil utilizando la peroxidasa versátil [3].

El siringaldehído es un compuesto que forma parte del humus y por lo tanto, está presente de forma natural en el suelo. Si estas reacciones se llevan a cabo *in situ*, es posible que los plaguicidas se incorporen al humus durante el proceso de humificación reduciendo su biodisponibilidad y con ello su toxicidad [58, 60]. Además, disminuiría su movilidad por lixiviación reduciendo la contaminación de mantos acuíferos y otros sistemas acuáticos [60]. Una posible preocupación que puede surgir de este método de detoxificación es la reversibilidad del proceso de entrecruzamiento. Esta posibilidad fue explorada por Dec y Bollag [61] donde se estudió la movilidad de fenoles clorados marcados con ^{14}C e incorporados al ácido húmico. Al incubar los polímeros con microorganismos presentes en el suelo, la radioactividad del suelo disminuía en un 20%, dato correlacionado con el aumento en la concentración de $^{14}\text{CO}_2$, lo que significa que la liberación de los compuestos fenólicos iba acompañada de su mineralización.

Tomando en cuenta la reducción en la toxicidad y la biodisponibilidad de los químicos unidos, las bajas velocidades de liberación, y que, una vez liberados, son susceptibles a la mineralización por microorganismos del suelo, la inmovilización de los plaguicidas es una buena alternativa de remediación al no constituir ninguna amenaza inmediata o a largo plazo para el ambiente [62].

6.6. Efecto de la relación mediador:plaguicida en la transformación del diclorofen.

De acuerdo al esquema de la Figura 3, el radical del mediador que se produce por efecto de la lacasa se regenera hacia el mediador reducido. Esto implica que el mediador no se está oxidando por completo, o si lo hace, es en menor proporción cuando el sustrato se encuentra presente. Una de las interrogantes que surgen del mecanismo propuesto es si durante la oxidación del diclorofen, el

mediador siringaldehído realmente se está regenerando hacia su estado reducido. Si este fuera el caso, al incrementar la concentración del plaguicida debería reducirse la formación de la DMBQ. Para responder ésta interrogante, se estudió el efecto de incrementar la concentración del plaguicida manteniendo la concentración del mediador fija, esperando que cuando la proporción del plaguicida excediera la concentración del mediador, la cantidad de mediador oxidado sería menor.

En la Figura 36 se muestra una comparación entre el cromatograma control y la reacción, utilizando una concentración inicial de siringaldehído 1 mM y diclorofen 250 μ M, utilizando un gradiente agua:metanol y medido a 280 nm. En el cromatograma control se observa un pico a los 8.6 minutos que corresponde al siringaldehído, un pequeño pico a los 13 minutos que es un contaminante del diclorofen y el diclorofen a los 19.3 minutos. Después de 10 minutos de reacción, se aprecia la aparición de varios productos. A los 5.6 y 12.2 minutos aparecen los compuestos identificados como productos del siringaldehído. Los otros 5 picos que se observan aparecen sólo cuando hay diclorofen en la reacción. Los tiempos de retención correspondientes son 9.6, 16.4, 17.7, 18.2 y 19 minutos.

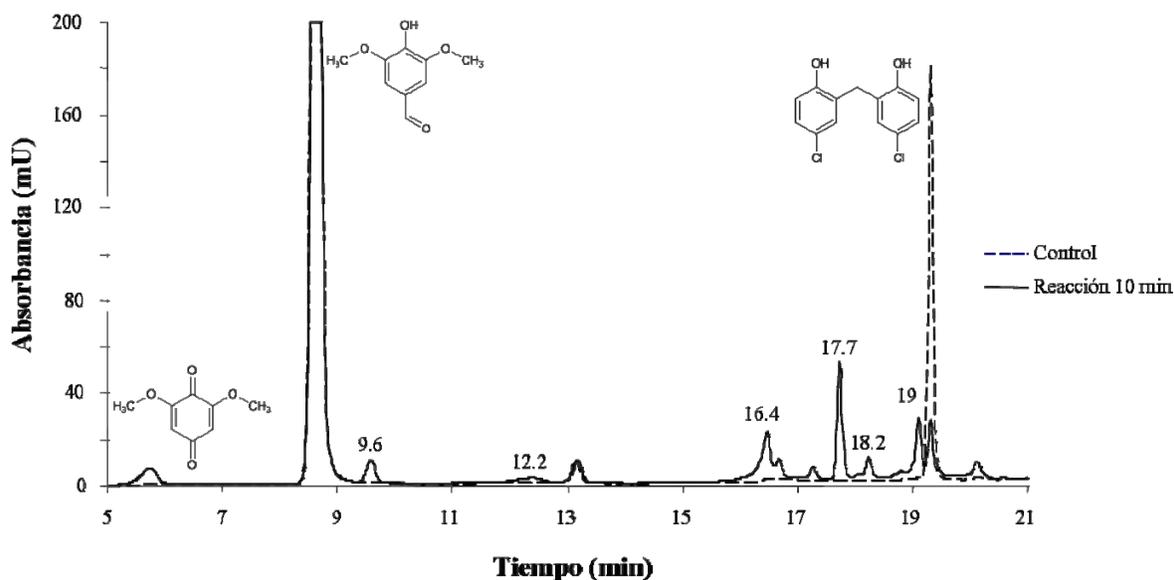


Figura 30. Comparación del cromatograma control y de la reacción de transformación de diclorofen por el sistema lacasa-siringaldehído.

En estos ensayos, la concentración de siringaldehído se mantuvo fija en 1 mM, la concentración máxima de mediador donde el oxígeno no es limitante. La concentración de diclorofen se fue aumentando desde 200 μ M hasta 2 mM, es decir, desde una proporción de mediador:plaguicida 5:1 hasta 1:2. En la Figura 37 se muestra la gráfica de actividad de transformación del diclorofen.

