

REMOCIÓN DE FENANTRENO EN SISTEMAS DE OXIDACIÓN *IN VITRO* CON QUERCETINA Y EXTRACTOS FENÓLICOS COMO MEDIADORES METABÓLICOS

Bojorquez Flores K. M.⁽¹⁾, Rivera Casado N. A.⁽¹⁾, Gómez Guzmán O.⁽²⁾, Pérez Vargas J.⁽³⁾, Carrión-Jiménez J. M.4, Calva Calva G.*⁽²⁾

⁽¹⁾ Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN, Wilfrido Massieu s/n, Unidad Adolfo López Mateos, México City, México

⁽²⁾ CINVESTAV-IPN, Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, México City, México

⁽³⁾ Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, División de Química y Bioquímica, Av. Tecnológico s/n, Col. Valle de Anáhuac, Ecatepec Estado de México, México.

⁽⁴⁾ Universidad de Quintana Roo, Boulevard Bahía S/N, Col. Del Bosque, Chetumal, Quintana Roo, México. C.P. 77019

*Corresponding author: gcalva@cinvestav.mx

RESUMEN

Las actividades antropogénicas han ocasionado contaminación por petróleo crudo de grandes extensiones de suelo en el estado de Tabasco, prevaleciendo hidrocarburos poliaromáticos (HPA), considerados compuestos tóxicos y carcinogénicos debido a su bajo nivel de biodisponibilidad y biodegradabilidad. El mecanismo enzima-mediador-sustrato (EMS) como alternativa para la remoción de compuestos xenobióticos se ha desarrollado principalmente con sistemas enzimáticos de hongos y se ha demostrado que el uso de mediadores tanto sintéticos como naturales favorece la oxidación de HPA al remover hasta un 90% de compuestos tóxicos. La fitorremediación ha sido utilizada como alternativa para coadyuvar a la remoción de hidrocarburos recalcitrantes, pero el mecanismo de remoción de estos compuestos por las plantas aún requiere de más estudio. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue estudiar la interacción entre HPA y fenoles producidos por *Cyperus laxus* en reacciones in vitro. Los resultados evidenciaron que durante el proceso de fitorremediación en reacciones in vitro con proteínas y extractos fenólicos, el uso del sistema EMS es una estrategia bioquímica y químicamente viable para la transformación de HPA, en específico con el fenantreno (FNN). También se observó que el tipo de mediador influye en el porcentaje de transformación del xenobiótico, siendo la quercetina ideal para la reacción EMS, aunque otros flavonoides con menor capacidad antioxidante como la epicatequina también pueden participar en la transformación del hidrocarburo. Además, se encontró que los sistemas enzimáticos oxidativos pueden o no estar presente en la reacción de oxidación del FNN, indicando que la interacción del H_2O_2 y el mediador resultan suficientes para la transformación del FNN, siempre y cuando la concentración de especies reactivas de oxígeno sea adecuada para promover la oxidación.

Palabras clave: Cyperaceae, flavonoides, fitorremediación, mediadores metabólicos, metabolitos vegetales.

ABSTRACT

Anthropogenic activities have caused contamination of large areas of land by crude oil in the state of Tabasco, with the predominance of polyaromatic hydrocarbons (HPA), considered toxic and carcinogenic compounds due to their low level of bioavailability and biodegradability. The enzyme-mediator-substrate (EMS) mechanism as an alternative for the removal of xenobiotic compounds has been developed mainly for fungal enzyme systems, and it has been shown that the use of both synthetic and natural mediators favors the oxidation of HPA, removing up to 90% of toxic compounds. Phytoremediation has been used as an alternative to assist in the removal of recalcitrant hydrocarbons, however, the mechanism for the removal of these compounds by plants

still requires further study. Thus, the objective of this work was to study the interaction between HPA and phenolics produced by *Cyperus laxus* in in vitro reactions. The results showed that during the process of phytoremediation in in vitro reactions with protein and phenolic extracts, the use of the EMS system is a biochemically and chemically viable strategy for the transformation of HPA, specifically with the phenanthrene (FNN). It was also observed that the type of mediator influences the percentage of transformation of the xenobiotic, being quercetin ideal for the EMS reaction, although other flavonoids with lower antioxidant capacity such as epicatechin can also participate in the transformation of hydrocarbon. Additionally, it was found that the oxidative enzyme may or may not be present in the oxidation reaction of FNN, indicating that the interaction of H_2O_2 and the chemical mediator are enough for the transformation of FNN, whether the concentration of reactive oxygen species is suitable to promote the oxidation.

Key words: Cyperaceae, flavonoids, phytoremediation, metabolic mediators, plant metabolites.

