
ANGELINI, VANINA AND
Aplicacion de enzima

2015

73983

Aplicación de enzimas vegetales para la remediación de compuestos fenólicos

Tesis Doctoral

Directora: Dra Elizabeth Agostini

Co-Directora: Dra. María Inés Medina

Doctorando: Msc. Vanina Andrea Angelini

00583

| |
|----------|
| MF.. |
| Classif: |
| T950 |

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas Físico-químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto, para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas



Dra. Elizabeth Agostini
Directora

Dra. María Inés Medina
Codirectora

Msc.. Vanina Andrea

Angelini

Doctorando

Aprobado por el Tribunal de
Tesis:

Dra. Gloria Lucchesi
Herkovits

Dr. Julián Rodríguez Talau

Dr. Jorge

Río cuarto, 27 de Marzo de 2015

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar debo agradecer a la Universidad Nacional de Río Cuarto, lugar en el cual, gracias a la educación pública y gratuita, obtuve mis títulos de grado y de maestría, y en donde se realizó el presente trabajo.

A FONCyT y CONICET por las becas otorgadas, gracias a las cuales pude realizar este doctorado.

A mis directoras, Elizabeth y Marina, por su permanente dedicación, estímulo y aporte de conocimientos, por siempre estar para ayudarme con las inquietudes generadas en cada etapa de mi post-grado.

A mis jurados, por aceptar ser parte del tribunal.

A la dirección de Post-grado de Cs. Exactas.

Al departamento de Biología Molecular, y a cada uno de sus integrantes, que habitan diariamente ese pasillo, rodeados de heladeras y equipos, compartiendo tantas horas de trabajo.

A mis compañeros del laboratorio 8, 9 y 6A, con los cuales compartimos tantas horas de trabajo y de vida, con mates siempre a mano: Cintia, Anita, Pao, Silvia, Melina, Sabrina, Ana Laura, Ornella y todos los que por allí pasaron.

A Mariela Woelke, Miguel Bueno y Miguel Andrés, los ángeles guardianes del departamento de Biología Molecular, siempre tan dispuestos a solucionar todos los problemas que se presentaran.

A mi familia, que sin ellos no podría haber logrado ni uno de mis títulos. Especialmente a mi amor, Yvon, por el aguante y el aliento que tanto necesite para poder culminar esta etapa.

A mis amigos y amigas, por toda la fuerza que me dieron, estando en cada momento de mi vida, y haciendo cada uno, una partecita de lo que soy hoy.

Resumen

La contaminación del agua es una problemática mundial que necesita urgente solución. Entre los contaminantes peligrosos para la salud humana y ambiental se encuentran los compuestos fenólicos, como el 2,4-diclorofenol (2,4-DCF) y el fenol. Se han desarrollado numerosos sistemas para la eliminación de estos contaminantes del agua, sin embargo, algunos son poco eficientes o generan nuevos productos tóxicos. Las peroxidasas son oxidorreductasas potencialmente aplicables a la remediación de compuestos fenólicos en aguas contaminadas, ya que pueden catalizar su oxidación utilizando H_2O_2 . Sin embargo estas enzimas suelen inactivarse durante el proceso, por lo que frecuentemente es necesario protegerlas mediante el agregado de aditivos o la inmovilización. En este trabajo se analizaron las potenciales aplicaciones biotecnológicas de extractos crudos totales de peroxidasas (ECT) obtenidas a partir de raíces transformadas de tabaco (Tab) y nabo (N) para la remediación de fenol y 2,4-DCF. Se determinó la eficiencia de remoción de ambos compuestos fenólicos por parte de las enzimas libres o protegidas mediante agregado de aditivos e inmovilización, la toxicidad/genotoxicidad de las soluciones de contaminantes y soluciones post-remoción (PR) utilizando diferentes bioensayos, con organismos pertenecientes a distintos niveles tróficos (*Rhinella arenarum*, ratones Balb-C y *Lactuca sativa*), y se realizó una estimación de la naturaleza química de los productos formados durante el proceso mediante espectrofotometría y voltamperometría cíclica.

Los ECT Tab y N presentaron una elevada actividad enzimática (con un predominio de isoformas de peroxidasas básicas) y elevadas eficiencias de remoción de 2,4-DCF y fenol de soluciones acuosas, con o sin presencia de distintos aditivos. La presencia de polietilenglicol (PEG-3350), como agente protector en los medios de reacción, incrementó la eficiencia de remoción y permitió mayor recuperación de actividad peroxidasa PR. La aplicación de los ECT Tab y N, tanto libres como inmovilizados en cápsulas de alginato de calcio y en la resina de intercambio iónico carboximetil sephadex (CMS), produjeron elevadas eficiencias de remoción de soluciones de 2,4-DCF (25 mg/l) y de fenol (10 mg/l), sin embargo, los resultados no siempre se correlacionaron con disminución de la toxicidad de dichas soluciones.

Los estudios electroquímicos indicaron que los mecanismos de oxidación de ambos compuestos fenólicos por las peroxidasas son complejos, formándose productos intermediarios durante la primera hora de reacción, entre ellos quinonas, que continuarían reaccionando mediante mecanismos físico-químicos espontáneos hasta 48 h luego de la incubación. Estos productos intermediarios serían responsables de la toxicidad observada en las soluciones PR.

Abstract

Water pollution is a global problem that requires urgent solution. Phenolic compounds such as 2,4-dichlorophenol (2,4-DCF) and phenol are among the hazardous pollutants on human and environmental health. Among the hazardous pollutants on human and environmental health Various systems have been developed for removing these contaminants from water, however, some are inefficient or generate new toxic products. Peroxidases are oxidoreductases are potentially applicable to the remediation of contaminated waters with phenolic compounds, since they can catalyze its oxidation using H_2O_2 . However these enzymes are often inactivated during the process, so it is frequently necessary to protect them by adding additives or by immobilization. In this work; the potential biotechnological applications of total peroxidase crude extracts (ECT) obtained from tobacco hairy roots of snuff (Tab) and turnip (N) for the remediation of phenol and 2,4-DCF is analyzed. The removal efficiency of both phenolic compounds by free or protected enzymes by addition of additives was determined by addition of additives and immobilization, toxicity / genotoxicity solutions pollutants and post-removal solutions (PR) using different bioassays with organisms belonging different trophic levels (*Rhinella arenarum*, Balb-C mice and *Lactuca sativa*), and an estimate of the chemical nature of the products formed during the process by spectrophotometry and cyclic voltammetry was performed.

The ECT Tab and N showed a high enzyme activity (with a predominance of basic isoforms of peroxidases) and high removal efficiencies of 2,4-DCF and phenol from aqueous solutions, with or without the presence of various additives. The presence of polyethylene glycol (PEG-3350), as a protective agent in the reaction media, increased removal efficiency and allowed higher recovery of PR peroxidase activity. The application of the ECT Tab and N, both free and immobilized in calcium alginate beads and with the ion exchange resin carboxymethyl sephadex (CMS), produced high removal efficiencies of solutions of 2,4-DCF (25 mg/l) and phenol (10 mg/l), however, the results do not always correlate with decreased toxicity of these solutions.

The electrochemical studies indicated that the mechanisms of oxidation of phenolics by peroxidases of both ECT both are complex. Some intermediates are formed during the first hour of reaction, including quinones, which continue reacting by spontaneous physico-chemical mechanisms until 48 h after incubation. These intermediate compounds would be responsible for the toxicity observed in the PR solutions.

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| Índice general | iii |
| Índice de Figuras | vii |
| Índice de tablas | xi |
| Abreviaturas utilizadas | xii |
| 1. Introducción | |
| 1.1. La contaminación ambiental: una problemática mundial. | 2 |
| 1.1.1. Contaminación con compuestos fenólicos. | 4 |
| 1.2. Métodos de eliminación de compuestos fenólicos del medio ambiente. | 7 |
| 1.2.1. Tratamientos fisicoquímicos y biológicos convencionales. | 7 |
| 1.2.2. Bio y fitorremediación de compuestos fenólicos. | 8 |
| 1.2.3. Fitorremediación utilizando cultivos de raíces transformadas. | 10 |
| 1.2.4. Utilización de enzimas en remediación de compuestos fenólicos. | 15 |
| 1.2.5. Peroxidasas vegetales: su aplicación en remediación | 17 |
| 1.2.6. Aditivos para incrementar la eficiencia de peroxidasas. | 20 |
| 1.2.7. Inmovilización de enzimas. | 21 |
| 1.2.7.1. Métodos de inmovilización irreversibles | 22 |
| 1.2.7.2. Métodos de inmovilización reversibles | 24 |
| 1.2.7.3. Selección del soporte para la inmovilización | 25 |
| 1.2.7.4. Remoción de compuestos fenólicos con peroxidasas inmovilizadas | 26 |
| 1.3. Evaluación de la eficiencia de remediación mediante test de toxicidad. | 27 |
| 1.3.1. Test de toxicidad utilizando <i>Rhinella arenarum</i> . | 31 |
| 1.3.2. Test de toxicidad y genotoxicidad en ratones. | 33 |
| 1.3.3. Test de toxicidad con semillas de <i>Lactuca sativa</i> . | 34 |
| 1.4. Identificación de los productos obtenidos luego de la remoción con peroxidasas. - | 36 |
| 1.4.1. Técnicas espectrofotométricas. | 38 |
| 1.4.2. Técnicas electroquímicas. | 40 |
| 1.4.2.1. Voltamperometría cíclica | 42 |
| 2. Hipótesis y objetivos | |
| 2.1. Hipótesis | 45 |
| 2.2. Objetivo general | 45 |
| 2.2.1. Objetivos específicos | 46 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 3. | Materiales y métodos | |
| 3.1. | Material vegetal | 48 |
| 3.2. | Obtención de extractos crudos totales a partir de cultivos de raíces transformadas de diferentes especies. | 48 |
| 3.3. | Determinación cualitativa de actividad peroxidasa | 49 |
| 3.4. | Determinación cuantitativa de actividad peroxidasa | 49 |
| | 3.4.1. Utilizando o-dianisidina como sustrato | 49 |
| | 3.4.2. Utilizando guayacol como sustrato | 49 |
| 3.5. | Análisis del perfil de peroxidasas mediante electroforesis por isoelectroenfoque (IEF) | 50 |
| 3.6. | Inmovilización de peroxidasas de ECT | 51 |
| | 3.6.1. Inmovilización en resinas de intercambio iónico | 51 |
| | 3.6.2. Encapsulación en alginato de calcio. | 52 |
| 3.7. | Ensayos de remoción. | 52 |
| | 3.7.1. Remoción de 2,4-DCF con ECT. | 52 |
| | 3.7.2. Remoción de fenol con ECT. | 53 |
| | 3.7.3. Ensayos de remoción utilizando aditivos. | 53 |
| | 3.7.4. Ensayos de remoción de 2,4-DCF y fenol con enzimas inmovilizadas en resinas de intercambio catiónico. | 53 |
| | 3.7.5. Ensayos de remoción de 2,4-DCF y fenol con enzimas inmovilizadas en alginato de calcio. | 54 |
| 3.8. | Determinación de compuestos fenólicos residuales | 54 |
| 3.9. | Ensayos de toxicidad | 55 |
| | 3.9.1. Evaluación de toxicidad utilizando larvas de <i>Rhinella arenarum</i> | 55 |
| | 3.9.1.1. Estudio de toxicidad aguda | 55 |
| | 3.9.1.2. Análisis de teratogénesis | 55 |
| | 3.9.2. Evaluación de toxicidad y genotoxicidad en ratón | 56 |
| | 3.9.2.1. Análisis bioquímico de sangre de ratón | 56 |
| | 3.9.2.2. Análisis histopatológico de tejido hepático de ratón | 56 |
| | 3.9.2.3. Test de micronúcleos en medula ósea de fémur de ratón | 57 |
| | 3.9.3. Ensayo de toxicidad aguda en semillas de <i>Lactuca sativa</i> | 57 |
| 3.10. | Estimación de la naturaleza química de los productos de remoción de fenol y 2,4-DCF | 58 |
| | 3.10.1. Determinaciones espectrofotométricas | 58 |
| | 3.10.2. Determinaciones electroquímicas | 59 |
| 3.11. | Análisis estadísticos | 60 |