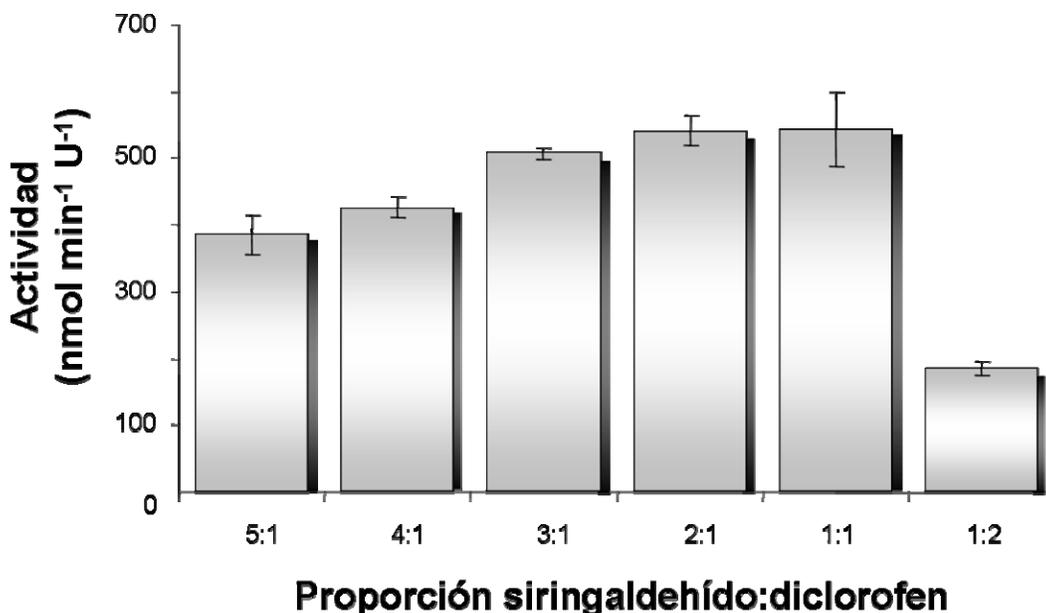


Figura 31. Actividad de transformación del diclorofen, a diferentes proporciones de mediador:sustrato.

Al aumentar la cantidad de diclorofen, la actividad aumenta hasta un máximo cuando el mediador y el plaguicida se encuentran en concentraciones equimolares. Cuando el diclorofen está en una proporción molar de 2 a 1, hay una caída de actividad lo que nos puede sugerir la inhibición de la enzima por alguno de los productos de transformación del diclorofen.

En la Figura 38 observamos que al aumentar la cantidad de diclorofen, se produce menos DMBQ, es decir, hay menos oxidación del siringaldehído. Esto puede indicar que el radical responsable de la degradación del plaguicida se regenera hacia el estado reducido antes de llegar a DMBQ, o que se está consumiendo durante la reacción formando aductos con otros radicales presentes en la reacción.

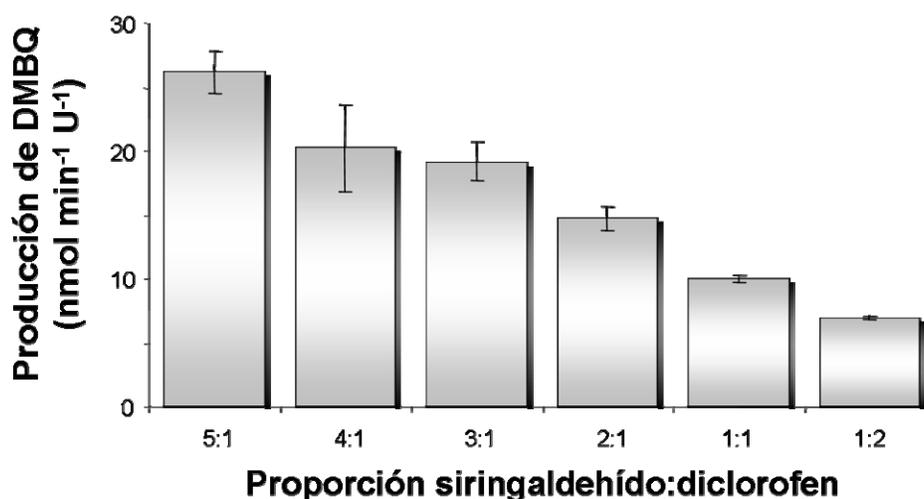


Figura 32. Producción de DMBQ, a diferentes proporciones de mediador:sustrato.

También se midió la aparición del otro producto de transformación del siringaldehído, aunque ya se había observado que su concentración es mínima en comparación con la DMBQ. En la Figura 39 observamos que sigue el mismo perfil que la DMBQ que nos indica que al aumentar la proporción de diclorofen, hay menos oxidación del siringaldehído. Con esto comprobamos que la aparición de este producto no se está favoreciendo con la presencia del diclorofen.