I. INTRODUCCIÓN

Las actividades antropogénicas y diversos fenómenos naturales han ocasionado la presencia de hidrocarburos poliaromáticos (HPA) tanto en mantos acuíferos, como en suelo y aire (Rodríguez-Eugenio et al., 2019). La contribución de las fuentes naturales, como los incendios forestales y las erupciones volcánicas, es mínima comparada con las emisiones causadas por la actividad antrópica. Los combustibles fósiles es la principal fuente de emisión de HPA, aunque también contribuye la combustión de residuos orgánicos y madera, el humo del tabaco y al realizar la cocción con carbón vegetal de alimentos a la parrilla, ahumados y fritos (Reyes et al., 2021), sin embargo, una fuente importante de este tipo de xenobióticos procede del derrame de petróleo crudo o refinado cuyo contenido de HPA alcanza el 15% de su composición por lo que específicamente en el estado de Tabasco, México, la cantidad de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) en suelo es superior a 300 g de HTP/kg de suelo (Palma Cruz, 2004). Estudios previos empleando procesos de fitorremediación para el tratamiento de estos suelos (Rivera-Casado et al., 2015a,b), revelaron que el mecanismo de remoción de HPA involucra la participación de metabolitos, derivados del metabolismo secundario de las plantas fitorremediadoras, formando complejos enzima-mediador-sustrato (EMS). Donde el mediador M, referido en este trabajo como mediador metabólico (M), son esas pequeñas moléculas derivadas del metabolismo secundario vegetal, que interactúan molecularmente con el contaminante o sustrato (S) en vez de hacerlo directamente con la enzima (E). Así, el M es una molécula transportadora de electrones, que después de ser oxidada por una enzima (E), como lacasas y peroxidasas, o por especies químicas reactivas, como alquilo, alcoxi y radicales peroxi, u óxidos

de carbonilo (Barber y Kroll, 2021), es liberada para reaccionar con el sustrato S químicamente susceptible, el cual debido a su estructura química, tamaño molecular o ubicación en el ambiente, no puede ser atacado por las enzimas oxidativas (Majcherczyk et al., 1998; Johannes y Majcherczyk, 2000; Baiocco et al., 2003; Camarero et al., 2008; Longoria et al., 2008; Torres-Duarte 2009). Dentro de los metabolitos detectados en los sistemas de fitorremediación referidos arriba, prevalece la quercetina (QTN), flavonoide con pKa de 6.38 y solubilidad en agua de 60 mg/L (National Center for Biotechnology Information, 2022), ampliamente distribuido en la naturaleza y que por su alto valor antioxidante (ORAC $\mu\text{mol Trolox/mg} = 21.45 \pm 1.17$) y baja energía de ionización (0.10V), según lo reportado por Zhang et al. (2013) y Miled et al. (2017), y por Li et al. (2020), respectivamente, actuando como M en la dinámica de eliminación de PAH. Este mecanismo EMS se ha estudiado como alternativa para la remoción de compuestos xenobióticos en sistemas enzimáticos de hongos, donde se ha demostrado que el uso de M tanto sintéticos como naturales favorece la oxidación de hidrocarburos poliaromáticos removiendo hasta un 90% del compuesto (Torres Duarte, 2009). Aunque la fitorremediación ha sido utilizada como alternativa para coadyuvar a la remoción de hidrocarburos recalcitrantes, el mecanismo de remoción de estos compuestos por las plantas aún requiere de más estudio. *Cyperus laxus* tiene gran potencial para la fitorremediación mediada por la excreción de fenoles, tanto de suelos impactados por petróleo crudo como en sistemas de cultivo in vitro en presencia de fenantreno (FNN) y antraceno (Rivera-Casado et al., 2010, 2015a, 2015b). Por lo que el objetivo de este trabajo fue estudiar las reacciones in vitro sobre la interacción de HPA y fenoles producidos por *Cyperus laxus* en sistemas EMS para la transformación de fenantreno, que se caracteriza por la presencia de regiones bahía y K en su estructura lo que incrementa su estabilidad y por lo tanto dificulta su oxidación. Para ello, se utilizaron como sistema enzimático y mediador, al extracto proteico total y extracto fenólico total de los órganos principales de *Cyperus* respectivamente, estos resultados se refuerzan con el análisis de peroxidasa de rábano y quercetina como sistema enzimático y flavonoide modelo respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se usaron plantas de *Cyperus laxus* germinadas y crecidas in vitro en medio mineral de Murashige y Skoog (1962), adicionado con fenantreno 50 μM (FNN) según como se reporta en Rivera-Casado et al., (2010). Previamente a la extracción de metabolitos, las plantas de 22 semanas de edad fueron recolectadas y lavadas con agua destilada para eliminar el agar adherido a la superficie del tejido.

Extracción de compuestos fenólicos. Se realizó de

acuerdo con el procedimiento reportado por Rivera-Casado et al., (2015b). A partir del material vegetal libre de agar, se molió en presencia de nitrógeno líquido en un mortero sobre hielo seco. Del polvo del material vegetal, se realizaron tres extracciones con la mezcla de solventes orgánicos metanol:cloroformo (1:1) en un tubo de ensaye. Se separó la fase acuosa y la fase orgánica después de adicionar agua desionizada. Una vez lograda la separación de fases, se colectó la fase metanólica y se resuspendió en 200 μL de etanol para el posterior análisis de compuestos fenólicos.

Análisis de fenoles. Se realizó de acuerdo con el procedimiento reportado por Rivera-Casado et al., (2015b). Se tomaron 20 μL del extracto fenólico anterior y se inyectó en un equipo HPLC equipado con una columna KINETEX (ODS2 fase reversa, de 25 cm x 4.6 mm, con tamaño de partícula de 2.6 μm) y detector de barrido UV-visible (Thermo Separation Products). La elución se desarrolló utilizando como solvente A ácido trifluoroacético (TFA) 1mM y como solvente B Acetonitrilo (ACN) con el siguiente gradiente de A: de 0-5 min 90%, de 5 a 10 min 80%, de 10 a 25 min 80%, de 25-35 min 80%, de 35 a 55 min 40%, de 55 a 60 min 40%, de 60 a 65 min 10%, de 65 a 70 min 10%, de 70 a 80 min A 90%.