| | | |
|------------|--|-----|
| 4. | Resultados | |
| 4.1. | Obtención y caracterización de extractos crudos totales de peroxidasas de raíces transformadas de diferentes tabaco y nabo | 62 |
| 4.2. | Ensayos de remoción con ECT Tab y N | 63 |
| 4.2.1. | Remoción de 2,4-DCF | 63 |
| 4.2.1.1. | Efecto de polietilenglicol (PEG) en la remoción de 2,4-DCF | 64 |
| 4.2.2. | Remoción de fenol | 66 |
| 4.2.2.1. | Efecto de PEG en la remoción de fenol | 67 |
| 4.3. | Ensayos de remoción en presencia de aditivos | 69 |
| 4.3.1. | Remoción de 2,4-DCF en presencia de aditivos | 70 |
| 4.3.2. | Remoción de fenol en presencia de aditivos | 73 |
| 4.4. | Inmovilización de ECT en diferentes soportes | 75 |
| 4.4.1. | Inmovilización de los ECT en CMS | 75 |
| 4.4.2. | Inmovilización de ECT en alginato de calcio | 76 |
| 4.4.3. | Determinación de propiedades cinéticas de peroxidasas de ECT libres e inmovilizadas | 77 |
| 4.4.4. | Ensayos de remoción de fenol y 2,4-DCF con ECT libres e inmovilizados | 78 |
| 4.5. | Ensayos de toxicidad y genotoxicidad | 80 |
| 4.5.1. | Evaluación de la toxicidad de 2,4-DCF y sus productos de remoción | 81 |
| 4.5.1.1. | Evaluación de toxicidad aguda utilizando larvas de <i>Rhinella arenarum</i> | 81 |
| 4.5.1.2. | Evaluación de toxicidad y genotoxicidad en ratón | 88 |
| 4.5.1.2.1. | Análisis de parámetros bioquímicos | 89 |
| 4.5.1.2.2. | Estudio histopatológico | 91 |
| 4.5.1.2.3. | Test de micronúcleos en médula ósea de ratón | 92 |
| 4.5.1.3. | Ensayo de toxicidad aguda utilizando <i>Lactuca sativa</i> L | 93 |
| 4.5.2. | Evaluación de toxicidad de fenol y sus productos de remoción | 96 |
| 4.5.2.1. | Determinación de efectos teratogénicos sobre el desarrollo de larvas de <i>R. arenarum</i> | 96 |
| 4.6. | Estudio de la naturaleza química de los productos de remoción de fenol y 2,4-DCF | 101 |
| 4.6.1. | Estudios espectrofotométricos | 101 |
| 4.6.2. | Estudios electroquímicos | 108 |
| 5. | Discusión | |
| 5.1. | Remediación de compuestos fenólicos con ECT de raíces transformadas de tabaco y nabo | 118 |
| 5.2. | Efecto de aditivos en la remoción de compuestos fenólicos | 120 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 5.2.1. | Efectos de solventes y detergentes | 120 |
| 5.2.2. | Efecto de iones | 123 |
| 5.3. | Ensayos de remoción de 2,4-DCF y fenol con enzimas inmovilizadas | 124 |
| 5.4. | Evaluación de la toxicidad de soluciones de 2,4-DCF, fenol y post-remoción | 126 |
| 5.4.1. | Toxicidad de 2,4-DCF y fenol | 127 |
| 5.4.2. | Toxicidad del peróxido de hidrógeno | 128 |
| 5.4.3. | Toxicidad de las soluciones post-remoción de 2,4-DCF | 129 |
| 5.4.4. | Toxicidad de las soluciones post-remoción de fenol | 133 |
| 5.5. | Estimación de la naturaleza química de los productos post-remoción | 137 |
| 6. | Conclusiones | 144 |
| 7. | Bibliografía | 146 |

INDICES DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Crecimiento de raíces transformadas a partir de la inoculación de explantos vegetales con <i>Agrobacterium rhizógenes</i> . | 12 |
| Figura 2: Cultivos de raíces transformadas de diferentes especies vegetales crecidos en medio MS líquido. | 13 |
| Figura 3: Mecanismo de acción de peroxidasas | 17 |
| Figura 4: Esquema representativo del mecanismo catalítico de las peroxidasas, utilizando peróxido de hidrógeno como agente oxidante. | 18 |
| Figura 5: Esquema representativo del mecanismo de inactivación suicida de las peroxidasas, en presencia de exceso de peróxido de hidrógeno | 20 |
| Figura 6: Sistemas de inmovilización irreversible | 22 |
| Figura 7: Sistemas de inmovilización de enzimas mediante adsorción en soporte de intercambio catiónico | 24 |
| Figura 8: <i>Rhinella arenarum</i> macho adulto. | 32 |
| Figura 9: Diferentes estadios del desarrollo embrionario de <i>R. arenarum</i> . | 33 |
| Figura 10: Test de <i>L. sativa</i> | 36 |
| Figura 11: Dímeros y trímeros estables producidos mediante oxidación de fenol con HRP. | 36 |
| Figura 12: Mecanismo de reacción de oxidación de 2,4-DCF mediado por HRP | 37 |
| Figura 13: Diagrama de Jablonski (simplificado) | 39 |
| Figura 14: Circuito básico utilizado en las técnicas electroquímicas | 42 |
| Figura 15: Perfil electroforético obtenido por IEF de las isoformas de peroxidasa. | 63 |
| Figura 16: Eficiencia de remoción (%) de 2,4-DCF (25 mg/l) con 0,5 mM de H ₂ O ₂ y 200 U/ml de peroxidasas de los diferentes ECT luego de 1 y 24 h de incubación | 64 |
| Figura 17: Eficiencia de remoción (%) de 2,4-DCF (25 mg/l) con 0,5 mM de H ₂ O ₂ por 200 U/ml de peroxidasas de los ECT de tabaco y nabo, en ausencia y presencia de PEG-3350 durante 1 h de incubación | 65 |
| Figura 18: Actividad peroxidasa determinada con α -D de las diferentes soluciones post-remoción de 2,4-DCF (25 mg/l) obtenidas con 0,5 mM de H ₂ O ₂ y 200 U/ml de peroxidasas de ECT de tabaco y nabo, en presencia de PEG-3350 durante 1 h de reacción | 65 |
| Figura 19: Eficiencia de remoción (%) de 2,4-DCF (25 mg/l) con 0,5 mM de H ₂ O ₂ y 200 U/ml de peroxidasas de ECT de tabaco y nabo en presencia de PEG-3350 durante 1 y 24 h de reacción | 66 |
| Figura 20: Eficiencia de remoción (%) de fenol (10 mg/l) con 1 mM de H ₂ O ₂ y 1000 U/ml de peroxidasas de ECT de tabaco y nabo luego de 1 y 24 h de reacción | 67 |
| Figura 21: Eficiencia de remoción (%) de fenol (10 mg/l) con 1 mM de H ₂ O ₂ y 1000 U/ml de peroxidasas de ECT de tabaco y nabo con agregado de PEG-3350 en 1 h de incubación | 68 |

| | |
|--|----|
| Figura 22: Actividad peroxidasa determinada con <i>o</i> -D de las diferentes soluciones PR de fenol (10 mg/l) obtenidas con 1 mM de H ₂ O ₂ y 1000 U/ml de peroxidasa de los diferentes ECT en presencia de PEG-3350 durante 1 h de incubación | 68 |
| Figura 23: Eficiencia de remoción (%) de fenol (10 mg/l) con 1 mM de H ₂ O ₂ y 1000 U/ml de peroxidasa de ECT de tabaco y nabo en presencia de PEG-3350 luego de 1 y 24 h de incubación | 69 |
| Figura 24: Eficiencia de remoción (%) de 2,4-DCF (25 mg/l) con 0,5 mM de H ₂ O ₂ y 200 U/ml de peroxidasa de ECT de tabaco y nabo en presencia de distintos aditivos durante 1 h de incubación | 71 |
| Figura 25: Eficiencia de remoción (%) de 2,4-DCF (25 mg/l) con 0,5 mM de H ₂ O ₂ y 200 U/ml de peroxidasa utilizando ECT de tabaco y nabo en presencia de distintos aditivos durante 24 h de reacción | 72 |
| Figura 26: Eficiencia de remoción (%) de fenol (10 mg/l) con 1 mM de H ₂ O ₂ y 1000 U/ml de peroxidasa utilizando ECT de tabaco y nabo en presencia de distintos aditivos durante 1 h de incubación | 73 |
| Figura 27: Eficiencia de remoción (%) de fenol (10 mg/l) con 1 mM de H ₂ O ₂ y 1000 U/ml de peroxidasa de ECT de tabaco y nabo en presencia de distintos aditivos luego de 24 h de incubación | 74 |
| Figura 28: a) Cápsulas deshidratadas b) cápsulas conservadas en humedad. | 76 |
| Figura 29: Coloración del medio de reacción y de las cápsulas de alginato de calcio con ECT Tab antes y después de la reacción de remoción. | 80 |
| Figura 30: Larvas de <i>R. arenarum</i> obtenidas durante los ensayos de toxicidad | 82 |
| Figura 31: Mortalidad (%) de larvas de <i>R. arenarum</i> expuestas durante 96 hs a diferentes concentraciones de 2,4-DCF. | 83 |
| Figura 32: Mortalidad (%) de larvas de <i>R. arenarum</i> en estadio 25 de desarrollo durante el tratamiento con las distintas diluciones de la solución PR Tab. | 84 |
| Figura 33: Mortalidad (%) de larvas de <i>R. arenarum</i> en estadio 25 de desarrollo durante el tratamiento con las distintas diluciones de la solución PR N. | 84 |
| Figura 34: Mortalidad (%) de larvas de <i>R. arenarum</i> en estadio 25 de desarrollo durante el tratamiento con las distintas diluciones de la solución PR Tab obtenida con ECT inmovilizado en alginato de calcio. | 85 |
| Figura 35: Mortalidad (%) de larvas de <i>R. arenarum</i> en estadio 25 de desarrollo durante el tratamiento con las distintas diluciones de la solución PR N obtenida con ECT inmovilizado en alginato de calcio. | 85 |
| Figura 36: Mortalidad (%) de larvas de <i>R. arenarum</i> en estadio 25 de desarrollo durante el tratamiento con las distintas diluciones de la solución PR Tab obtenidas con ECT inmovilizado en CMS. | 86 |
| Figura 37: Mortalidad (%) de larvas de <i>R. arenarum</i> en estadio 25 de desarrollo durante el tratamiento con las distintas diluciones de la solución PR N obtenida con ECT inmovilizado en CMS. | 86 |

| | |
|--|-----|
| Figura 38: Mortalidad (%) de larvas de <i>R. arenarum</i> en estadio 25 de desarrollo frente a diluciones de las soluciones PR Tab y N obtenidas con ECT libres e inmovilizadas. | 87 |
| Figura 39: Consumo diario promedio de agua (control), 2,4-DCF (25 y 4 mg/l) y soluciones post-remoción (PR Tab, PR N) por ratones hembras y machos. | 89 |
| Figura 40: Actividad de la enzima GPT (U/l) en suero de ratones hembra y macho correspondientes a los tratamientos con agua (control), 2,4-DCF (25 y 4 mg/l) y soluciones post-remoción. | 90 |
| Figura 41: Concentración de creatinina (mg/l) en suero de ratones hembras y machos correspondientes a los tratamientos con agua (control), 2,4-DCF (25 y 4 mg/l) y soluciones post-remoción. | 90 |
| Figura 42: Concentración de urea (g/l) en suero de ratones hembras y machos correspondientes a los tratamientos con agua (control), 2,4-DCF (25 y 4 mg/l) y soluciones post-remoción. | 91 |
| Figura 43: Fotografía de un campo de un preparado histológico de tejido hepático de ratón tratado con una solución de 2,4-DCF (25 mg/l). | 92 |
| Figura 44: Fotografía de dos eritrocitos de médula ósea de ratón, uno de ellos presentando un micronúcleo. | 92 |
| Figura 45: Longitudes relativas de radículas e hipocótilos de plántulas de <i>L. sativa</i> en tratamientos con agua (control), 2,4-DCF (25 y 10 mg/l), peróxido de hidrógeno (0,5 mM) y soluciones post-remoción. | 94 |
| Figura 46: Índices de germinación de plántulas de <i>L. sativa</i> tratadas con agua (control), 2,4-DCF (25 y 10 mg/l), peróxido de hidrógeno (0,5 mM) y soluciones post-remoción. | 95 |
| Figura 47: Porcentaje de letalidad de embriones expuestos a las diferentes soluciones de fenol (1-10 mg/l), peróxido de hidrógeno (0,5 mM) y soluciones PR Tab y N obtenidas con ECT libres e inmovilizados en alginato de calcio y CMS. | 97 |
| Figura 48: Larvas en estadio 15 de desarrollo | 98 |
| Figura 49: Larvas en estadio 18 de desarrollo | 98 |
| Figura 50: Larvas en estadio 21 (96 h) de desarrollo con malformaciones | 98 |
| Figura 51: Malformaciones (%) presentadas en larvas en E 21, desarrolladas en las diferentes soluciones de fenol (1-10 mg/l), peróxido de hidrógeno (0,5 mM) y soluciones PR Tab y N obtenidas con ECT libres e inmovilizados en alginato de calcio y CMS. | 99 |
| Figura 52: Disminución del tamaño (%) de larvas en E 21, desarrolladas en las diferentes soluciones de fenol (1-10 mg/l), peróxido de hidrógeno (0,5 mM) y soluciones post-remoción obtenidas con ECT Tab y N libres e inmovilizados en alginato de calcio y CMS. | 101 |
| Figura 53: Espectros de absorción entre 240 y 350 nm | 102 |
| Figura 54: Cambios en el espectro de absorción de la mezcla de reacción con 25 mg/l de 2,4-DCF y 0,5 mM de H ₂ O ₂ entre 240 y 350 nm durante 1 h | 103 |
| Figura 55: Variación de la densidad óptica a 252 y 301 nm en función del tiempo de remoción de 2,4-DCF (25 mg/l) con 0,5 mM de H ₂ O ₂ y 200 U/ml de peroxidasas | 104 |