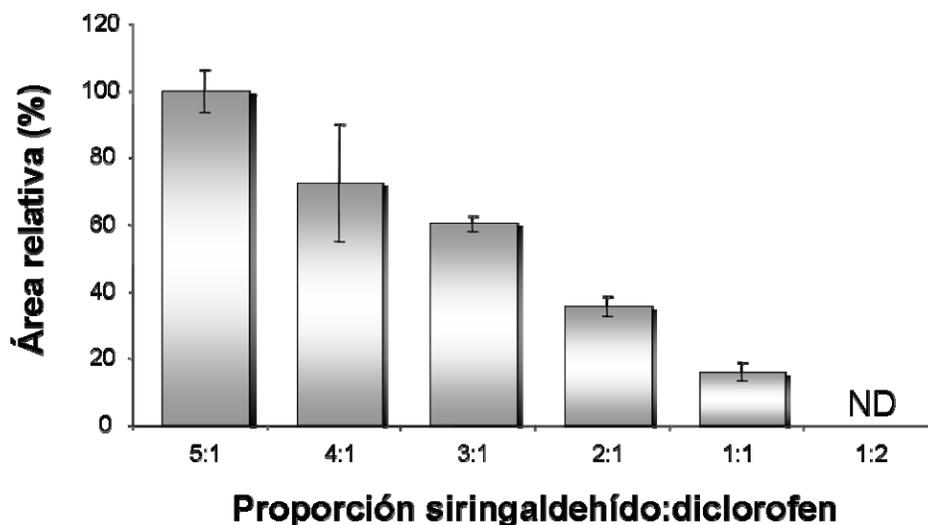


Figura 33. Aparición de producto (tiempo de retención de 12 min), a diferentes proporciones de mediador:sustrato (ND: no detectable).

El comportamiento observado para los dos productos del siringaldehído nos indica que la cantidad de diclorofen en el medio de reacción sí tiene un efecto en la oxidación del mediador. Como era de esperarse, al haber más plaguicida disponible en el medio, el mediador sigue otros caminos que no son su oxidación completa. Existen dos posibilidades: a) el mediador se regenera a su estado reducido, tal y como se propone para el sistema lacasa-mediador, o b) el radical del mediador se está consumiendo en la reacción formando aductos con el plaguicida consumiendo radicales del siringaldehído, evitando que se oxide por completo. La opción b es la más probable, considerando que previamente se identificaron este tipo de productos para el diclorofen. Es por ello que también se analizó el comportamiento de la aparición de productos del diclorofen y los resultados se muestran en la Figura 40. Podemos ver que hay 3 tendencias distintas. Los compuestos que tienen un tiempo de retención de 9.6 y 16.4 minutos, disminuyen su concentración al aumentar la proporción de diclorofen. El compuesto con tiempo de retención de 18.2 minutos, mantiene su concentración relativamente constante a las distintas proporciones. Los compuestos con tiempos de retención de 17.7 y 19 minutos, muestran una tendencia a aumentar su concentración al aumentar la proporción de diclorofen.

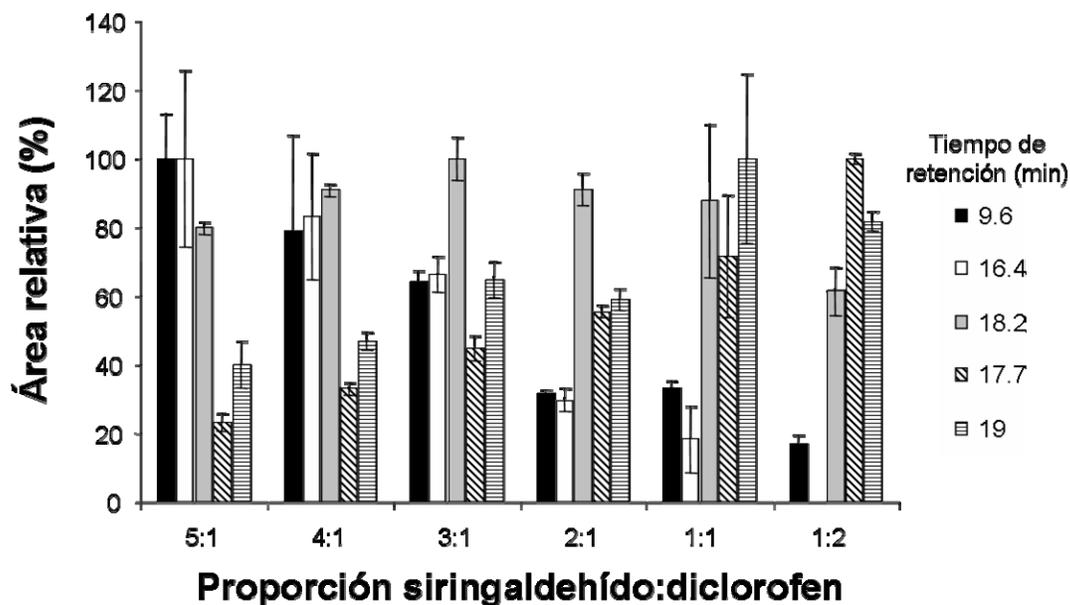


Figura 34. Aparición de productos relacionados con el diclorofen, a diferentes proporciones de mediador:sustrato.

Considerando que la mayoría de los productos que se identificaron previamente son aductos entre el siringaldehído y el diclorofen, puede ser que las diferentes tendencias observadas se deban a un efecto de competencia por los radicales. Tal como se muestra en la Figura 14, son varios los radicales de siringaldehído que se producen por acción de la lacasa. Es posible que los productos de 9.6 y 16.4 minutos se formen por fusión con los últimos radicales del siringaldehído, y que los productos de 17.7 y 19 minutos se formen con los primeros radicales. Así, al aumentar la proporción de diclorofen en el medio, se favorece el consumo de los primeros radicales del siringaldehído evitando la formación de los radicales posteriores y la aparición de los otros aductos. Es necesario determinar la naturaleza química de cada uno de estos compuestos para poder establecer la razón de los diferentes comportamientos.