Extracción y cuantificación de proteína a partir del tejido vegetal. Se separaron y pesaron los tres órganos fundamentales de *C. laxus* (Raíz, cormo o bulbo, y hojas) según lo descrito por Rivera-Casado et al., (2015b). En condiciones de refrigeración, se realizó la molienda de la biomasa con nitrógeno líquido y se colocó en tubos de centrifuga con buffer de extracción [25 mM de Tris-HCl pH 7.0, 2mM EDTA, 1mM DTT, 1.5% PVPP, 1.3mM PMSF y 0.25% Tritón x100], en una relación de 3 mL de buffer por cada gramo de biomasa. La biomasa con el buffer de extracción se mantuvo en agitación 24 h bajo condiciones de refrigeración y el sobrenadante fue separado de la biomasa por centrifugación durante 3 min a 13,000 rpm y 4° C. La cuantificación de de proteína se realizó por el método de Bradford usando el reactivo de Sigma-Aldrich (B6916) según especificaciones del proveedor.

Transformación de fenantreno por peroxidasa de rábano. Para estudiar la oxidación in vitro de FNN por peroxidasa de rábano se utilizó el protocolo descrito por Zamudio-Moreno et al., (2014), aplicando un diseño estándar de cuadrados latinos de 5x5x5 (Tabla 1), donde los factores evaluados fueron la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , 0-1000 μM), la concentración de quercetina (QTN, 0-3000 μM), y las unidades de peroxidasa de rábano (A-D, 0-0.1 U/ μL , A = 0, B = 0.1, C = 0.01, D = 0.001, E = 0.001). Sin embargo, los tratamientos con concentraciones más altas de QTN (Rx20 – Rx25) no se ejecutaron debido a los límites de solubilidad de la QTN (60 mg/L en agua, según la base de datos National Center for

Tabla 1. Tratamientos para la transformación de fenantreno 50 μM por peroxidasa de rábano en presencia de quercetina y peróxido de hidrógeno a cinco niveles

H_2O_2 [μM]	FNN Transformado [μM]				
	QTN [μM]				
	0	3	30	300	3000
0	A Rx0	B Rx1	C Rx2	D Rx3 E	Rx20
1	B Rx4	C Rx5	D Rx6	E Rx7 A	Rx21
10	C Rx8	D Rx9	E Rx10	A Rx11 B	Rx22
100	D Rx12	E Rx13	A Rx14	B Rx15 C	Rx23
1000	E Rx16	A Rx17	B Rx18	C Rx19 D	Rx24

Se usó un diseño de cuadrados latinos a cinco niveles de peroxidasa en U/ μL (A = 0, B = 0.1, C = 0.01, D = 0.001, E = 0.001), quercetina (QTN) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Los tratamientos Rx20 – Rx25 no se ejecutaron debido a los límites de solubilidad de la QTN ($302.2 \times 3000 = 0.90 \text{ g/L}$).

Biotechnology Information 2022, contra 900 mg/L requeridos para QTN 3 mM). Las reacciones de transformación se evaluaron en 500 μL de mezclas de reacción conformada por solución Buffer de fosfatos (pH 6.9), acetonitrilo (1%), dodecilsulfato de sodio (SDS, 1%), fenantreno (FNN, 50 μM) y las cantidades de peróxido de hidrógeno, quercetina y de peroxidasa según el tratamiento correspondiente. El pH de 6.9 y la presencia de acetonitrilo y SDS coadyuvaron a la solubilización de QTN y FNN. Las reacciones se iniciaron por adición de la peroxidasa y se detuvieron por adición de 500 μL de cloroformo para la extracción (3x) del FNN residual y de los productos de transformación. Los extractos orgánicos se concentraron a sequedad y se resuspendieron en 1 mL de dimetilformamida: acetona (1:1) para su análisis por HPLC.

Oxidación in vitro de fenantreno con extractos proteicos y extractos fenólicos. Con base en los resultados de la sección anterior y el protocolo descrito por Zamudio-Moreno et al., (2014), se estudió la transformación de FNN por los extractos proteicos y fenólicos utilizando las condiciones de reacción del tratamiento Rx10 (QTN 30 μM , H_2O_2 10 μM , Peroxidasa 0.1 mU/ μL). Para ello, los extractos fenólicos se ajustaron a una concentración de flavonoides de 30 μM , identificados y cuantificados previamente. Para los extracto proteicos, la actividad de peroxidasa, también cuantificada previamente, se ajustaron a una actividad de 0.1 mU/ μL . Las reacciones de transformación de 30 μM de FNN con los extractos se evaluó en 500 μL de mezclas de reacción conformada por solución buffer de fosfatos (pH 6.9), acetonitrilo (1%), dodecilsulfato de sodio (SDS (1%), H_2O_2 (10 μM) y FNN (30 μM), adicionando la cantidad del extracto correspondiente según el tratamiento. El tiempo de reacción fue de 30 min, en una incubadora a 37 $^\circ\text{C}$ y 180 rpm. Para detener la reacción, se realizaron tres extracciones con cloroformo 1:1 para, se recolecta la fase orgánica y se llevó a sequedad bajo una corriente de nitrógeno. Los extractos se resuspendieron en 1 mL de dimetilformamida: acetona (1:1) para su análisis por HPLC.