| | |
|--|-----|
| Figura 56: Espectro de absorción de la mezcla post-remoción de 2,4-DCF (25 mg/l, con 0,5 mM de H ₂ O ₂ y 200 U/ml de peroxidasas de ECT, entre 240 y 350 nm a 1, 24 y 48 h de incubación. | 105 |
| Figura 57: Cambios en el espectro de absorción de la mezcla de reacción de fenol (10 mg/l) con 1 mM de H ₂ O ₂ y 1000 U/ml de peroxidasas de ECT, entre 240 y 350 nm durante una hora. | 106 |
| Figura 58: Variación de la densidad óptica a 283 y 398 nm en función del tiempo de remoción de fenol (10 mg/l) con 1 mM de H ₂ O ₂ y 1000 U/ml de peroxidasas | 107 |
| Figura 59: Espectro de absorción de la mezcla post-remoción de fenol (10 mg/l) con 1 mM de H ₂ O ₂ entre 240 y 350 nm a 1, 24 y 48 h de incubación. | 108 |
| Figura 60: Voltamperogramas cíclicos entre potenciales de -0,25 y 1,25 V de las soluciones post-remoción obtenidas con ambos ECT | 109 |
| Figura 61: Voltamperogramas de ciclos sucesivos (1 a 20) entre potenciales de -0,25 y 1,25 V. | 111 |
| Figura 62: a) Voltamperogramas cíclicos entre potenciales de -0,25 y 1,25 V de soluciones post-remoción obtenidas con ambos ECT, comparadas con dos ciclos de oxidación electroquímica de cada sustrato puro | 112 |
| Figura 63: Voltamperogramas cíclicos entre potenciales de -0,25 y 1,25 V de la solución post-remoción de 2,4-DCF con 0,5 mM de H ₂ O ₂ con ECT de 1, 24 y 48 h de incubación | 113 |
| Figura 64: Voltamperogramas cíclicos entre potenciales de -0,25 y 1,25 V: de la solución post-remoción de fenol con 1 mM de H ₂ O ₂ con ECT de 1, 24 y 48 h de incubación | 114 |
| Figura 65: Voltamperogramas cíclicos entre potenciales de -0,2 y 0,5 V de la solución post-remoción de 2,4-DCF a distintos tiempos de incubación. | 115 |
| Figura 66: Voltamperogramas cíclicos entre potenciales de -0,2 y 0,7 V de la mezcla de remoción de fenol a distintos tiempos de incubación. | 116 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----|
| Tabla 1: Utilización de diferentes organismos para remediación de compuestos fenólicos | 9 |
| Tabla 2: Utilización de cultivos de raíces transformadas de diferentes especies vegetales para la remediación de compuestos fenólicos | 14 |
| Tabla 3: Utilización de lacasas y peroxidasas de diferentes orígenes para la remediación de compuestos fenólicos | 16 |
| Tabla 4: Inmovilización de peroxidasas en diferentes soportes utilizadas en remoción de compuestos fenólicos | 27 |
| Tabla 5. Formulación del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS). | 49 |
| Tabla 6: Actividad peroxidasa, con o-D como sustrato, de ECT de raíces transformadas de tabaco (Tab) y nabo (N). | 62 |
| Tabla 7. Actividad peroxidasa remanente (%) en los medios post-remoción de 2,4-DCF en presencia de distintos aditivos, luego de 1 hde incubación. | 71 |
| Tabla 8. Actividad peroxidasa remanente (%) en los medios post-remoción de fenol en presencia de distintos aditivos luego de una hora de incubación. | 74 |
| Tabla 9. Actividad peroxidasa de ECT Tab y ECT N inmovilizados en la resina de intercambio catiónico carboximetil sephadex (CMS). | 76 |
| Tabla 10. Eficiencias de remoción (%) de 2,4-DCF (25 mg/l) y fenol (10 mg/l) por peroxidasas de ECT de tabaco y nabo libres e inmovilizadas sobre CMS y alginato de calcio. | 79 |
| Tabla 11: Micronúcleos (‰) en eritrocitos de medula ósea de ratones Balb-C correspondientes a los tratamientos con agua (control), 2,4-DCF (25 y 4 mg/l) y soluciones post-remoción. | 93 |
| Tabla 12: Diferentes malformaciones observadas en las soluciones de fenol (1-10 mg/l), peróxido de hidrógeno (0,5 mM) y soluciones PR Tab y N obtenidas con ECT libres e inmovilizados en alginato de calcio y CMS. | 100 |

ABREVIATURAS UTILIZADAS

| | |
|--------------------|--|
| 2,4-D | Ácido diclorofenoxiacético |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADN-T | Segmento de ácido desoxirribonucleico transferible |
| ADN-T _d | Región derecha del segmento de ácido desoxirribonucleico transferible |
| ADN-T _l | Región izquierda del segmento de ácido desoxirribonucleico transferible |
| <i>ags</i> | Gen para la producción de agropinas |
| Alg | Alginato |
| ANOVA | Prueba de análisis de la varianza |
| ATSDR | Agency for Toxic Substances and Disease Registry (Agencia para sustancias tóxicas y registro de enfermedades) |
| <i>aux</i> | Gen para la producción de auxina |
| Bic | bicarbonato |
| CE | Contraelectrodo |
| CF | clorofenol |
| CI ₅₀ | Concentración inhibitoria 50 |
| CL ₁₀₀ | Concnetracion letal 100 |
| CL ₅₀ | Concentración letal 50 |
| CME | Concentración mínima efectiva |
| CMNE | Concentración mínima no efectiva |
| CMS | Carboxi metil sephadex |
| COT | Carbono orgánico total |
| DBO | Demanda biológica de oxigeno |
| DCF | diclorofenol |

| | |
|----------|--|
| DMF | Dimetoxifenol |
| DMF | Dimetilformamida |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DO | Densidad óptica |
| DQO | Demanda química de oxígeno |
| E | Estadio de desarrollo |
| ECT | Extracto crudo total |
| ECT N | Extracto crudo total de raíces transformadas de nabo |
| ECT Tab | Extracto crudo total de raíces transformadas de tabaco |
| ER | Electrodo de referencia |
| ET | Electrodo de trabajo |
| GPT | Glutámico-pirúvico transaminasa |
| HRP | Peroxidasa de rábano picante |
| IEF | Isoelectroenfoque |
| IG | Índice de germinación |
| LRH | Longitud relativa de hipocótilos |
| LRR | Longitud relativa de radícula |
| MF | Metoxifenol |
| mM | milimolar |
| MS | Medio de Murashigue y Skoog |
| nm | nanometro |
| o-cresol | orto-cresol |
| o-D | orto-dianisidina |
| OMS | Organización mundial de la salud |
| ops | Gen para la producción de opina |

| | |
|------------|---|
| pb | Pares de bases |
| ppb | Partes por billón |
| PCF | Pentaclorofenol |
| PEG | Polietilenglicol |
| PEG-3350 | Polietilenglicol de peso molecular 3350 |
| PEG-6000 | Polietilenglicol de peso molecular 6000 |
| pl | Punto isoeléctrico |
| PR | Post-remoción |
| R* | Radical libre |
| r.p.m. | Revoluciones por minuto |
| RH | Sustrato reductor |
| <i>rol</i> | Loci inductores de raíces |
| R-R | Dímero |
| SBP | Peroxidasa de soja |
| SDBS | Dodecil bencen sulfato sódico |
| SDS | Dodecil sulfato sódico |
| SFB | Suero fetal bobino |
| TCF | Triclorofenol |
| TEMED | N,N,N',N'-tetrametilendiamida |
| U | Unidades arbitrarias de actividad enzimática |
| UI | Unidades Internacionales de actividad enzimática |
| US-EPA | United States Environmental Protection Agency (Agencia de protección ambiental de Estados Unidos) |
| V | voltio |
| VC | Voltamperograma cíclico |

Introducción

Aplicación de enzimas vegetales para la remediación de compuestos fenólicos

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La contaminación ambiental: una problemática mundial

El comportamiento social del hombre, que lo condujo a comunicarse por medio del lenguaje, que posteriormente formó la cultura humana, le permitió diferenciarse de los demás seres vivos. Posteriormente, el progreso tecnológico, y el acelerado crecimiento demográfico lo llevó a modificar el medio ambiente, para incrementar la cantidad de recursos necesarios para alimentar y dar confort a la sociedad. Sin embargo, las alteraciones producidas al medio ambiente han llegado en algunos casos a atentar contra el equilibrio biológico de los mismos, mediante la contaminación.

Se denomina contaminación ambiental a la presencia de cualquier agente (físico, químico o biológico) en el ambiente o bien a la combinación de varios agentes en lugares, formas y concentraciones tales que sean o puedan ser nocivos para la salud, la seguridad o para el bienestar de la población, o bien, que puedan ser perjudiciales para la vida vegetal o animal, o impidan el uso normal de las propiedades y lugares de recreación y goce de los mismos. La contaminación ambiental consiste también en la incorporación a los cuerpos receptores de sustancias sólidas, líquidas o gaseosas, o mezclas de ellas, que alteren desfavorablemente las condiciones naturales del mismo, o que puedan afectar la salud, la higiene o el bienestar de la población (Atlas y Barta, 2001).

La contaminación es uno de los problemas ambientales más importantes que afectan al mundo y surge cuando se produce un desequilibrio, como resultado de la adición de cualquier sustancia al medio ambiente, en cantidad tal, que cause efectos adversos en el hombre, en los animales, vegetales o materiales expuestos a dosis que sobrepasen los niveles aceptables en la naturaleza. Esto suele ocurrir debido a los diferentes procesos productivos del hombre que conforman las actividades de la vida diaria.

Las principales fuentes de contaminación antropogénicas están identificadas, y entre ellas se incluyen las actividades industriales, militares y agrícolas. El desarrollo excesivo de las industrias químicas produce una gran

variedad de sustancias que incluye pesticidas, herbicidas, solventes, colorantes, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PHAs), explosivos, bifenilos policlorados (PCBs), metales, compuestos fenólicos, entre otros, que se acumulan o dispersan en el aire, el suelo y el agua (Gianfreda y Rao, 2004; Ohe y col., 2004). Los contaminantes son muy variados, y pueden llegar al medio ambiente por medio de desechos o efluentes domiciliarios, municipales, industriales, o por la aplicación de agroquímicos. De esa forma, la contaminación ambiental es una problemática que comenzó a pronunciarse con la aparición de las industrias, llegando a la situación actual, en donde afecta globalmente a todos los habitantes del planeta (Rovedatti y col., 2001; Ohe y col., 2004; Weschler, 2009; Crisante, 2011). Los problemas más serios parecen encontrarse en las áreas urbanas más densamente pobladas, especialmente zonas de mayor pobreza económica. También existe la contaminación rural, principalmente la proveniente de las actividades agrícolas y ganaderas, pero sus efectos suelen ser menos graves que los de las áreas urbanas (Atlas Ambiental de Buenos Aires, <http://www.atlasdebuenosaires.gov.ar/aaba/>).