Finalmente, se logró el objetivo principal de expandir el rango de sustratos de la lacasa hacia plaguicidas organohalogenados, y sobre todo, utilizando mediadores naturales. Este trabajo abre las puertas a nuevas estrategias de detoxificación de plaguicidas en las cuales se reduzca su biodisponibilidad mediante la unión con sustancias que se encuentran presentes en el suelo.

7. Conclusiones

En este trabajo se demostró que el uso de diferentes mediadores tanto naturales como sintéticos favorece la transformación de plaguicidas organohalogenados utilizando la lacasa. De los 9 mediadores analizados, la mayor actividad se obtuvo con los mediadores naturales siringaldehído y acetosiringona. Los mediadores sintéticos ABTS, HBT y TEMPO fueron capaces de transformar los plaguicidas, pero con menor eficiencia.

El siringaldehído fue elegido como mediador modelo. La lacasa transformó este compuesto con una eficiencia catalítica de $k_{\text{cat}} / K_M = 1.34 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, es decir, con una eficiencia catalítica intermedia. Cuando la lacasa sustrae un electrón del siringaldehído, se produce un radical fenoxilo que después de una serie de transformaciones químicas, da lugar a al menos dos diferentes productos, siendo el compuesto mayoritario la 2,6-dimetoxibenzoquinona.

El sistema lacasa-siringaldehído fue ensayado en la transformación de 11 diferentes plaguicidas organohalogenados, de los cuales diclorofen, bromofenoxim, niclosamida y bromoxinil son sustrato y las actividades máximas de transformación fueron $1,271 \text{ nmol min}^{-1} \text{ U}^{-1}$, $166 \text{ min}^{-1} \text{ U}^{-1}$, $142 \text{ nmol min}^{-1} \text{ U}^{-1}$, y $49 \text{ nmol min}^{-1} \text{ U}^{-1}$, respectivamente. Estas actividades presentaron una baja correlación con sus potenciales redox y con las energías de disociación de enlace de los hidrógenos fenólicos teóricas, por lo que no fue posible establecer con claridad si el siringaldehído funciona por medio de la ruta ET o la ruta HAT.

Para lograr la transformación de estos plaguicidas, se utilizaron proporciones de mediador de 2.5 a 1, una de las más bajas reportadas hasta ahora. Al analizar el efecto de la concentración de sustrato, observamos que al aumentar la concentración de sustrato, se disminuye la oxidación del mediador, lo cual se puede deber a que se favorece la regeneración del mediador hacia su estado reducido, o a que el mediador se consume en otras reacciones como puede ser la formación de aductos con el plaguicida.

Conclusiones

Fue posible identificar los productos de transformación para el diclorofen y el bromoxinil. En ambos casos se encontró la formación de aductos entre el siringaldehído y los plaguicidas, lo que indica que los plaguicidas son susceptibles a unirse a las sustancias húmicas del suelo, disminuyendo así su biodisponibilidad y por ende, su toxicidad. Para el caso específico del diclorofen se dio una deshalogenación oxidativa, un proceso de gran importancia para la detoxificación de contaminantes al lograr el rompimiento de un enlace carbono-halógeno el cual es muy recalcitrante. Por lo tanto, en el desarrollo de este trabajo se logró identificar mediadores naturales con alto potencial para su aplicación *in situ* en la biorremediación de sitios contaminados con plaguicidas organohalogenados.

8. Perspectivas

El empleo de diferentes mediadores permite expandir el rango de sustratos de la lacasa hacia compuestos recalcitrantes como plaguicidas organohalogenados. Aunque durante este trabajo se obtuvieron resultados que esclarecieron más el mecanismo por el cual actúan los mediadores, es importante determinar cuáles son los factores causantes de la disminución en la actividad de transformación de los plaguicidas a altas concentraciones de mediador. Así mismo, sería interesante determinar experimentalmente las energías de enlace de los hidrógenos fenólicos de los diferentes plaguicidas para determinar si el mediador siringaldehído está actuando por medio de la ruta HAT. Además, es necesario ampliar el rango de sustratos para establecer una correlación más clara con esta propiedad.

Por medio de espectrometría de masas se identificaron los diferentes tipos de productos de transformación de los plaguicidas bromoxinil y diclorofen. Es necesario determinar con certeza la estructura química de estos compuestos, utilizando otras técnicas instrumentales como resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría MALDI-TOF. En particular, sería interesante asignar la estructura química de los productos del diclorofen observados por HPLC para explicar los diferentes comportamientos al variar la proporción mediador:sustrato.

Es necesario hacer estudios de toxicidad, tanto de la totalidad del extracto de reacción como de los productos purificados para verificar si este proceso disminuye el riesgo que representan estos plaguicidas para el ambiente.

Finalmente, sería interesante diseñar un mediador redox para las lacasas más eficiente que los existentes basados en la elucidación de los mecanismos de reacción y con el uso de la química computacional.