Identificación de FNN y metabolitos transformados en HPLC. Las muestras resuspendidas en dimetilformamida: acetona (1:1) se inyectaron (20 μL) en el equipo de HPLC para su análisis como se describió arriba para fenoles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cyperus laxus es una planta capaz de desarrollarse en suelos contaminados con cargas de hidrocarburos de hasta 325,000 ppm de hidrocarburos totales del petróleo y como consecuencia de ello, sintetiza metabolitos secundarios llamados mediadores metabólicos como estrategia para la remoción de HPA (Rivera, et al., 2015). En la Tabla 2 se muestra que el uso de QTN como mediador metabólico promueve la transformación de FNN. El término mediador se ha definido desde hace aproximadamente 20 años como moléculas capaces de acarrear electrones, favoreciendo los procesos de oxidación y transformación de diversos xenobióticos. Sin embargo, resulta interesante destacar el término mediador metabólico para aquellas moléculas con poder antioxidante que participan activamente en el metabolismo de un ser vivo. Estudios del grupo de trabajo, mostraron que como parte del metabolismo secundario de la planta *Cyperus laxus* crecida en medio MS + FNN bajo condiciones in vitro, sintetiza flavonoides conjugados como la quercetrina (QTRN), cuya aglicona es la QTN (Rivera Casado et al., 2015a). Por eso, es este trabajo se eligió la QTN como el mediador metabólico clave durante la transformación de FNN por el sistema oxidativo EMS. De ello, es entendible que en el presente estudio se observe que en las reacciones con reactivos estándar de sistemas enzimáticos de peroxidasa (POX) en presencia de QTN se alcancen porcentajes de transformación hasta del 82% en 30 min.

Tabla 2. Fenantreno transformado en las mezcla de reacción de 20 de los tratamientos planteados en el cuadrado latino de la Tabla 1.

H_2O_2 [μM]	FNN transformado [μM]			
	QTN [μM]			
	0	3	30	300
0	Rx0 0 ± 0.0	Rx1 30 ± 1.1	Rx2 26 ± 1.2	Rx3 25 ± 0.4
1	Rx4 18 ± 14.7	Rx5 26 ± 14.4	Rx6 40 ± 0.7	Rx7 37 ± 1.8
10	Rx8 23 ± 7.2	Rx9 25 ± 2.0	Rx10 41 ± 0.0	Rx11 40 ± 0.6
100	Rx12 41 ± 0.0	Rx13 30 ± 9.4	Rx14 20 ± 1.2	Rx15 19 ± 0.5
1000	Rx16 23 ± 2.1	Rx17 24 ± 1.1	Rx18 17 ± 16.6	Rx19 14 ± 12.6

Las reacciones de transformación se efectuaron en buffer de fosfatos (pH 6.9) con acetonitrilo (1%), SDS (1%) y 50 μM FNN. Se iniciaron por adición de la peroxidasa y se detuvieron por adición de cloroformo.

Se observaron variaciones en las concentraciones de FNN transformado (FNNtrans), que dependen de la concentración de proteína, mediador metabólico y H_2O_2 presente en el medio de reacción. Así, por ejemplo, se destaca Rx1 con 30 μM de FNN transformado, mientras que para Rx6 un 40 μM , Rx7 de 37 μM , Rx10 con 41 μM , Rx11 de 40 μM , Rx12 con 41 μM y Rx13 con 30 μM de FNN transformado teniendo en cada reacción una concentración inicial [FNN] de 50 μM . Notablemente, en los tratamientos de las reacciones Rx1 a Rx3 mostraron transformación significativa de FNN, a pesar de que solo contienen QTN y POX, sin H_2O_2 . Durante el desarrollo experimental, sin

tener peróxido de hidrógeno, se obtuvo la evidencia de un proceso oxidativo, este comportamiento fue observado en el triplicado de los ensayos. La importancia del H_2O_2 en el mecanismo de acción de POX radica en su participación durante la formación de un compuesto de transición en el sitio activo de la enzima, lo que a su vez está relacionado con la interacción de dicha molécula con residuos de aminoácidos del tipo Histidina y Arginina, también ubicados en el sitio activo. De ello, resulta importante establecer que hasta el momento no se encontró algún estudio donde se verifique actividad de POX bajo la acción de alguna molécula sustituta del H_2O_2 , por lo que se puede sugerir que la oxidación del FNN en este sistema se pudo deber a la presencia de moléculas de QTN-radical activadas por factores ambientales como la radiación.

Por otro lado, en la Rx6 se puede observar que aun teniendo concentraciones bajas de POX, H_2O_2 y concentraciones altas de QTN en comparación con Rx1, sí hay transformación de FNN. Esto se puede deber a que el H_2O_2 interactúa con la POX para formar QTN-radical y promoviendo una reacción en cadena y así poder oxidar al FNN. Mientras que en la Rx10, a pesar de tener la concentración más baja de POX del cuadrado latino, se distingue una mayor concentración de FNNtrans; esto se puede deber que la QTN siendo un antioxidante actúa como un secuestrador de especies reactivas de oxígeno, induciendo un estrés oxidativo y aumentando la producción de OH probablemente por autooxidación (Ochoa M, 2004), mientras que en la Rx1 al tener únicamente QTN y POX, la QTN se oxida en el sitio activo de la enzima generando el QTN-radical para oxidar al FNN. Los radicales libres son muy inestables, por lo que reaccionan con facilidad para encontrar el electrón necesario para lograr su estabilidad química. Si se cede un electrón a otra molécula (FNN), ésta quedará inestable y se convertirá en FNN-rad, de esta forma se realiza una reacción en cadena de QTN y FNN con radicales libres, en el cual llegará a una fase de equilibrio donde ya no habrá más transformación.