En general, los cauces naturales de agua son los destinatarios principales de los desechos domiciliarios e industriales, ya sea por vertido directo en ríos, lagos u océanos, o por percolación en el suelo, llegando a napas subterráneas, donde los residuos de los mismos pueden permanecer por muchos años (Magdaleno y col., 2001; Rovedatti y col., 2001). Varios de estos compuestos generan un alto impacto ecológico, pudiendo causar efectos genotóxicos y mutagénicos o carcinogénicos en animales, plantas y microorganismos (Ohe y col., 2004, Lemme y col., 2009).

Argentina no es una excepción. En el año 2013, se presentó un informe sobre el estado del Medio Ambiente, realizado entre la agencia Green Cross Switzerland y el Instituto Blacksmith, en donde la cuenca Matanza-Riachuelo (de la provincia de Buenos Aires) figura como uno de los 10 lugares más contaminados del planeta. (<http://www.gcint.org/fs/ESS/Top-10-pollution-Threats-2013-Green-Cross-Blacksmith-light.pdf>). En dicha cuenca se encuentran más de 23.000 empresas. Muchas de ellas vuelcan a diario, y desde hace años, sus residuos sólidos o líquidos, sin ningún tipo de tratamiento, o con tratamiento insuficiente (<http://www.acumar.gov.ar/pagina/1218/control-y-monitoreo>). Argentina no posee medidas de control

adecuadas para el tratamiento y disposición de aguas servidas, residuos peligrosos sólidos y desechos industriales o domiciliarios, que finalmente terminan contaminando cuerpos de agua superficiales y subterráneos.

Además, son crecientes los registros de denuncias sobre liberación de efluentes industriales y se han elaborado mapas de contaminación de regiones con industrias. En este sentido, en la provincia de Santa Fe, la Universidad Nacional de Rosario (UNR) ha desarrollado una cartografía social que georeferencia distintos casos de contaminación en localidades aledañas a Rosario, utilizando una página web para receptor las denuncias de vertidos de efluentes industriales u otras fuentes de contaminación (<https://cordonindustrialrosario.crowdmap.com>). Por otra parte, se estima que actualmente la mayoría de los arroyos, lagos y otros cursos de agua de la provincia de Buenos Aires se encuentran contaminados, entre otros, con compuestos fenólicos (Atlas Ambiental de Buenos Aires, <http://www.atlasdebuenosaires.gov.ar/aaba/>).

El riesgo para la salud humana es inminente. Según informes y datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del año 2011, se estima que en los países en vías de desarrollo cerca del 20% de las muertes se deben directamente a causas medioambientales (http://www.who.int/topics/environmental_pollution/es/; http://www.elmundo.es/elmundosalud/documentos/2011/09/mapa_contaminacion.html). Por ello es necesario que el hombre proteja los recursos renovables y no renovables y que tome conciencia que el saneamiento del ambiente es fundamental para la vida sobre el planeta.

1.1.1. Contaminación con compuestos fenólicos

En el mundo se producen más de tres millones de toneladas anuales de compuestos fenólicos, entre ellos el fenol y sus derivados halogenados (Agostini y col., 2011 y citas contenidas en este trabajo). Muchos de ellos se encuentran en el ranking de compuestos peligrosos de la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) del Departamento de Salud Ambiental y Humana de Estados Unidos y son considerados prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental del mismo país (US EPA, 1980; 1991) debido a que presentan elevada toxicidad y persistencia (Ertürk y Saçan, 2013). Existen cuatro grupos de halofenoles (cloro, fluoro, bromo e

iodofenoles), entre ellos, los clorofenoles (derivados del fenol que contienen en su estructura de 1 a 5 átomos de cloro) son los que están siendo estudiados más extensamente, debido a que se producen en muy altas cantidades en todo el mundo, se utilizan en numerosas industrias y presentan elevada toxicidad aún en muy bajas concentraciones. Se ha demostrado que, conforme aumenta el número de átomos de cloro en su estructura, incrementa su toxicidad, mientras que su biodegradabilidad disminuye (Itoh y col, 2000; Ertürk y Saçan, 2013).

Los compuestos fenólicos son ampliamente utilizados en el ámbito doméstico, clínico, agropecuario e industrial, como desinfectantes, reactivos comerciales o precursores de síntesis de herbicidas, colorantes, plásticos, entre otros productos. Incluso, el humo de tabaco contiene fenol, pudiendo detectarse bajos niveles de este compuesto en el interior de habitaciones (generalmente menores a 100 ppb, aunque se han informado valores más altos). Cotidianamente estamos expuestos a pequeñas cantidades de fenol que se encuentran en productos de consumo diario, entre ellos alimentos y cosméticos. También son diseminados durante la aplicación de agroquímicos como pentaclorofenol (PCF) y el ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), pudiendo detectarse tanto en suelo, aire y aguas superficiales y subterráneas (Ahmaruzzaman, 2008; Zhong y col., 2012).

Los fenoles son altamente solubles en agua y solventes orgánicos y se encuentran presentes en elevadas concentraciones en efluentes industriales, o domiciliarios que, en muchos casos, se vuelcan clandestinamente al medio ambiente sin un tratamiento previo adecuado (Petroustos y col, 2008). Cabe aclarar que los compuestos fenólicos pueden estar presentes en las aguas de desecho de las industrias en concentraciones que pueden llegar a valores muy altos, alcanzando muchas veces los 1000 mg/l, lo que conlleva a un gran riesgo para los seres vivos (Buchanan y Nicell, 1997; López-Molina y col., 2003).

Los efluentes industriales suelen ser tratados en general mediante métodos físico-químicos. Estos tratamientos apuntan a disminuir los sólidos disueltos o en suspensión, la demanda química y biológica de oxígeno y el carbono orgánico total (DQO, DBO y COT respectivamente) de diferentes tipos de efluentes, tanto cloacales como industriales (Bravo y col., 1998). Estos

tratamientos no suelen ser suficientes para eliminar los compuestos tóxicos de dichos efluentes que pueden ser eliminados directamente al medio ambiente.

La exposición a compuestos fenólicos es una causa frecuente de intoxicaciones que producen fallos hepático y renal, edema pulmonar, anemia hemolítica y pueden tener acción cancerígena o teratogénica, ya que son fácilmente absorbidos a través de la piel o vías respiratorias (Flocco y col., 2002; Padilla y col., 2004).

Concentraciones de fenol de 1 mg/l o mayores afectan a la vida acuática, y la exposición a 6 mg/l de este compuesto (sin consumo) puede afectar la vida humana. Esto ha llevado a la elaboración de reglamentaciones, por Organizaciones Regulatorias Internacionales (US-EPA, OMS) en relación a las concentraciones de compuestos fenólicos que pueden admitirse en efluentes y en aguas que sean destinadas a consumo humano. Sin embargo, los niveles detectados de compuestos fenólicos en efluentes o aguas superficiales en distintas partes del mundo superan los límites propuestos (OMS, 1994; Srivastava y col., 2006; Schummer y col., 2009; Agostini y col., 2011; Alcaráz y col., 2012). En particular, la US EPA determina que el nivel de fenol en aguas no debe exceder 3,5 mg/l (US EPA, 1989) mientras que en Argentina, la ley de vertido de residuos industriales (Ley 24.051, anexo II, del año 1993) establece un nivel guía de fenol y/o fenoles totales de 1-2 µg/l para agua dulce superficial y agua de consumo humano (www.cecopal.org).

A pesar de la existencia de estas reglamentaciones, en nuestro país se han reportado numerosos casos de contaminación en fuentes de agua naturales (aguas subterráneas, ríos, lagos, mares) con compuestos fenólicos, en concentraciones mucho mayores a los límites permitidos (Magdaleno y col., 2001; Rovedatti y col., 2001; Alcaráz y col., 2012). Por ejemplo, se han detectado compuestos fenólicos en ríos de la provincia de Córdoba en una concentración superior a 2 mg/l (Paisio y col., 2009), y en otros ríos del país, como el Río Iguazú (www.territorioidigital.com), Paraná (www.universia.com.ar) y Reconquista (Castañé y col., 2006), donde se registraron concentraciones entre 0,4 a 1,49 mg/l de estos compuestos.

Es importante considerar que muchas veces estos cauces de agua contaminados, son utilizados para suministrar agua potable a la población. De acuerdo a las normativas, las concentraciones de fenol y 2,4-diclorofenol

máximas tolerables para aguas de bebida con tratamiento convencional son de 2 y 0,3 µg/l respectivamente. Sin embargo, el proceso de potabilización incluye la adición de cloro al agua, que en el caso de presentar fenoles incluso en bajas concentraciones, podrían reaccionar generando clorofenoles, incrementando la toxicidad y las consecuencias debidas a la exposición a estos compuestos en la población (Ahmaruzzaman, 2008). De acuerdo a estos antecedentes resulta evidente que el tratamiento de aguas contaminadas representa un gran desafío en cuanto al desarrollo de sistemas adecuados para la potabilización o descontaminación, sobre todo cuando se trata de aguas para consumo humano o animal.

1.2. Métodos de eliminación de compuestos fenólicos del medio ambiente

1.2.1. Tratamientos fisicoquímicos y biológicos convencionales

Entre los diversos métodos fisicoquímicos desarrollados para el tratamiento de compuestos fenólicos podemos citar la adsorción, las oxidaciones químicas hasta la mineralización o la polimerización de productos.

El proceso de adsorción es eficaz para la eliminación de la materia orgánica de efluentes. El carbón activado es uno de los materiales más utilizados para este tipo de contaminantes, debido a su alta capacidad de adsorción, que suele estar relacionada con su elevada área superficial y porosidad.

Muchos investigadores han demostrado que el carbón activado es un adsorbente eficaz para la eliminación de compuestos fenólicos. Sin embargo, su alto costo inicial y la necesidad de un sistema de regeneración costosa lo transforman en un método económicamente poco viable para procesos a gran escala o para la eliminación de compuestos fenólicos de cauces de agua naturales (Ahmaruzzaman, 2008).

Entre los métodos de oxidación química se encuentran las reacciones tipo Fenton, o foto Fenton, en las cuales se emplea Fe como agente reductor y se produce la formación de radicales libres, que polimerizan espontáneamente (Dunford, 2002; Al Momani, 2006; Iurascu y col., 2009). La oxidación electroquímica, termoquímica, la aplicación de electrólisis, el agregado de

dióxido de plomo u otros catalizadores químicos son otras alternativas para la eliminación de compuestos fenólicos, pero presentan desventajas, tales como el alto costo, y la baja eficiencia (especialmente cuando se trata de mezclas de contaminantes), sumado a la posibilidad de que se generen nuevos productos tóxicos (Polcaro y Palmas, 1997; Valcarce, 1999; Al Momani, 2006, Eapen y col., 2007; Busca y col., 2008; Zhou y col., 2008; Ma y col., 2009; Brandão y col., 2013).

Por ello y teniendo en cuenta que los tratamientos fisicoquímicos convencionales no son suficientes para la eliminación de compuestos tóxicos en grandes cantidades de agua o suelo contaminado, los mismos podrían complementar otras metodologías, incluyendo métodos biológicos de saneamiento.

Entre los métodos biológicos tradicionales para el tratamiento de efluentes se emplean comúnmente la fermentación en piletas de decantación, la utilización de lodos activados y las lagunas de oxidación. Sin embargo, los microorganismos involucrados en estos procesos son altamente sensibles a la presencia de compuestos tóxicos. Bajo este contexto adquieren gran importancia los aportes biotecnológicos, que ofrecen nuevas alternativas de remediación biológica de contaminantes tóxicos (bio y fitorremediación), que podrían aplicarse antes o después de determinados tratamientos convencionales (Husain y Ulber, 2011).

1.2.2. Bio y fitorremediación de compuestos fenólicos

La biodegradación de un contaminante orgánico puede dar lugar a la biotransformación de un compuesto cuando los productos son nuevas moléculas orgánicas, incluso de mayor tamaño que la original, o bien a la mineralización, cuando los productos finales de dicha degradación son CO₂ y agua. La estructura de la molécula del contaminante es determinante en su proceso de degradación, por ejemplo, los enlaces carbono-halógeno son sumamente estables y su ruptura es un proceso altamente endergónico, lo que dificulta su degradación natural y permite su acumulación en el medio ambiente. Sin embargo, muchos de estos compuestos pueden ser degradados por organismos que contengan enzimas o vías que permitan la remoción de diferentes compuestos tóxicos, o xenobióticos, lo cual dio lugar al desarrollo de

una rama de la biotecnología, conocida como biorremediación (Atlas y Bartha, 2001).