9. Bibliografía.

1. **Barberá C.** 1989. *Plaguicidas agrícolas*. Cuarta edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España. Pp. 603.
2. **Ferrer A.** 2003. *Intoxicación por plaguicidas*. Anales del sistema sanitario de Navarra. **26**: 155-172.
3. **Davila-Vazquez G., Tinoco R., Pickard M.A., Vazquez-Duhalt R.** 2005. *Transformation of halogenated pesticides by versatile peroxidase from Bjerkandera adusta*. Enzyme and Microbial Technology. **36**: 223-231.
4. **Atterby H., Smith N., Chaudhry Q., Stead D.** 2002. *Exploiting microbes and plants to clean up pesticide contaminated environments*. Pesticide Outlook. **13**: 9-13.
5. **López-Carrillo L.** 1993. *Exposición a plaguicidas organofosforados*. Instituto Nacional de Salud Pública. México. Pp. 16-17.
6. **McCauley L.A., Anger W.K., Keifer M., Langley R., Robson M.G., Rohlman D.** 2006. *Studying health outcomes in farmworker populations exposed to pesticides*. Environmental Health Perspectives. **114**: 953-960.
7. **Kamel F., Hoppin J.A.** 2004. *Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease*. Environmental Health Perspectives. **112**: 950-958.
8. **Jauregui J., Valderrama B., Albores A., Vazquez-Duhalt R.** 2003. *Microsomal transformation of organophosphorus pesticides by white rot fungi*. Biodegradation. **14**: 397-406.
9. **Manahan S.** 1993. *Fundamentals of environmental chemistry*. Lewis Publishers. Estados Unidos. Pp. 844.
10. **Burrows H.D., Canle L M., Santaballa J.A., Steenken S.** 2002. *Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. **67**: 71-108.
11. **Chowdhury A., Pradhan S., Saha M., Sanyal N.** 2008. *Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies*. Indian Journal of Microbiology. **48**: 114-127.
12. **Sogorb M.A., Vilanova E.** 2002. *Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis*. Toxicology Letters. **128**: 215-228.
13. **Lan W.S., Cong J., Jiang H., Gu B.G., Qiao C.L.** 2005. *Biodegradation of pesticide pollutants by two kinds of enzymes coexpressed in genetically engineered bacteria*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. **75**: 335-342.
14. **Sutherland T., Russell R.** 2002. *Using enzymes to clean up pesticide residues*. Pesticide Outlook. **13**: 149-151.

15. **Wang J.-F., Gao M.-H., Wu N.-F., Pan C.-P.** 2008. *The degradation effects of a Pseudomonas hydrolase OPHC2 to organophosphorus insecticides. Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements.* **183**: 804-810.
16. **Dávila G., Vázquez-Duhalt R.** 2006. *Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales.* Vol. XXX. Mensaje Bioquímico. Pp. 29-54.
17. **Pointing S.B.** 2001. *Feasibility of bioremediation by white-rot fungi.* Applied Microbiology and Biotechnology. **57**: 20-33.
18. **Amitai G., Adani R., Sod-Moriah G., Rabinovitz I., Vincze A., Leader H., Chefetz B., Leibovitz-Persky L., Friesem D., Hadar Y.** 1998. *Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase.* FEBS Letters. **438**: 195-200.
19. **Maruyama T., Komatsu C., Michizoe J., Ichinose H., Goto M.** 2006. *Laccase-mediated oxidative degradation of the herbicide dymron.* Biotechnology Progress. **22**: 426-430.
20. **Petersen L.C., Degn H.** 1978. *Steady-state kinetics of laccase from Rhus vernicifera.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology. **526**: 85-92.
21. **Valderrama B., Oliver P., Medrano-Soto A., Vazquez-Duhalt R.** 2003. *Evolutionary and structural diversity of fungal laccases.* Antonie van Leeuwenhoek. **84**: 289-299.
22. **Baldrian P.** 2006. *Fungal laccases: occurrence and properties.* FEMS Microbiology Reviews. **30**: 215-242.
23. **Morozova O.V., Shumakovich G.P., Gorbacheva M.A., Shleev S.V., Yaropolov A.I.** 2007. *"Blue" laccases.* Biochemistry. **72**: 1136-1150.
24. **Battistuzzi G., Bellei M., Leonardi A., Pierattelli R., De Candia A., Vila A., Sola M.** 2005. *Reduction thermodynamics of the T1 Cu site in plant and fungal laccases.* Journal of Biological Inorganic Chemistry. **10**: 867-873.
25. **Riva S.** 2006. *Laccases: blue enzymes for green chemistry.* Trends in Biotechnology. **24**: 219-226.
26. **Piontek K., Antorini M., Choinowski T.** 2002. *Crystal structure of a laccase from the fungus Trametes versicolor at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers.* Journal of Biological Chemistry. **277**: 37663-37669.
27. **d'Acunzo F., Galli C., Masci B.** 2002. *Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems.* European Journal of Biochemistry. **269**: 5330-5335.
28. **Calvo A.M., Copa-Patiño J.L., Alonso O., González A.E.** 1998. *Studies of the production and characterization of laccase activity in the basidiomycete Coriopsis gallica, an efficient decolorizer of alkaline effluents.* Archives of Microbiology. **171**: 31-36.
29. **Vandertol-Vanier H.A., Vazquez-Duhalt R., Tinoco R., Pickard M.A.** 2002. *Enhanced activity by poly(ethylene glycol) modification of Coriopsis*