En la Rx12, al no tener QTN, pero si peroxidasa y H_2O_2 también se observó la transformación de FNN, lo que confirma la capacidad de este sistema enzimático para la

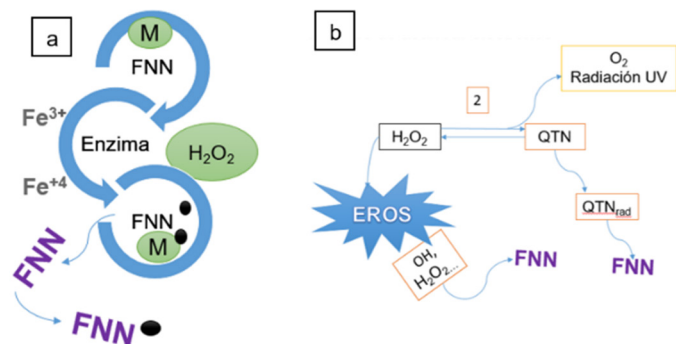


Figura 1. Propuestas del complejo EMS usado en este trabajo para Interacción con la enzima (a), y sin la enzima (b).

oxidación del hidrocarburo poliaromático. Por último, en Rx13 a diferencia de la Rx1, se observaron cambios en la concentración de POX y H_2O_2 , por lo que la formación especies reactivas de oxígeno derivadas del H_2O_2 también está promoviendo la formación de QTN-radicales. En la Figura 1 se describen las propuestas mencionadas arriba, donde el FNN puede ser oxidado directamente por la capacidad antioxidante del mediador metabólico, el cual puede ser activado como mediador radical (M-rad) por el sistema enzimático POX o por las especies reactivas de oxígeno presentes. O bien, la enzima puede ser activada por la presencia de radicales libres en el medio y ésta a su vez poder oxidar al mediador que finalmente será quien oxide al FNN.

Considerando la importancia del mediador metabólico utilizado, los resultados obtenidos en el análisis de compuestos fenólicos de los tejidos de *C. laxus* no fueron los esperados, ya que en los extractos de bulbo y raíz de las plantas crecidas en medio MS y bulbo crecido en MS + 10mM FNN demostraron tener como flavonoide mayoritario a la epicatequina (EPC) y no a la QTN como se esperaba, la cual únicamente se observó en el extracto de raíz crecido en medio MS + 10 mM FNN. En todos los extractos estas moléculas de EPC y QTN presentaron un porcentaje de correlación espectral del 97% con tiempo de elución entre el min 3 y 5, lo que sugiere que la estructura química del flavonoide se conserva, pero posee algunas modificaciones estructurales que promueve el aumento de la polaridad, por ejemplo, una glicosilación. Aunque no se realizó el análisis del tipo de molécula de azúcar asociada a la QTN, la evidencia con base al tiempo de retención indica que la molécula identificada no fue QTRN, ya que el tiempo de retención de esta molécula fue de 16 min, contra 6 min para QTRN. Y dado que la QTRN, la asociación de ramnosa con la QTN, se sugiere que las moléculas de azúcar asociadas pueden ser del tipo QTN-hexos, QTN-desoxihexosa o QTN hexosa-pentosa, tal como se ha reportado en otros estudios relativos a la velocidad de reacción de flavonoides (Astola et al., 2011). Debe considerarse que la conjugación de flavonoides con moléculas de azúcar se ocurre muy frecuentemente en el metabolismo de plantas, ya que favorece la solubilidad y el transporte de estas moléculas antioxidantes a través de la célula (Procházková et al., 2011). En este trabajo, la presencia de conjugaciones con monómeros, dímeros o trímeros de azúcar tanto para la EPC como la QTN pudo haber afectado la capacidad antioxidante del flavonoide, lo cual se puede apreciar en los resultados de transformación de FNN por los extractos proteicos y fenólicos de bulbo y raíz de las plantas de *Cyperus laxus* (Tabla 3). Para todos los extractos utilizados, la mayor transformación del FNN se presentó en los sistemas de reacción EMS, evidenciando la capacidad de este sistema para la transformación de HPA. Al igual que en el sistema libre de enzima (MS) también se observó transformación del FNN, lo que indica que la

Tabla 3. Fenantreno transformado* en reacciones con extractos proteicos y fenólicos, realizado bajo las condiciones de la Rx10 del cuadrado latino siendo la reacción con mayor cantidad de fenantreno transformado

Bulbo ⁽⁻⁾	FNN transformado [μM]	Raíz ⁽⁻⁾	FNN transformado [μM]
EMS⁽¹⁾	9.0±1.2	EMS	5.0±7.1
MS⁽²⁾	6.3±0.1	MS	1.9±0.9
SH O⁽³⁾	4.4±1.1	SH O	1.4±1.7
SH O⁽⁴⁾	0±0.0	SH O⁻	0±0.0
Bulbo ⁽⁺⁾	FNN transformado [μM]	Raíz ⁽⁺⁾	FNN transformado [μM]
EMS	4.2±7.3	EMS	7.0±0.7
MS	1.8±3.1	MS	6.0±2.8
SH O	3.4±3.0	SH O	3.5±3.1
SH O⁻	0±0.0	SH O⁻	0±0.0

- (1) Enzima-Mediador-Sustrato-Peróxido de Hidrógeno
 (2) Mediador-Sustrato-Peróxido de Hidrógeno
 (3) Sustrato-sin Mediador- sin Enzima- Peróxido de Hidrógeno
 (4) Sustrato-sin Mediador-sin Enzima-sin Peróxido de Hidrógeno

oxidación puede o no requerir de la catálisis enzimática de POX. Sin embargo, para ambos casos el porcentaje de transformación del hidrocarburo fue en promedio, 80% menor que con los reactivos estándar bajo las mismas condiciones de reacción.