En general, el término biorremediación se utiliza para describir el uso de seres vivos o enzimas que deriven de ellos para restaurar ambientes contaminados. Entre los organismos más usados se encuentran los microorganismos (bacterias, hongos algas), las plantas (fitorremediación) y los nematodos (vermirremediación), es decir, se sabe que existe un importante número de organismos con capacidad para eliminar diferentes contaminantes. En la tabla 1 se citan solo algunos ejemplos de la utilización de microorganismos y plantas para la remediación de compuestos fenólicos.

Tabla 1: Utilización de diferentes organismos para remediación de compuestos fenólicos

| Organismo | | Contaminante | Referencias |
|-----------|--|----------------------------------|-------------------------|
| Bacterias | Comunidad bacteriana indígena (aislamiento del Riachuelo, Argentina) | 2,4,6-TCF* | Gallego y col., 2009 |
| | <i>Pseudomonas putida</i> | 2,4-DCF* | Kargi y col., 2005 |
| | <i>Mycoplana dimorpha</i> | 2,4-DCF | Manikandan y col., 2008 |
| | Comunidad bacteriana | 2,4-DCF | Quan y col., 2003 |
| | Cultivo mixto | PCF* | Singh y col., 2008a |
| | <i>Alcaligenes</i> | 2,4-DCF; 2,4-D* | Koh y col., 1997 |
| | <i>Bacillus sp.</i> | Fenol | Djokic y col., 2013 |
| Algas | <i>Tetraselmis marina</i> | 2,4-DCF | Petroutsos y col., 2008 |
| | <i>Skeletonema costatum</i> | 2,4-DCF | Yang y col., 2002 |
| Hongos | <i>Pleurotus spp.</i> | 2-MF*, 2,3-DMF* | Tsioulpas y col., 2002 |
| | <i>Pleurotus ostreatus</i> | fenoles de efluente | Aggelis y col., 2003 |
| | | fenoles de efluente | Olivieri y col., 2006 |
| | <i>Trametes pubescens</i> | 2-CF*; 2,4-DCF 2,4,6-TCF; PCF | Gaitan y col., 2011 |
| | <i>Trametes versicolor</i> | Fenoles de efluentes | Ryan y col., 2007 |
| Plantas | <i>Vetiveria zizanioides</i> L. Nash | fenol | Singh y col., 2008b |
| | <i>Medicago sativa</i> | fenol | Flocco y col., 2002 |
| | <i>Salix matsudana</i> | 2,4-DCF | Shi y col., 2012 |
| | <i>Nicotiana tabacum</i> | 2,4-DCF | Talano y col., 2012a |
| | <i>Vicia sativa</i> L. | fenol | Ibañez y col., 2012 |

(*) CF: clorofenol; DCF: diclorofenol; TCF: triclorofenol; PCF: penta cloro fenol; MF: metilfenol, DMF: dimetoxifenol; 2,4-D: ácido 2,4 fenoxicético;

Entre las ventajas que presenta la remediación mediante plantas o microorganismos, en relación a los métodos fisicoquímicos de tratamiento, es que brinda más seguridad al medio ambiente, es menos disruptiva y menos costosa que otras metodologías. Además, la remediación puede realizarse *in situ* o *ex situ*, y ofrece un amplio rango de potencialidades para la remoción de diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos, en diferentes ambientes o efluentes contaminados (Harvey y col., 2001; Suresh y Ravishankar, 2004; Pilon-Smits, 2005). Otra ventaja es la compatibilidad de las técnicas de remediación con los métodos convencionales, por lo cual es posible que se utilicen en forma combinada y complementaria con procesos físicos, o químicos para mejorar y favorecer la efectividad de las mismas. De esta forma se evita el uso de sustancias químicas, para eliminar los contaminantes, como los catalizadores metálicos o sustancias sintéticas, reduciendo los riesgos que éstos representan para la salud y el ambiente. (Varsavsky, 2002; Entezari y col., 2006; Alcalde y col., 2006; Hamid y Khalil-ur-Rehman, 2009).

Continuamente se estudian microorganismos y plantas capaces de degradar contaminantes, dirigiendo los esfuerzos hacia la identificación de las enzimas responsables de estos procesos, con el fin de aplicarlas posteriormente en tratamientos de remediación. Las enzimas de interés pueden ser extraídas de dichos organismos y utilizadas para remediación enzimática en suelos o aguas contaminados. Esto demanda la realización de estudios para encontrar nuevas fuentes de enzimas, que puedan tener altas eficiencias bajo diferentes condiciones de pH, temperatura, salinidad, en presencia de sustancias tóxicas (Durán y Espósito, 2000; Duran y col., 2002; Ahuja y col., 2004; Gianfreda y Rao, 2004; Alcalde y col., 2006; Husain y col., 2009).

1.2.3. Fitorremediación utilizando cultivos de raíces transformadas

Los cultivos de raíces transformadas son una herramienta biotecnológica que se utiliza como sistema modelo en estudios bioquímicos, fisiológicos y moleculares de plantas, así como también para la producción de metabolitos secundarios o enzimas, y más recientemente para estudios relacionados con la fitorremediación de contaminantes, entre otras aplicaciones. Como característica, en estos cultivos se produce un crecimiento masivo de raíces adventicias, generando una importante cantidad de biomasa radicular. Estos

cultivos presentan un genotipo y fenotipo estable, con un crecimiento rápido e indefinido *in vitro*, pueden ser subcultivados en medios sin el agregado de fitohormonas y permiten la producción de numerosos metabolitos secundarios (Georgiev y col., 2007; 2012; Talano y col., 2012b, Ludwig-Müller y col., 2014).

Se obtienen a través del proceso de infección de un tejido vegetal (explanto) con la bacteria fitopatógena *Agrobacterium rhizogenes*. Se trata de una bacteria del suelo, Gram negativa, que alberga un megaplásmido (de más de 200 kb) llamado pRi, con la capacidad de transferir e integrar al genoma del vegetal un único segmento de ADN, denominado T-ADN, mediante lo cual se produce un crecimiento, en forma tumoral, de raíces. El T-ADN contiene los genes denominados *rol* (loci inductores de raíces), estos loci son esenciales para el desarrollo y mantenimiento del fenotipo de las raíces transformadas, sin embargo, su función y el mecanismo molecular por el cual ocurre el proceso no ha sido todavía elucidado completamente (Georgiev y col., 2012, Ludwig-Müller y col., 2014). Dentro de la secuencia del T-ADN se pueden diferenciar dos grupos de genes, el primero, se encuentra en la región izquierda del T-ADN (T_i -ADN) y contiene los cuatro genes *rol* (A, B, C y D). Este grupo de genes está relacionado con la biosíntesis de fitohormonas, que producen una alteración del balance hormonal de la célula hospedadora, induciendo una estimulación de la división celular que resulta en la formación de las raíces transformadas. De ellos, el principal involucrado en la formación de las raíces sería el gen *rol B* (Bhagyalakshmi y col., 2012; Ludwig-Müller y col., 2014). El segundo grupo de genes, ubicado a la derecha del T-ADN (T_d -ADN), contiene dos genes relacionados a la producción de auxinas (*aux 1* y *aux 2*), dos de síntesis de opinas (*ops*) y uno de agropinas (*ags*) (Casanova y col., 2005; Bhagyalakshmi, 2012; Sharma y col., 2013).

Las diferentes cepas de *A. rhizogenes* varían en su habilidad para transformar, en su virulencia y en la morfología de las raíces. Las mismas pueden clasificarse de acuerdo al tipo de opinas producidas por el tumor. En general, se clasifican las cepas en dos grupos principales:

- tipo agropina (cepas A4, 15834, LBA 9402). Inducen la formación de raíces produciendo agropina, manopina y sus correspondientes ácidos.

- tipo manopina (cepas 8196, TR7, TR101) elicitan las raíces conteniendo solamente manopina, ácido manopínico y ácido agropínico.

Esta clasificación, presentada en 1983, es la más aceptada en la actualidad, sin embargo también existe otra clasificación, propuesta en 1997, que considera 5 grupos (octopina, agropina, nopalina, manopina y cucumopina) (Sharma y col., 2013 y citas contenidas en este trabajo).

A. rhizogenes tiene la capacidad de infectar y generar el tumor en un amplio rango de mono y dicotiledóneas (a la fecha se han reportado aproximadamente 500 especies vegetales susceptibles a la transformación). Las raíces transformadas pueden obtenerse mediante la inoculación del microorganismo en distintos tejidos vegetales. El evento de transformación se produce mediante la producción de heridas o pequeños cortes en el tejido vegetal previamente desinfectado, lo cual permite la penetración de la bacteria, con la posterior transferencia del segmento T-ADN del plásmido Ri a la célula vegetal, y la posterior integración del mismo al genoma de la misma. En las cepas conteniendo el plásmido Ri tipo agropina las dos regiones T₁-ADN y T_α-ADN se transfieren por separado al genoma vegetal (Bandyopdhyay y col., 2007). Los síntomas observados luego de la infección por *A. rhizogenes* se deben a una mayor sensibilidad de las células transformadas a las auxinas, lo que promueve una proliferación de tipo tumoral en forma de raíces en la zona infectada (Suza y col., 2008). En la figura 1 se pueden observar el crecimiento de las raíces tumorales a partir de un explanto vegetal inoculado con *A. rhizógenes*.

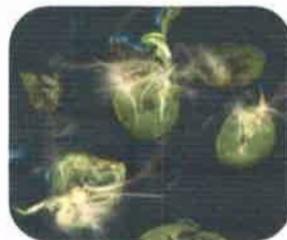


Figura 1: Crecimiento de raíces transformadas a partir de la inoculación de explantos vegetales con *Agrobacterium rhizógenes*.

Las raíces genéticamente modificadas pueden separarse y establecerse asépticamente en cultivos, como clones de raíces (Figura 2). Además, dichas raíces se regeneran fácilmente y transmiten el T-ADN a su progenie (Wahby, 2007).

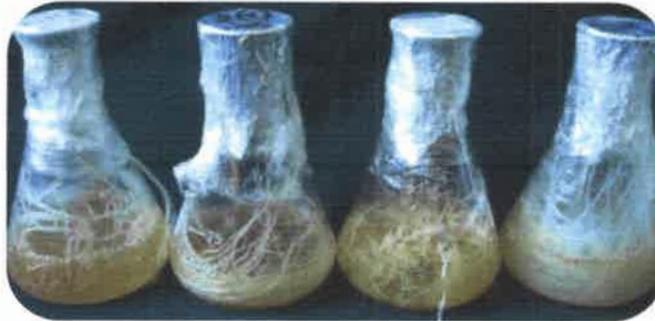


Figura 2: Cultivos de raíces transformadas de diferentes especies vegetales crecidos en medio MS líquido.

Una vez establecidos los cultivos, es posible subcultivarlos para su mantenimiento, o producir biomasa con fines biotecnológicos. Para este fin se han diseñado distintos modelos de biorreactores, permitiendo producir distintos metabolitos de interés (Suresh y col., 2001; 2005; Georgiev y col., 2012; Ludwig-Müller y col., 2014)

Los cultivos de raíces transformadas ofrecen varias ventajas para su uso en estudios de fitorremediación, las cuales incluyen: su capacidad de crecer rápidamente en condiciones asépticas, proporcionan una mayor superficie de contacto entre los contaminantes y el tejido, y su estabilidad genética y metabólica, incluso durante periodos de cultivo prolongados (Gujarathi y col., 2005; Georgiev y col., 2007; 2012). Otra ventaja de utilizar raíces transformadas para estudios de fitorremediación, es su capacidad de producir grandes cantidades de exudados que contienen enzimas que pueden transformar a los contaminantes y algunos compuestos quelantes de metales, los cuales pueden secuestrar contaminantes orgánicos e inorgánicos (Gujarathi y col., 2005; Bais y col., 2006; Doty, 2008).