- gallica laccase. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. **29**: 214-220.
30. Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2VDS>.
Última fecha de acceso: Noviembre 20, 2008.
31. **Rodríguez E., Pickard M.A., Vazquez-Duhalt R.** 1999. *Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi*. Current Microbiology. **38**: 27-32.
32. **Pickard M.A., Roman R., Tinoco R., Vazquez-Duhalt R.** 1999. *Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by Coriopsis gallica UAMH 8260 laccase*. Applied and Environmental Microbiology. **65**: 3805-3809.
33. **Banci L., Ciofi-Baffoni S., Tien M.** 1999. *Lignin and Mn peroxidase-catalyzed oxidation of phenolic lignin oligomers*. Biochemistry. **38**: 3205-3210.
34. **Shumakovich G.P., Shleev S.V., Morozova O.V., Khohlov P.S., Gazaryan I.G., Yaropolov A.I.** 2006. *Electrochemistry and kinetics of fungal laccase mediators*. Bioelectrochemistry. **69**: 16-24.
35. **Fabbrini M., Galli C., Gentili P.** 2002. *Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. **16**: 231-240.
36. **Fabbrini M., Galli C., Gentili P.** 2002. *Radical or electron-transfer mechanism of oxidation with some laccase/mediator systems*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. **18**: 169-171.
37. **Baiocco P., Barreca A.M., Fabbrini M., Galli C., Gentili P.** 2003. *Promoting laccase activity towards non-phenolic substrates: a mechanistic investigation with some laccase-mediator systems*. Organic & Biomolecular Chemistry. **1**: 191-197.
38. **Shleev S., Khan I., Gazaryan I., Morozova O., Yaropolov A.** 2003. *Novel laccase redox mediators: Spectral, electrochemical, and kinetic properties*. Applied Biochemistry and Biotechnology. **111**: 167-183.
39. **Camarero S., Ibarra D., Martinez M.J., Martinez A.T.** 2005. *Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes*. Applied and Environmental Microbiology. **71**: 1775-1784.
40. **Johannes C., Majcherczyk A.** 2000. *Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems*. Applied and Environmental Microbiology. **66**: 524-528.
41. **Cañas A.I., Alcalde M., Plou F., Martinez M.J., Martinez A.T., Camarero S.** 2007. *Transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase is strongly enhanced by phenolic compounds present in soil*. Environmental Science and Technology. **41**: 2964-2971.

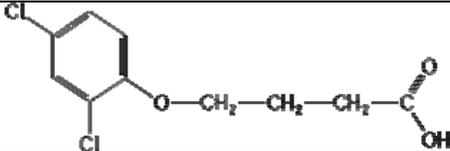
42. **Kang K.-H., Dec J., Park H., Bollag J.-M.** 2002. *Transformation of the fungicide cyprodinil by a laccase of Trametes villosa in the presence of phenolic mediators and humic acid.* Water Research. **36**: 4907-4915.
43. **Li K., Xu F., Eriksson K.-E.L.** 1999. *Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound.* Applied and Environmental Microbiology. **65**: 2654-2660.
44. **Tinoco P.V.-D.** 2001. *Kinetic differences of purified laccases from six Pleurotus ostreatus strains.* Letters in Applied Microbiology. **32**: 331-335.
45. **Carbajo J.M., Junca H., Terron M.C., Gonzalez T., Yagüe S., Zapico E., González A.E.** 2002. *Tannic acid induces transcription of laccase gene cglcc1 in the white-rot fungus Corioloropsis gallica.* Canadian Journal of Microbiology. **48**: 1041-1047.
46. **Morozova O., Shumakovich G., Shleev S., Yaropolov Y.** 2007. *Laccase-mediator systems and their applications: A review.* Applied Biochemistry and Microbiology. **43**: 523-535.
47. **Park J.W., Dec J., Kim J.E., Bollag J.M.** 1999. *Effect of humic constituents on the transformation of chlorinated phenols and anilines in the presence of oxidoreductive enzymes or birnessite.* Environmental Science and Technology. **33**: 2028-2034.
48. **Bloem A., Lonvaud-Funel A., de Revel G.** 2008. *Hydrolysis of glycosidically bound flavour compounds from oak wood by Oenococcus oeni.* Food Microbiology. **25**: 99-104.
49. **Hiroyuki W., Khadar V., Michael H. G.** 1989. *Oxidative cleavage of a phenolic diarylpropane lignin model dimer by manganese peroxidase from Phanerochaete chrysosporium.* Biochemistry. **28**: 6017-6023.
50. **Jones E., Ekundayo O., Kingston D.G.I.** 1981. *Plant anticancer agents. XI. 2,6-dimethoxybenzoquinone as a cytotoxic constituent of Tibouchina pulchra.* Journal of Natural Products. **44**: 493-494.
51. **Nishina A., Hasegawa K., Uchibori T., Seino H., Osawa T.** 1991. *2,6-Dimethoxy-p-benzoquinone as an antibacterial substance in the bark of Phyllostachys heterocycla var. pubescens, a species of thick-stemmed bamboo.* Journal of Agricultural and Food Chemistry. **39**: 266-269.
52. **Wozniak J.C., Dimmel D.R., Malcolm E.W.** 1989. *The generation of quinones from lignin and lignin-related compounds.* Journal of Wood Chemistry and Technology. **9**: 491 - 511.
53. **Tomlin C.D.S.** 1997. *The Pesticide Manual.* 11a. edición. British Crop Protection Council. Reino Unido. Pp. 1606.
54. **Xu F.** 1996. *Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition.* Biochemistry. **35**: 7608-7614.
55. **Majcherczyk A., Johannes C., Hüttermann A.** 1999. *Oxidation of aromatic alcohols by laccase from Trametes versicolor mediated by the 2,2'-azino-*

- bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication*. Applied Microbiology and Biotechnology. **51**: 267-276.
56. **Ayala M., Roman R., Vazquez-Duhalt R.** 2007. *A catalytic approach to estimate the redox potential of heme-peroxidases*. Biochemical and Biophysical Research Communications. **357**: 804-808.
57. **Bollag J.-M., Liu S.-Y.** 1985. *Copolymerization of halogenated phenols and syringic acid*. Pesticide Biochemistry and Physiology. **23**: 261-272.
58. **Bollag J.M., Shuttleworth K.L., Anderson D.H.** 1988. *Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds*. Applied and Environmental Microbiology. **54**: 3086-3091.
59. **Bollag J.-M., Liu S.-Y., Minard R.D.** 1980. *Cross-coupling of phenolic humus constituents and 2,4-dichlorophenol*. Soil Science Society of America Journal. **44**: 52-56.
60. **Bollag J.M.** 1992. *Decontaminating soil with enzymes*. Environmental Science and Technology. **26**: 1876-1881.
61. **Dec J., Bollag J.-M.** 1988. *Microbial release and degradation of catechol and chlorophenols bound to synthetic humic acid*. Soil Science Society of America Journal. **52**: 1366-1371.
62. **Dec J., Bollag J.-M.** 2000. *Phenoloxidase-mediated interactions of phenols and anilines with humic materials*. Journal of Environmental Quality. **29**: 665-676.