Se conoce que la EPC es un flavonoide que posee diferencias químicas estructurales en el C3 y C4 del anillo con respecto a la QTN. Estas diferencias influyen en la capacidad antioxidante de las moléculas, es decir, la capacidad para atrapar y estabilizar los radicales libres. Se ha reportado que las estructuras con grupos hidroxilos en las posiciones 3' y 4' del anillo B y OH en C-3 e insaturación del anillo C, permiten estructuras mesoméricas estables con capacidad eficiente de captura de radicales libres, requisito para una máxima capacidad antioxidante (Barrón et al., 2011). En este caso, la QTN cumple en mayor medida con esas características estructurales. De esta forma, la glicosilación en la posición C3 del anillo C de la QTN disminuye su capacidad antioxidante, lo que pudiera estar repercutiendo en la capacidad para oxidar el FNN.

Por otro lado, el análisis espectral de las moléculas presentes en los sistemas de reacción a los 30 min sugiere la

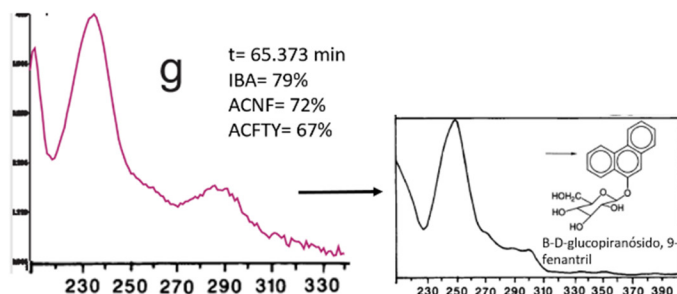


Figura 2. Parentesco espectral de absorción de la molécula β-D-glucopiranosido-9-fenantril vista por el autor Sutherland en la molécula g del tejido bulbo crecido in medio MS

formación de metabolitos de oxidación del FNN (Figura 2). Por ejemplo, a partir de los extractos de bulbo de plantas de *C. laxus* crecidas en medio MS sin FNN, confrontados con FNN en el sistema EMS, se detectó la presencia de una molécula denominada g (Figura 2), con espectro UV similar al de la molécula 9-fenantril β-D-glucopiranosido detectada durante los estudios de remoción de fenantreno por el hongo *Phanerochaete chrysosporium* mencionada por Sutherland (1991). En ese trabajo, el autor sugiere que el mecanismo de transformación de FNN involucra la ruptura del enlace C6-C9 del FNN, lo que corresponde a la región K de la molécula, favoreciendo el incremento de la polaridad por adición de grupos -OH a ese sitio o bien por la presencia de grupos de azúcar asociados a la molécula del mediador. De igual forma, en el sistema EMS usado en este trabajo, la enzima también podría estar llevando a cabo un proceso de oxidación similar en ese sitio (Figura 3). La importancia del

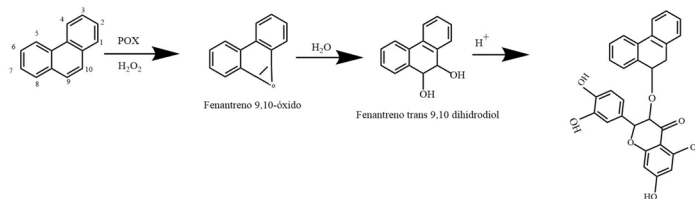


Figura 3 Propuesta de ruta metabólica del sistema de reacción EMS in vitro de *C. laxus* con la molécula Fenantreno.

análisis de las moléculas de transformación del FNN, permite sugerir el comportamiento de dicho compuesto durante los procesos de fitorremediación, ya que al aumentar su polaridad se puede transportar con más facilidad por la membrana celular e incorporarse al metabolismo vegetal. La propuesta a de la Figura 1, de manera similar a lo reportado para la degradación de FNN a fenoles vía epóxidos por el citocromo P450 (Seidel et al., 2008), parte del momento en el que el FNN entra al sitio activo de la peroxidasa (Figura 3), ésta realiza el intercambio de electrones en donde utiliza como sustrato al H₂O₂, así se lleva a cabo un rompimiento entre el doble enlace de los carbonos C1-C2, C3-C4 y/o C9-C10 del FNN, produciendo cualquiera de los tres peróxidos: FNN-1,2-óxido, FNN-3,4-óxido o FNN-9,10-óxido. Estas moléculas son altamente inestables, que al momento que la enzima utiliza el H₂O₂ produce agua y libera la molécula FNN-peróxido, haciéndola más estable, pero capaz de reaccionar con el mediador que actúan como donadores de electrones y se une con la molécula de fenantreno para formar el conjugado correspondiente, que en condiciones naturales puedes ser con la QTN o la EPC.