Cultivos de raíces transformadas de distintas especies vegetales han sido utilizados para evaluar el potencial de los mismos para eliminar contaminantes del medio ambiente, incluyendo a los compuestos fenólicos, como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2: Utilización de cultivos de raíces transformadas de diferentes especies vegetales para la remediación de compuestos fenólicos

| Especie | sustratos | Estrategia/Estudio | Referencias |
|--|----------------------------|--|--|
| <i>Daucus carota</i> <i>Ipomoea batatas</i> <i>Solanum aviculare</i> | fenol 2-CF* 2,6-DCF* | Remoción en medios conteniendo entre 50 a 5000 μ M de los sustratos. Eficiencias de remoción hasta 90% (50 μ M). | Santos de Araujo y col., 2006 |
| <i>Brassica napus</i> | fenol | Remoción de soluciones conteniendo entre 10 y 500 mg/l. Eficiencia de 80% (500 mg/l). | Coniglio y col., 2008 González y col., 2012 |
| | 2,4-DCF | Remoción de soluciones conteniendo entre 100 y 1000 mg/l. Escala laboratorio y biorreactor. Eficiencia de 99%. | Agostini y col., 2003 Angelini y col., 2011 |
| <i>Brassica juncea</i> | fenol | Remoción de soluciones conteniendo entre 50 y 1000 mg/l. Eficiencia de 97% para concentraciones menores a 500 mg/l. | Singh y col., 2006 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | fenol | Establecimiento y comparación con cultivo transgénico para peroxidasa básica de tomate. Remoción de soluciones entre 100 y 500 mg/l de fenol. Eficiencias de 90% | Sosa-Alderete y col., 2009 |
| | 2,4-DCF | Remoción de soluciones entre 100 y 1000 mg/l de fenol. Eficiencias de 98-83% respectivamente. | Talano y col., 2010 |
| <i>Solanum lycopersicum</i> | fenol | Establecimiento y comparación con cultivos transgénicos que sobreexpresan peroxidasa básica. Remoción de soluciones 100 mg/l de fenol. Eficiencias de 85% | Wevar Oller y col., 2005 |
| <i>Helianthus annuus</i> | fenol | Remoción de soluciones entre 100 y 500 mg/l. Eficiencias mayores 95% (100 mg/l). | Jha y col., 2013 |

(*) CF: cloro fenol; DCF: diclorofenol

Los cultivos de raíces transformadas son altamente eficientes para la remediación de compuestos fenólicos, incluso en elevadas concentraciones, presentando un alto potencial para su aplicación en tratamientos de efluentes. En general, se atribuye esta capacidad a la presencia de enzimas oxidorreductasas, principalmente peroxidasas. En este sentido, cultivos de raíces transformadas transgénicos, que sobreexpresan peroxidasas han mostrado ser más eficientes en la remoción de compuestos fenólicos (Wevar Oller y col., 2005; Sosa Alderete y col., 2009)

1.2.4. Utilización de enzimas en remediación de compuestos fenólicos

Las enzimas pueden utilizarse como un complemento para remover compuestos tóxicos que interfieran con subsecuentes tratamientos biológicos u otros tratamientos convencionales a fines de disminuir costos y mejorar la eficiencia del proceso de detoxificación de efluentes industriales (Husain y Ulber, 2011)

La biocatálisis mediada por oxidasas microbianas, fúngicas o vegetales, ha mostrado un gran potencial en la remoción de compuestos fenólicos de efluentes industriales o aguas contaminadas. Entre ellas, las lacasas y las peroxidasas son muy atractivas para su aplicación en bioprocesos, ya que tienen baja especificidad, catalizando la oxidación de un amplio rango de sustratos en forma controlada y sin la necesidad de adicionar coenzimas, lo que disminuye notablemente los costos de implementación (Duran y col., 2002; Burton, 2003; Riva, 2006; Rodríguez Couto y Toca Herrera, 2006). Estas enzimas, fáciles de extraer y de producir en grandes cantidades, suelen ser obtenidas mediante cultivos de hongos o a partir de tejidos vegetales. Diversos autores han estudiado sus propiedades y su capacidad de remoción de compuestos fenólicos, para su aplicación en biorremediación, mostrando altas eficiencias en cortos tiempos de tratamiento (Tabla 3).

Tabla 3: Utilización de lacasas y peroxidasas de diferentes orígenes para la remediación de compuestos fenólicos

| Enzima | Fuente | Sustratos | Estrategia/Estudio | Referencias |
|---|--|--|--|---|
| Lacasas | <i>Trametes</i> sp. | 2,6-DMF*; 2-CF; 3-CF; 4-CF*; 2,4-DCF; 2,6-DCF*; 2,4,6-TCF*; cresol; xilenol | Eficiencias de 50% en remoción de 2,4-DCF (75-80 mg/l). En mezclas fenólicas obtienen eficiencias entre 15 y 70%. | Shin-Ya y col., 2005 |
| | <i>Trametes (Coriolus) versicolor</i> | 2,4-DCF | 50% de eficiencia de remoción de 2,4-DCF (25mg/l) Inmovilización en quitosano. | Zhang y col., 2009 |
| | | 2-CF; 4-CF; 2,4-DCF; 2,5-DCF; 2,6-DCF; 3,4-DCF; 3,5-DCF; 2,4,5-TCF; 2,4,6-TCF, PCF* | Eficiencias hasta 74% (Sustratos en concentración 50 mg/l). Los compuestos que contienen átomos de cloro en posición 3, 4 y/o 5 no fueron removidos con esta enzima. | Itoh y col., 2000 |
| | <i>Pleurotus</i> sp. | 2,4-DCF | 99% de eficiencia de remoción de 2,4-DCF (1 mM) | Bhattacharya y col., 2009 |
| | <i>Aspergillus</i> sp. | guayacol catecol cresol | Eficiencias de remoción entre 60 y 70% (concentraciones iniciales de 5 mM). Formación de polímeros sobre membrana. | Ko y Chen, 2008 |
| | <i>Bacillus</i> | guayacol ; 3-MF*; 4-MF; 2,3-DMF; 2,6-DMF; 3,4-DMF; 3,5-DMF; 2-Cloro-4-MF; 4-Cloroguayacol | Eficiencia de remoción entre 32 a 90% dependiendo del sustrato (concentraciones iniciales de 0,1 mM). | Hirose y col., 2003 |
| Peroxidasas | <i>Armoracia rusticana</i> (HRP) | fenol | 90% de eficiencia de remoción de fenol (2 mM). | Bódalo y col., 2006 |
| | | PCF | Eficiencias de remoción de 92% (2,25mM) | Zhang y Nicell., 2000 Kim y col., 2007 |
| | | 2,4-DCF, 2,6-DCF | Determinación de productos de oxidación | Laurenti y col.,2002; 2003 |
| | <i>Glycine max</i> (SBP) | fenol | 85 % de eficiencia de remoción de fenol (1 mM). | Feng y col., 2013 Steevensz y col., 2014 |
| | | fenol | 75% de eficiencia de remoción de fenol (2 mM) | Bódalo y col., 2006 |
| | | 4-CF | 90% de eficiencia de remoción de 4-CF (1,5 mM) | Gómez y col., 2009 |
| | <i>Cynara scolymus</i> L. | 4-CF entre otros compuestos fenólicos | 80% de remoción de 4-CF (1,4 mM) | López-Molina y col., 2003 |
| | <i>Coprinus cinereus</i> | compuestos fenólicos varios | Eficiencias de remoción de 90% (100 mg/l). | Kauffmann y col., 1999 |
| | <i>Brassica oleracea</i> | fenol | 90% de eficiencia de remoción de fenol (10 mM) | Deva y col., 2014 |
| | Raíces transformadas de <i>S. lycopersicum</i> | fenol; 2,4-DCF | Extractos de peroxidasas y peroxidasas parcialmente purificadas. Eficiencias de remoción de 80 % (10 mg/l). | González y col., 2006 |
| Raíces transformadas de <i>Brassica napus</i> | fenol | Peroxidasas parcialmente purificadas. Eficiencia de 35%. | Coniglio y col., 2008 | |

DMF: dimetilfenol; CF: clorofenol; DCF: diclorofenol; TCF: triclorofenol; PCF: pentaclorofenol; MF: metilfenol

En general, las peroxidasas presentan mayores eficiencias de remoción de compuestos fenólicos, mientras que los tiempos de incubación de reacciones catalizadas por estas enzimas son mucho menores comparados con los utilizados por la mayoría de las lacasas.

1.2.5. Peroxidasas vegetales: su aplicación en remediación

Las peroxidasas (E.C.1.11.1) son hemoproteínas con actividad de oxidoreductasas, presentes en numerosos seres vivos. Muchas de ellas, de diferentes orígenes, han sido estudiadas exhaustivamente en cuanto a sus funciones fisiológicas, características catalíticas y han sido secuenciadas. Estas enzimas presentan un gran número de isoformas, que pueden tener diferente localización subcelular, masa molecular y punto isoeléctrico (pI), dando lugar a diversos grupos: básicas, neutras y ácidas (González y col., 2008). Todas ellas tienen en común la característica de utilizar peróxidos, principalmente peróxido de hidrógeno (H_2O_2), como aceptor de electrones para oxidar varios compuestos orgánicos o inorgánicos, entre ellos fenol y sus derivados, formando radicales libres que pueden reaccionar entre si y polimerizar espontáneamente (Figura 3) (Bakalovic y col., 2006; Saidman y col., 2006; Passardi y col., 2007; Gómez y col., 2008; Qayyum y col., 2009; Hamid y Khalil-ur-Rehman, 2009; Mao y col., 2013).

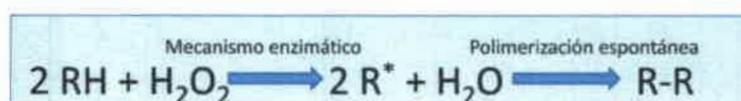


Figura 3: Mecanismo de acción de peroxidasas. RH: Sustrato reductor. R*: radical libre del sustrato; R-R: dímero.

El mecanismo de acción de las peroxidasas ocurre en tres etapas. En el primer paso, la enzima reacciona con el sustrato oxidante (generalmente H_2O_2), formando un producto intermediario conocido como Compuesto I. Luego, el compuesto I reacciona con una molécula de sustrato (RH) el cual es oxidado, produciendo la liberación de un radical libre (R^*) y la formación del compuesto II. Posteriormente la enzima reacciona con una segunda molécula de sustrato, se libera una molécula de agua y se forma un segundo radical libre quedando la enzima disponible para comenzar un nuevo ciclo. En la figura 4 se resume el mecanismo de acción descripto.

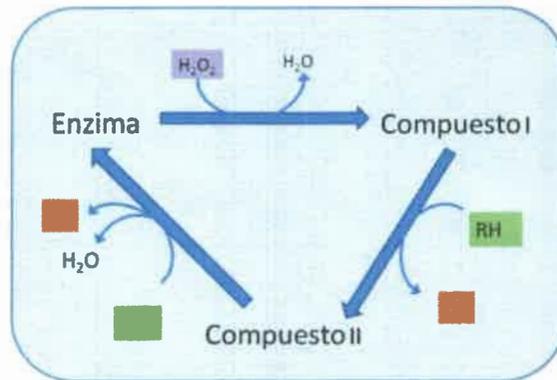


Figura 4: Esquema representativo del mecanismo catalítico de las peroxidasas, utilizando peróxido de hidrógeno como agente oxidante. RH: Sustrato reductor. R*: radical libre del sustrato. Compuestos I, II: intermediarios.

El sitio activo de este grupo de enzimas está constituido por el grupo hemo, y dentro de su estructura proteica tiene gran relevancia la presencia de histidinas en la posición proximal y distal al mismo. Estas histidinas son esenciales para el ciclo catalítico de la reacción ya que estabilizan las cargas producidas durante las oxidaciones de los sustratos. Las formas y propiedades del sitio activo de las peroxidasas pueden variar según la familia (Kummer y col., 1996; Dunford, 2002; Saidman y col., 2006; Gómez y col., 2008).

Estas enzimas han sido propuestas como herramientas para la remediación de contaminantes, principalmente en la eliminación de peróxidos, o compuestos tóxicos y recalcitrantes que pueden encontrarse en efluentes industriales o suelos y aguas contaminadas. De acuerdo a lo que se sabe actualmente, una gran variedad de contaminantes orgánicos podrían ser oxidados por peroxidasas vegetales. Este hecho se debe a que se trata de enzimas muy ubicuas, de elevada afinidad por sustratos orgánicos de diferente naturaleza química y a su baja especificidad de sustrato (Kvesitadze y col., 2005). Entre las más estudiadas se encuentran la peroxidasa de rábano picante (*Armoracia rusticana*) llamada HRP ("horseradish peroxidase") y la de soja (*Glycine max*) denominada SBP ("soybean peroxidase") (Gianfreda y Rao, 2004; Hamid, 2009; Hamid y Khalil-ur-Rehman, 2009).