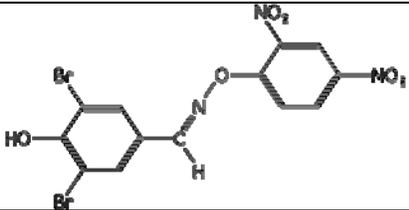
10. Apéndices

10.1. Información general de algunos plaguicidas

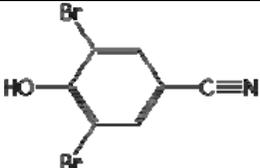
2,4-DB

Estructura	
Nombre IUPAC	4-(2,4-diclorofenoxi) ácido butírico
CAS	94-82-6
Peso molecular	249.1
Forma	Cristales incoloros
Punto de fusión (°C)	117-119
Solubilidad	Agua 46 mg/l, a 25°C. Baja en acetona, etanol, dietiléter. Ligeramente en benceno, tolueno y queroseno.
Función	Herbicida
Aplicación bioquímica	Su actividad es dependiente de la β -oxidación a 2,4-D en la planta.
Modo de acción	Selectiva, sistémica, herbicida tipo hormona, absorbida por el follaje, con translocación.

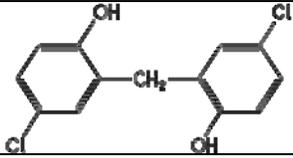
Bromofenoxim

Estructura	
Nombre IUPAC	3,5-dibromo-4-hidroxi benzaldehído 2,4-dinitrofeniloxima
CAS	13181-17-4
Peso molecular	461.0
Forma	Cristales color crema
Punto de fusión (°C)	196-197
Densidad (20°C)	2.15
Solubilidad	Agua 0.6 (pH 3.8), 9.0 (pH 10) (ambos en mg/l, a 20°C). Hexano 200, isopropanol 400, acetona 9900, n-octanol 200 (todos en mg/l, a 20°C).
Función	Herbicida
Aplicación bioquímica	Genera bromoxinil que inhibe la fotosíntesis al desacoplar la fosforilación oxidativa.
Modo de acción	Herbicida selectivo con acción por contacto. Absorbido por las hojas y tallos, con un poco de translocación.

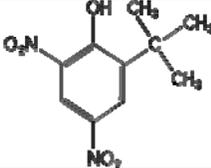
Bromoxinil

Estructura	
Nombre IUPAC	3,5-dibromo-4-hidroxibenzonitrilo
CAS	1689-99-2
Peso molecular	276.9
Forma	Sólido incoloro
Punto de fusión (°C)	194-195
Solubilidad	Agua 130 mg/l , a 20°C. Dimetilformamida 610, tetrahidrofurano 410, acetona, ciclohexanona 170, metanol 90, etanol 70, aceites minerales <20, benceno 10, todos en g/l, a 25°C.
Función	Herbicida
Aplicación bioquímica	Inhibe la fotosíntesis al desacoplar la fosforilación oxidativa.
Modo de acción	Herbicida selectivo de contacto con un poco de actividad sistémica. Absorbida por follaje, con translocación limitada.

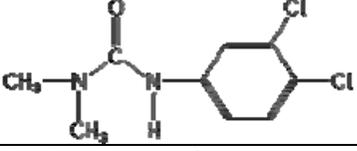
Diclorofen

Estructura	
Nombre IUPAC	4,4'-dicloro-2,2'-metilendifenol
CAS	97-23-4
Peso molecular	269.1
Forma	Cristales incoloros e inodoros
Punto de fusión (°C)	177-178
Solubilidad	Agua 30 mg/l, a 25°C. En etanol 530, isopropanol 540, acetona 800, propilenglicol 450 (en g/l, a 25°C). Soluble en metanol, isopropil éter y éter de petróleo. Frugalmente en tolueno
Función	Alguicida, funguicida, bactericida
Modo de acción	Por contacto.

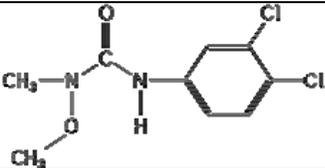
Dinoterb

Estructura	
Nombre IUPAC	2-tert-butil-4,6-dinitrofenol
CAS	1420-07-1
Peso molecular	240.2
Forma	Sólido amarillo pálido con olor similar al fenol.
Punto de fusión (°C)	125.5-126.5
Solubilidad	Agua 4.5 mg/l (pH 5, 20°C). Ciclohexanona, acetato de etilo, dimetilsulfóxido 200 (en g/kg). Alcoholes, glicoles, hidrocarburos alifáticos 100 (en g/kg).
Función	Herbicida
Aplicación bioquímica	Desacopla la fosforilación oxidativa.
Modo de acción	Herbicida selectivo no sistémico de acción por contacto.

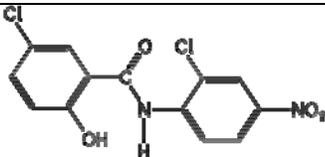
Diurón

Estructura	
Nombre IUPAC	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea
CAS	330-54-1
Peso molecular	233.1
Forma	Cristales incoloros
Punto de fusión (°C)	158-159
Solubilidad	Agua 36.4 mg/l, a 25°C. Acetona 53, butil esterato 1.4, benceno 1.2 (todos en g/kg, a 27°C). Frugalmente soluble en hidrocarburos.
Función	Herbicida
Aplicación bioquímica	Inhibe la fotosíntesis (reacción de Hill)
Modo de acción	Herbicida sistémico, absorbido principalmente por las raíces, con translocación acropetalmente en el xilema.