Debido a que en los extractos se observó mayor cantidad de EPC en comparación a la QTN (Figura 4), se sugiere que las características del medio donde se desarrolló *C. laxus* fueron modificándose con el tiempo, lo que provocó un menor nivel de estrés para la planta. Es decir, en las plantas crecidas in vitro con FNN pudieron haberlo transformado

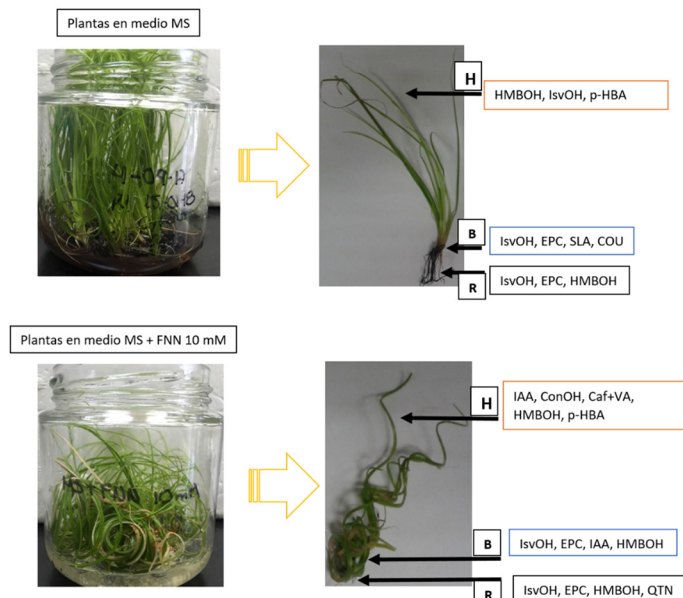


Figura 4. Compuestos fenólicos identificados mediante análisis espectral HPLC UV en los extractos metanólicos de los órganos principales (Hoja H, bulbo B, raíz R) de plantas de *Cyperus laxus* germinadas y crecidas in vitro en ausencia (MS) y presencia de fenantreno (MS + 10 mM FNN). HMBOH, alcohol vainillínico; IsvOH, alcohol iso-vainillínico, p-HBA, ácido p-hidroxibenzóico; EPC, epicatequina; SLA, ácido salicílico; COU, ácido cumárico; IAA, ácido indolacético; QTN, quercetina.

durante las primeras 22 semanas de tratamiento, disminuyendo la cantidad de FNN en el medio ambiente circundante a las raíces, lo que pudiera estar relacionado con la disminución de moléculas de flavonoides con alto poder antioxidante en las hojas, pero manteniendo su presencia en la raíz. Considerando que éste último es el órgano vegetal que continuamente absorbe nutrientes del medio, el tipo y distribución de flavonoides en el tejido vegetal pudieran ser un indicador de la disminución de la carga de hidrocarburo en el medio y en consecuencia también ser un indicador de la evolución del proceso de recuperación del sitio.

Con las condiciones de reacción Rx10 se llevó a cabo el ensayo con los extractos proteicos y fenólicos de las plantas crecidas sin fenantreno y con fenantreno, en específico bulbo y raíz. Los resultados mostrados en la Figura 4 muestran que los fenoles de los extractos de los órganos son moléculas similares a los flavonoides, los que presentaron un porcentaje de correlación espectral principalmente con EPC y QTN, del 97%, pero con tiempos de retención diferentes a los estándares (por 3 a 5 min). De esos resultados, en concordancia con lo reportado por Rivera-Casado et al. (2015), se deduce que la aglicona del flavonoide se conserva, pero puede presentar modificaciones estructurales, por ejemplo, por glicosilación, lo que modifica la polaridad y tiempo de retención. Al presentar los extractos mayor cantidad de EPC, siendo éste un flavonoide con menor poder antioxidante en comparación con la QTN, se intuye que las características del suelo donde se desarrolló *C. laxus* se modifican gradualmente para reducir el nivel de estrés para la planta, que se manifiesta de forma indirecta en la reducción de la cantidad de hidrocarburo, que a su vez resulta en una recuperación paulatina del suelo.

En consecuencia, las plantas crecidas in vitro con FNN asimilan este compuesto por la raíz donde se detectaron ambos flavonoides, QTN y EPC, lo que concuerda con los resultados reportados previamente por Rivera-Casado et al., (2015a).

CONCLUSIÓN

El sistema de reacción in vitro enzima-mediador-sustrato cuyos elementos provienen de extractos de los órganos de *C. laxus*, resultó ser una estrategia bioquímica y químicamente viable para la transformación de hasta 22% de 50 μ M fenantreno en un tiempo de reacción de 30 min. El sistema demostró que la estructura química del mediador metabólico influye en el porcentaje de transformación del xenobiótico, siendo la Quercetina el flavonoide con el que se obtuvieron los mayores porcentajes de transformación. También se demostró que la enzima puede o no estar presente en la reacción para llevar a cabo la oxidación del FNN, indicando que la interacción del H_2O_2 y el mediador resultan suficientes para la transformación del FNN, siempre y cuando la concentración de especies reactivas de oxígeno sean las suficientes para promover la oxidación.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al laboratorio de Ingeniería Metabólica del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

REFERENCIAS

- Astola L, G. M. (2011). Metabolic pathway inference from time series data: a non iterative approach 6th IAPR international conference, pattern recognition in bioinformatics. Lecture notes in bioinformatics, 7036, 97-108. Retrieved Mayo 20, 2019, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5036115/>
- 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(1), 191-197.
- Barber, V. P., & Kroll, J. H. (2021). Chemistry of Functionalized Reactive Organic Intermediates in the Earth's Atmosphere: Impact, Challenges, and Progress. *The Journal of Physical Chemistry A*, 125(48), 10264-10279.
- Barrón Yáñez Rosario M, M. d.-M. (2011). Flavonoides y Actividad antioxidante de *Calia secundiflora* (Ort) Yakovlev. *Fitotec Mex*, 34(3), 151-157.