Numerosas peroxidasas vegetales han sido purificadas a partir de raíces (órganos en los que son particularmente abundantes) de plantas crecidas a campo. Sin embargo estos cultivos presentan algunas desventajas ya que son afectados por variaciones climáticas, cambios en el suelo, enfermedades y

además se requieren grandes cantidades de tejido para su extracción. Por esta razón, los cultivos *in vitro* de raíces transformadas, por tratarse de cultivos organizados que presentan un gran desarrollo de masa radicular, constituyen una alternativa interesante para la producción de estas enzimas, ya que se cultivan bajo condiciones controladas, asegurando una producción constante y estable de las mismas, tanto en los tejidos propiamente dichos como en el medio de cultivo (Agostini y col., 1997; Agostini y col., 2003; Thimmaraju y col., 2005; Singh y col., 2006).

Una de las principales limitaciones de la aplicación de enzimas en bioprocesos a nivel industrial es la presencia de grandes volúmenes de efluentes a tratar, que demandan una elevada producción de estas enzimas. La estabilidad de las mismas en las condiciones operacionales es de vital importancia en biotecnología. Además, las peroxidasas pueden sufrir pérdida de actividad o desnaturalización durante el proceso, lo que disminuye la eficiencia (Duran y col., 2002; Husain y Ulber, 2011).

Esta pérdida de actividad puede ocurrir durante la reacción de oxidación de los sustratos, mediante:

a) Adsorción del producto de polimerización en el sitio activo de la enzima, lo que bloquearía el ingreso de nuevo sustrato en el ciclo catalítico (Ziemys y Kulys 2005a; 2005b).

b) Reacción entre la enzima y radicales fenoxi o fenilo (radicales libres), que reaccionarían con el grupo hemo de la enzima produciendo su degradación, afectando irreversiblemente el sitio activo (Mao y col., 2013).

c) Inactivación suicida por H_2O_2 , propia del mecanismo de las peroxidasas. (Nazari y col., 2005a; 2007; Mahmoudi y col., 2008; Kulys e Ivanec-Goranina, 2009). Este proceso puede ocurrir a nivel de la reacción del Compuesto I con H_2O_2 , en donde se produce una partición que puede conducir al reciclaje de la enzima o a su inactivación. Las peroxidasas son más susceptibles a la inactivación en presencia de un exceso de H_2O_2 , en donde el ciclo catalítico da origen a una forma inactiva denominada P-670 (también llamada verdohemoproteína) y otro intermediario denominado Complejo III, de muy baja reactividad. La formación de este último intermediario no indica inactivación terminal de la enzima, dado que puede revertir espontáneamente hacia el

estado nativo de la misma (Hernández-Ruiz y col., 2001; Malomo y col., 2011; Sosa Alderete y col., 2012). El mecanismo de inactivación suicida de las peroxidasas en presencia de un exceso de H_2O_2 se resume en la figura 6.

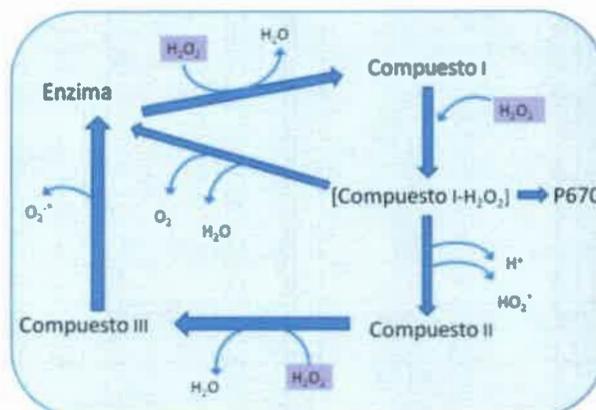


Figura 5: Esquema representativo del mecanismo de inactivación suicida de las peroxidasas, en presencia de exceso de peróxido de hidrógeno. Compuestos I, II y III: intermediarios. P670: forma inactiva de la enzima. HO_2^{\cdot} , $\text{O}_2^{\cdot-}$: radicales libres. Tomado de Fernández-Ruiz y col., (2001) con modificaciones.

Para evitar la pérdida de actividad de las peroxidasas se pueden optimizar las condiciones de reacción. Las principales estrategias para mejorar la estabilidad operacional y de minimizar la pérdida de actividad incluyen el uso de aditivos, la inmovilización, cristalización o la utilización de activadores (Nakamoto y Machida 1992; Mahomoudi y col., 2003; Kurniawati y Nicell, 2007; Mao y col., 2013).

1.2.6. Aditivos para incrementar la eficiencia de peroxidasas

Se han realizado numerosos estudios para evaluar el efecto de distintos compuestos sobre la actividad de las peroxidasas, apuntando a optimizar la eficiencia y a aumentar la vida media de las mismas. Entre ellos, se destaca el empleo de polietilenglicol (PEG) de diferentes pesos moleculares que permite mejorar la eficiencia de remoción de compuestos fenólicos e incrementar la recuperación de peroxidasas, luego del proceso como fue demostrado para peroxidasas de *Armoracia rusticana* (HRP), *Glicine max* (SBP), *Brassica oleracea*, *Brassica napus*, *Solanun lycopersicum*, entre otras (Ghiourelotis y

Nicell, 1999; Tonegawa y col., 2003; Bódalo y col., 2006; González y col., 2008; Quintanilla-Guerrero y col., 2008; Feng y col., 2013; Deva y col., 2014).

El uso de agentes surfactantes, como polisorbato (Tween), dodecil sulfato sódico (SDS) y Tritón también ha sido relacionado a incrementos de actividad enzimática, incrementos de eficiencia y protección de peroxidasas (Kim y col., 2007; Feng y col., 2013; Thomas, 2013). Sin embargo, los efectos no son iguales para todas las peroxidasas y pueden variar con las concentraciones de los aditivos, llegando a generar efectos inhibitorios (Mahmoudi y col., 2003; Nazari y col., 2005a).

La presencia de solventes orgánicos, como metanol, etanol, hexanol, hexadecano, dimetilformamida o dimetilsulfóxido pueden generar un importante impacto sobre la actividad de las enzimas, afectando a la formación de los productos, obteniéndose por ejemplo, a partir de fenol, polímeros de diferentes pesos moleculares (Kobayashi e Higashimura, 2003; Singh y col., 2012; He y col., 2014).

Algunos autores han evaluado también los efectos de otros compuestos, como metales, metaloides y aminoácidos, encontrando efectos protectores, activadores o inhibidores sobre la actividad de peroxidasas de distinto origen. Estos antecedentes son de relevancia cuando se evalúa el tratamiento de efluentes complejos, que pueden contener mezclas de estos compuestos (Keyhani y col., 2003; Mahmoudi y col., 2003; Nazari y col., 2005a)

1.2.7. Inmovilización de enzimas

La inmovilización enzimática consiste en mantener la biomolécula unida o atrapada en un soporte físico con adecuada estabilidad química y mecánica, conservando su actividad catalítica y permitiendo el flujo de sustratos y productos.

La inmovilización de enzimas se caracteriza por aumentar, en general, su estabilidad y vida media, facilitando la separación de las mismas de la solución post-tratamiento (Rojas-Melgarejo, 2002). Esto permite, en muchos casos, su re-utilización, disminuyendo los costos, aumentando la eficiencia del proceso de remoción en pequeña escala como así también en biorreactores. No obstante algunas desventajas radican en que ciertos agentes inmovilizantes pueden presentar elevado costo y/o reducir la actividad específica de la enzima

(Mateo y col., 2007; Vojinović y col., 2007; Almazadeh y Nejati, 2009; Miletić y col., 2012; Feng y col., 2013).

En general, los métodos de inmovilización pueden clasificarse en irreversibles o reversibles. Las enzimas pueden ser inmovilizadas en soporte naturales y/o sintéticos uniéndolas al mismo mediante enlaces covalentes o uniones débiles y pueden además ser encapsuladas mecánicamente la adición de agentes que formen una película protectora alrededor de la enzima inmovilizada, permitiendo la difusión de reactivos y productos de pequeño tamaño, pero no de proteínas (Rojas-Melgarejo, 2002; Fajardo-Ochoa y col., 2011).

1.2.7.1. Métodos de inmovilización irreversibles

En los métodos de inmovilización irreversibles se realiza el enlace del biocatalizador a un soporte de manera permanente, por lo cual el biocatalizador no puede ser liberado sin destruir o modificar su actividad biológica o el soporte. Los procedimientos más comunes que pueden emplearse son el enlace covalente, enlace cruzado, atrapamiento y micro encapsulado (Figura 6).

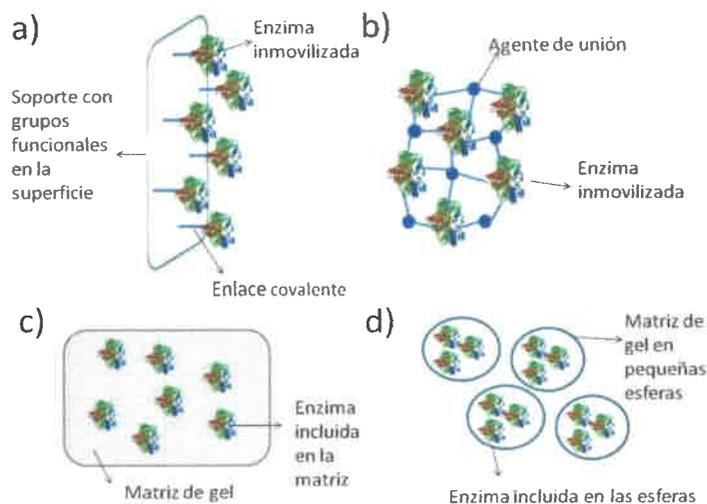


Figura 6: Sistemas de inmovilización irreversible. a) Inmovilización covalente sobre un soporte con grupos funcionales. b) Inmovilización por formación de enlaces cruzados. c) Inmovilización por atrapamiento en matriz de gel. d) Inmovilización por atrapamiento en esferas de gel. Tomado de Fajardo-Ochoa y col., 2011, con modificaciones.

La inmovilización covalente (Figura 6 a) es ampliamente utilizada, especialmente cuando existe un requerimiento estricto de ausencia de proteínas en la solución post-proceso. El método incluye una fase de activación del soporte, en la cual se adiciona una función reactiva al mismo, generalmente grupos electrofílicos, que incluyen cadenas de lisina (grupo amino), cisteína (grupo tiol) o los ácidos aspártico y glutámico (grupos carboxilo), que reaccionarán con los grupos reactivos análogos de las proteínas. Mediante la interacción de los grupos del soporte con los de la proteína, la misma será inmovilizada y orientada. La principal desventaja de este método radica en la posibilidad de que la unión covalente se realice con grupos funcionales del sitio activo, lo que implicaría modificación del mismo o impedimentos estéricos que reduzcan la actividad de la enzima. Sin embargo, este efecto puede verse disminuido al dirigir el enlace a grupos de sitios específicos de la enzima y/o con una orientación molecular definida (Rojas-Melgarejo, 2002; Fajardo-Ochoa y col., 2011).

La inmovilización mediante la formación de enlaces cruzados (Figura 6 b) no necesita el empleo de soportes. En estos métodos se inmoviliza la enzima formando agregados, que se originan mediante la formación de enlaces directos entre las enzimas, o entre enzimas y un agente de unión, generalmente de bajo peso molecular (por ejemplo glutaraldehído). Si bien este método tiene la ventaja de ser sencillo, cuenta con la desventaja de ser altamente susceptible a pequeñas variaciones en las condiciones de operación.

Por otra parte, los métodos de atrapamiento están basados en la inclusión de las enzimas en una red polimérica que permite la difusión de los sustratos y productos, sin permitir la difusión de las proteínas. Puede realizarse la inclusión en geles (Figura 6 c) o por micro-encapsulación (Figura 6 d). Los soportes pueden ser naturales o artificiales (Rojas-Melgarejo, 2002). En el caso de inclusión en gel pueden emplearse sílica gel, poliacrilamida, agarosa, entre otros. Los geles pueden clasificarse en geles húmedos, geles secos (xerogeles) o geles en aerosol (aerogeles). Las enzimas son suspendidas en una solución que posteriormente es gelificada, quedando atrapadas. Para la micro-encapsulación se emplean generalmente soportes porosos (que pueden ser posteriormente revestidos con nanocompuestos), liposomas (formando microemulsiones con agentes emulsificantes) o se forman cápsulas de gel (por

ejemplo alginato de calcio) (Fajardo-Ochoa y col., 2011). Las técnicas de inclusión tienen la ventaja de no afectar la estructura de la proteína, por lo cual la actividad de las enzimas permanece intacta. Además, protegen a las enzimas del medio externo, permitiendo su aplicación en diversas condiciones de pH y temperatura, y permiten el agregado de diferentes aditivos que mejoren la eficiencia del proceso. Sin embargo, su principal desventaja la menor difusión de sustratos y productos (Fajardo-Ochoa y col., 2011).