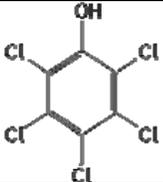
Linurón

Estructura	
Nombre IUPAC	3-(3,4-diclorofenil)-1-metoxi-1-metilurea
CAS	330-55-2
Peso molecular	249.1
Forma	Cristales incoloros
Punto de fusión (°C)	93-95
Solubilidad	Agua 63.8 mg/l (20°C, pH 7). Acetona 500, benceno, etanol 150, xileno 130 (todos en g/kg, a 25°C). Ligeramente soluble en dimetilformamida, cloroformo y dietil éter. Moderadamente soluble en hidrocarburos aromáticos. Frugalmente en hidrocarburos alifáticos.
Función	Herbicida
Aplicación bioquímica	Inhibidor del transporte de electrones fotosintético.
Modo de acción	Herbicida sistémico selectivo, absorbido principalmente por la raíz, pero también por follaje, con translocación primaria acropetalmente en el xilema.

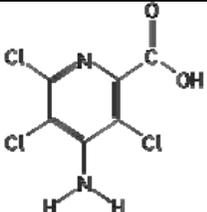
Niclosamida

Estructura	
Nombre IUPAC	2',5-dicloro-4'-nitrosalicilanilida
CAS	50-65-7
Peso molecular	327.1
Forma	Cristales casi incoloros
Punto de fusión (°C)	230
Solubilidad	Agua 1.6 (pH 6.4), 110 (pH 9.1) (ambos en mg/l, a 20°C). Soluble en solventes orgánicos comunes como etanol y dietil éter.
Función	Moluscicida
Modo de acción	Moluscicida con acción respiratoria y estomacal.

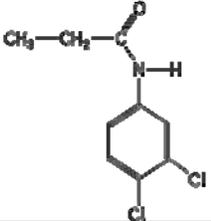
Pentaclorofenol

Estructura	
CAS	87-86-5
Nombre IUPAC	Pentaclorofenol
Peso molecular	266.3
Densidad (22°C)	1.98
Forma	Cristales incoloros, con olor fenólico
Punto de fusión (°C)	191
Solubilidad	Agua 80 mg/l, a 30°C. Soluble en la mayoría de solventes orgánicos como acetona (215 g/l, a 20°C). Ligeramente en tetraclorocarbonos y parafinas.
Función	Insecticida, funguicida, herbicida.
Modo de acción	Insecticida, funguicida, y herbicida no selectivo de contacto.

Picloram

Estructura	
Nombre IUPAC	4-amino-3,5,6-tricloropiridina-2-ácido carboxílico
CAS	1918-02-1
Peso molecular	241.5
Forma	Polvo incoloro con olor a cloro
Punto de fusión (°C)	Se descompone a 215°C sin fundirse.
Solubilidad	Agua 430 mg/l, a 25°C. Acetona 19.8, etanol 10.5, isopropanol 5.5, acetonitrilo 1.6, dietileter 1.2, diclorometano 0.6, benceno 0.2, carbondisulfido <0.05, (todos en g/l , a 25°C).
Función	Herbicida
Modo de acción	Herbicida selectivo sistémico, absorbido rápidamente por las raíces y hojas, y translocado acro- y basipetalmente, acumulándose en zonas de crecimiento.

Propanil

Estructura	
Nombre IUPAC	3',4'-dicloropropionanilida
CAS	709-98-8
Peso molecular	218.1
Forma	Cristales incoloros e inodoros
Punto de fusión (°C)	91.5
Solubilidad	Agua 130 mg/l, a 20°C. Isopropanol, diclorometano, >200, tolueno 50-100, hexano <1 (todos en g/l, a 20°C). En benceno 7×10^4 , acetona 1.7×10^6 , etanol 1.1×10^6 (todos en ppm, a 20°C).
Función	Herbicida
Aplicación bioquímica	Inhibidor del transporte de electrones fotosintético.
Modo de acción	Herbicida selectivo de contacto con actividad de corta duración.

10.2. Masas de algunas pérdidas comunes de iones moleculares en espectrometría de masas

Ion	Grupos comúnmente asociados con la masa perdida	Posible inferencia
M-1	H	—
M-2	H ₂	—
M-14	—	¿Homólogo?
M-15	CH ₃	—
M-16	O	Ar-NO ₂ , ≥ N-O, sulfóxido
M-16	NH ₂	ArSO ₂ NH ₂ , -CONH ₂
M-17	OH	—
M-17	NH ₃	—
M-18	H ₂ O	Alcohol, aldehído, cetona, etc.
M-19	F	Fluoruros
M-20	HF	
M-26	C ₂ H ₂	Hidrocarburo aromático
M-27	HCN	Nitrilos aromáticos Heterociclos con nitrógeno
M-28	CO	Quinonas
M-28	C ₂ H ₄	Etil éteres aromáticos Etil ésteres, propil cetonas
M-29	CHO	—
M-29	C ₂ H ₅	Etil cetonas, Ar-C ₃ H ₇
M-30	C ₂ H ₆	—
M-30	CH ₂ O	Metil éter aromático
M-30	NO	Ar-NO ₂
M-31	OCH ₃	Metil éster
M-32	CH ₃ OH	Metil éster
M-32	S	—
M-33	H ₂ O + CH ₃	—
M-33	HS	Tioles
M-34	H ₂ S	
M-36	HCl	—
M-79/81	Br	—