- Camarero, S., Cañas, A. I., Nousiainen, P., Record, E., Lomascolo, A., Martínez, M. J., & Martínez, Á. T. (2008). p-Hydroxycinnamic acids as natural mediators for laccase oxidation of recalcitrant compounds. *Environmental science & technology*, 42(17), 6703-6709.
- Johannes, C. and Majcherczyk, A. (2000). Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied Environmental Microbiology* 66(2): 524-528.
- Li, Z., Moalin, M., Zhang, M., Vervoort, L., Hursel, E., Mommers, A., & Haenen, G. R. (2020). The flow of the redox energy in quercetin during its antioxidant activity in water. *International journal of molecular sciences*, 21(17), 6015.
- Longoria, A., Tinoco, R. & Vázquez-Duhalt, R. (2008). Chloroperoxidase-mediated transformation of highly halogenated monoaromatic compounds. *Chemosphere* 72(3): 485-490.
- Li, Z., Moalin, M., Zhang, M., Vervoort, L., Hursel, E., Mommers, A., & Haenen, G. R. (2020). The flow of the redox energy in quercetin during its antioxidant activity in water. *International journal of molecular sciences*, 21(17), 6015.
- Majcherczyk, A., Johannes, C., and Hüttermann, A. (1998). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(5), 335-341.
- Miled, H. B., Saada, M., Jallali, I., Barka, Z. B., Tlili, M., Alimi, H., ... & Ksouri, R. (2017). Variability of antioxidant and biological activities of *Rhus tripartita* related to phenolic compounds. *Excli Journal*, 16, 439.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 5280343, Quercetin. Retrieved December 14, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quercetin>.
- Ochoa M, C. I. (2004). Los flavonoides: Apuntes Generales y su Aplicación en la Industria de Alimentos. *Ingeniería y Competitividad*. http://historiayespacio.univalle.edu.co/index.php/ingenieria_y_competitividad/article/view/2280/3030
- Palma-Cruz, F. E.-G.-C.-C.-V. (2004). Changes in the number of plant species in sites from Tabasco, México, chronically polluted with oil. . The First International Meeting on Environmental Biotechnology and Engineering, CINVESTAV, IPN.PAPER IMEBE 152 .
- Procházková D, B. I. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82, 513-523. <http://agri.ckcest.cn/ass/3ca91b10-107d-4bd7-bc38-3c6624c9e208.pdf>
- Reyes, H., Montes, J., & Cabrera, A. (2021). Contaminación alimentaria por hidrocarburos aromáticos policíclicos: impacto en la salud pública y legislación en México. *Alimentos Ciencia e Ingeniería*, 28(1), 34-46.
- Rivera-Casado, N. A., Montes Horcasitas, M. d., Esparza García, F. J., Ariza Castolo, A., Gómez Guzmán, O., Pérez-Vargas, J., & Calva Calva, G. (2010). Fitotratamiento de suelos impactados por derrames de petróleo: interacción entre hidrocarburos poliaromáticos, fenoles y enzimas oxidativas. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 1-11.
- Rivera-Casado, N. A., Montes-Horcasitas, M.D.C., Esparza-García, F. J., Gómez-Guzmán, O., Pérez-Vargas, J., and Calva-Calva, G. (2015b). Perfil de ácidos grasos y flavonoides en plántulas de *Cyperus laxus* crecidas in vitro en presencia fenantreno. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 46 (especial): 446-454.
- Rivera-Casado, N.A., Montes Horcasitas, M.D.C., Rodríguez Vázquez, R., Esparza García, F.J., Pérez Vargas, J., Ariza Castolo, A., Ferrera-Cerrato, R., Gómez Guzmán, O. and Calva Calva, G. (2015a). The fatty acid profile analysis of *Cyperus laxus* used for phytoremediation of soils from aged oil spill-impacted sites revealed that this is a C18: 3 plant species. *PLoS One*, 10(10), p.e0140103.
- Rodríguez-Eugenio, N., McLaughlin, M., & Pennock, D. (2019). La contaminación del suelo: una realidad oculta. Roma, FAO.
- Seidel, A., Spickenheuer, A., Straif, K., Rihs, H.P., Marczyński, B., Scherenberg, M., Dettbarn, G., Angerer, J., Wilhelm, M., Brüning, T., Jacob, J., 2008. New biomarkers of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 71(11-12), pp.734-745.
- Sutherland, J. B., Selby, A. L., Freeman, J. P., Evans, F. E., & Cerniglia, C. E. (1991). Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(11), 3310-3316. <https://aem.asm.org/content/aem/57/11/3310.full.pdf>
- Torres-Duarte, C. R.-D. (2009). Halogenated pesticide transformation by a laccase-mediator system. *Chemosphere*, 77(5), 687692.
- Zamudio-Moreno, E., Echevarría-Machado, I., Medina-Lara, M. D. F., Calva-Calva, G., Miranda-Ham, M. D. L., Martínez-Estévez, M. (2014). Role of peroxidases in capsaicinoids degradation in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) plants grown under water deficit conditions. *Australian Journal of Crop Science*, 8(3), 448-454.
- Zhang, D., Liu, Y., Chu, L., Wei, Y., Wang, D., Cai, S., ... & Ji, B. (2013). Relationship between the structures of flavonoids and oxygen radical absorbance capacity values: a quantum chemical analysis. *The Journal of Physical Chemistry A*, 117(8), 1784-1794.