1.2.7.2. Métodos de inmovilización reversibles

La característica de los métodos de inmovilización reversible es la posibilidad de desprender a las enzimas del soporte bajo condiciones no extremas. Esto permite que el soporte pueda ser reutilizado, regenerándose y recargándose de enzimas cuando la actividad de las mismas decae, por lo cual disminuyen los costos del proceso.

Dentro de este grupo, se encuentran los métodos de adsorción, en los cuales se utilizan soportes orgánicos o inorgánicos que atraen a las enzimas y las retienen por medio de interacciones iónicas, puentes de hidrógeno, fuerzas hidrofóbicas o de Van der Waals (Rojas-Melgarejo, 2002). En la figura 7 se muestra, a modo de ejemplo, la adsorción de las enzimas mediante la interacción de cargas positivas de las mismas sobre un soporte cargado negativamente (soporte de intercambio catiónico).

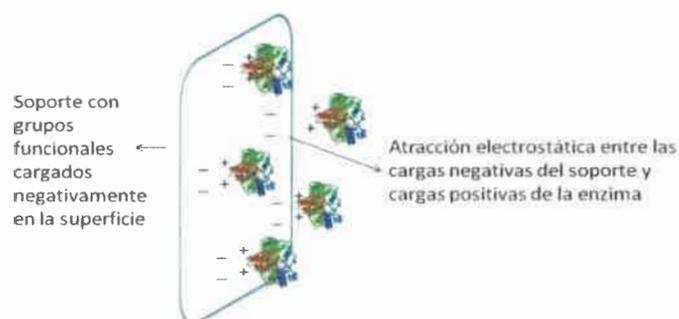


Figura 7: Sistema de inmovilización de enzimas mediante adsorción en soporte de intercambio catiónico. Tomado de Fajardo-Ochoa y col., 2011 con modificaciones.

Este método consiste en poner en contacto a la enzima en solución acuosa con el soporte durante un tiempo dado, luego lavar eliminando la enzima que no fue inmovilizada. Presenta la ventaja de mantener prácticamente intacta la actividad de la enzima, ya que la unión débil no afecta su estructura, pero esta característica hace que al mismo tiempo la unión sea reversible y sensible a cambios de pH y temperatura (Rojas-Melgarejo, 2002; Fajardo-Ochoa y col., 2011)

1.2.7.3. Selección del soporte para la inmovilización

No existe un método universal para inmovilizar enzimas y el método seleccionado debe satisfacer no sólo las necesidades catalíticas (en términos de productividad, selectividad y estabilidad) sino también las no catalíticas (posibilidad de separación y control del proceso) que en gran medida están determinadas por la aplicación que se dará a la enzima inmovilizada (Cao, 2005; Husain y Ulber, 2011; Jiang y col., 2014).

Para poder elegir correctamente un soporte de inmovilización es necesario conocer las características moleculares de la enzima y del soporte en el cual se inmovilizará la misma. Un soporte ideal requiere cumplir con ciertas características:

- Debe presentar una gran superficie para permitir la interacción y unión de la enzima.
- Debe poseer una alta densidad de grupos reactivos en su superficie, los cuales interaccionarán con la enzima para efectuar la inmovilización.
- Los grupos reactivos de la proteína y del soporte deben atraerse mutuamente.
- Los grupos reactivos involucrados en la inmovilización deben ser estables para permitir que la enzima y el soporte se mantengan unidos por largos periodos de tiempo.

Otras propiedades que pueden tenerse en cuenta en la selección son resistencia física a la compresión, hidrofiliidad, ser inerte (para la enzima y sus derivados), resistencia a la contaminación o degradación microbiana y bajo costo (Fajardo-Ochoa y col., 2011).

Por otra parte, las condiciones de inmovilización (tiempo, pH, temperatura, soluciones amortiguadoras empleadas, y la presencia de inhibidores de las enzimas) son críticas para garantizar la unión de la enzima al soporte y la actividad de la enzima inmovilizada (Mateo y col., 2007).

Es de suma importancia considerar para la aplicación de enzimas inmovilizadas en la remediación de aguas de desecho, el costo del material inmovilizante, la disponibilidad de soportes sencillos y de fácil aplicación, la recuperación de la enzima-soporte luego del proceso y la mantención de las propiedades catalíticas y estabilidad de las enzimas (Bolívar y col., 2007; Saidman y col., 2006; Miletic y col., 2012). En todos los casos, resulta importante evaluar el impacto de la inmovilización sobre la cinética enzimática para determinar la factibilidad del sistema para procesos biotecnológicos a pequeña y gran escala (Vojinović y col., 2007; Saidman y col., 2007).

1.2.7.4. Remoción de compuestos fenólicos por peroxidasas inmovilizadas

Se han realizado numerosos estudios de inmovilización, de diferentes peroxidasas que luego se aplicaron para la remediación de contaminantes de aguas o de efluentes (Husain y Ulber, 2011). Entre ellos, se destacan el empleo de la inmovilización sobre soportes de afinidad, como las resinas de intercambio iónico, tal es el caso de DEAE celulosa o carboxi metil sephadex (CMS), que permiten inmovilizar selectivamente grupos de peroxidasas catiónicas (Kulshrestha y Husain, 2006a; 2006b; Dalal y Gupta, 2007). Este tipo de soporte es útil para adsorber tanto peroxidasas parcialmente purificadas como extractos crudos, lo cual facilita el proceso y disminuye los costos de implementación.

Por otra parte, se destaca también la inmovilización mediante la encapsulación de las peroxidasas en alginato de calcio, el cual puede emplearse tanto para enzimas puras como en extractos crudos, y tiene como ventaja adicional la posibilidad de agregar agentes protectores, como PEG, logrando altas eficiencias de remoción de contaminantes (Quintanilla-Guerrero y col. 2008; Almazadeh y Nejati, 2009).

En la tabla 4 se citan algunos estudios recientes en los que se han obtenido resultados positivos en la remoción de compuestos fenólicos por peroxidadas de distintos orígenes, inmovilizadas con diferentes soportes.

Tabla 4: Inmovilización de peroxidadas en diferentes soportes utilizadas para la remoción de compuestos fenólicos

| Peroxidasa | Soporte/Estrategia | Aplicación | referencia |
|---|---|----------------------------------|-----------------------------------|
| HRP | Micelas de SDBS* | Remoción de fenol | Zhang y col., 2012 |
| | Gel de poliacrilamida | Remoción de PCF* | Zhang y col., 2007 |
| | Nanotubos híbridos de quitosano y silicato de aluminio. | Remoción de fenol | Zhai y col., 2013 |
| | Vidrio aminopropilado | Remoción de fenol, 4-CF* y PSA* | Vojinović y col., 2007 |
| | Membranas de ultrafiltración con acetonitrilo, modificadas con NaOH | Remoción de fenol | Vasileva y col., 2009 |
| | Eupergit®C | Remoción de fenol | Pramparo y col., 2010 |
| | Con-A-Sephadex | Remoción de 4-CF | Dalal y Gupta, 2007 |
| | Gel de alginato de calcio | Remoción de fenol | Rojas-Melgarejo y col., 2006 |
| HRP y peroxidasa de <i>Pleurotus</i> | Magnetita | Remoción de anilina | Saidman y col., 2006 |
| HRP y SBP | vidrio aminopropilado | Remoción de fenol | Gómez y col., 2006 |
| SBP | Vidrio | Remoción de fenol | Gómez y col., 2007 |
| SBP | Sílica gel/alginato | Remoción de fenol | Trivedi y col., 2006 |
| <i>Peroxidasa de B. napus</i> | Poliacrilamida | remoción de fenol y naftol | Singh y Singh, 2002 |
| | Cápsulas de alginato de calcio | Remoción de fenol | Regalado y col., 2004 |
| | Gel de alginato de calcio y Affigel 10 | Remoción de compuestos fenólicos | Quintanilla Guerrero y col., 2008 |
| <i>Peroxidasas de Momordica charantia</i> | Con-A-Sephadex | Remoción de fenol y derivados | Akthar y Husain, 2006 |
| <i>Peroxidasa de Raphanus sativus</i> | DEAE-celulosa | Remoción de naftol | Ashraf y Husain, 2010 |

SDBS: dodecyl bencen sulfato sodico; PCF: penta cloro fenol; CF: clorofenol; PSA: fenol-4-ácido sulfónico

1.3. Evaluación de la eficiencia de remediación mediante ensayos de toxicidad

En general, cuando se habla de remediación se evalúa la desaparición de los contaminantes, optimizando las condiciones físico-químicas para dicha reacción. Sin embargo, no siempre se realizan ensayos de optimización de condiciones para la “detoxificación” de los distintos compuestos. Los parámetros ambientales tradicionales, como DQO, DBO y COT son, a menudo, insuficientes para la evaluación de la eficiencia del tratamiento de un efluente, ya que no brindan información sobre la toxicidad de los mismos.

Teniendo en cuenta que, como consecuencia de las reacciones de remoción se forma una mezcla compleja de intermediarios solubles, resulta de gran interés la realización de diferentes test de toxicidad para confirmar o no el efecto “detoxificante”. Por lo tanto, hay un creciente interés por parte de la comunidad científica en estudiar los productos formados y los efectos ecotoxicológicos de la aplicación de distintos procesos para el tratamiento de efluentes o contaminantes específicos (Wagner y Nicell, 2002; Joner y col., 2004; Karci, 2014).

Es recomendable realizar la evaluación de la toxicidad de cada contaminante o efluente y el monitoreo de procesos de remediación mediante test que involucren especies de diferentes niveles tróficos, con el fin de estimar el efecto de la contaminación sobre el ecosistema. Esto es importante debido a que los efectos tóxicos de un compuesto pueden variar en los organismos de acuerdo a la susceptibilidad de los mismos, el tiempo de exposición y la etapa de desarrollo (Greulich y Pflugmacher, 2003; Bohórquez-Echeverry y Campos-Pinilla, 2007, De Nicola y col., 2007).

Actualmente, para detectar la toxicidad de diversas sustancias ambientales, se utilizan test biológicos de toxicidad o bioensayos, que se pueden definir como pruebas en las cuales se evalúan los niveles de toxicidad de determinados agentes tóxicos o mezclas de ellos, sobre organismos vegetales y/o animales. Los bioensayos son actualmente un campo de estudio que se ha expandido rápidamente, involucrando el desarrollo de numerosas técnicas bioanalíticas que pueden ser aplicadas a organismos de distintos niveles tróficos. Son un instrumento alternativo y que complementa a los

tradicionales análisis químicos para la determinación de toxicidad de muestras ambientales.

Algunos de los test que pueden aplicarse son reconocidos por Organismos Internacionales como la US-EPA y han sido estandarizados según normas ISO o IRAM, como por ejemplo: *Lactuca sativa* (Greene y col., 1988; Barrientos y col., 2008), *Pseudokirchneriella subcapitata* (norma ISO 8692 (E), 1989), *Daphnia magna* (ISO 6341, 1996; US-EPA, 1996), *Vibrio fischeri* (norma ISO 11348-3, 1998) o los ensayos que utilizan embriones de anfibios, como es el caso de ANFITOX que utiliza *Rhinella arenarum* (Herkovits y col., 2002; Greulich y Pflugmacher, 2003; Lascano y col., 2009). Además, se han desarrollado numerosos test que pueden ser utilizados para evaluación de ecotoxicidad, toxicidad de medicamentos u otros productos de consumo humano o animal, involucrando distintos organismos, entre ellos vegetales como es el de *Allium cepa*, peces o mamíferos (Schmid, 1975; Venturino y col., 1999; Lyte y Lyte, 2001; Yen y col., 2001; Aoyama y col., 2005; Grisolia y col., 2005; Adbel Migid y col., 2007; OECD, 2014).

En general, los test de toxicidad pueden realizarse en pruebas a campo (*in situ*) o en laboratorio (*ex situ*). De acuerdo a la asiduidad con que se aplica el compuesto tóxico los test pueden denominarse como estáticos, cuando el tóxico se aplica una única vez (no se renueva en el medio del test), semi estáticos, cuando se realiza una renovación periódica del tóxico en el medio de ensayo o de flujo continuo, donde el medio se renueva continuamente. Respecto al tiempo de exposición o etapa de desarrollo del organismo utilizado, se pueden clasificar en test de toxicidad:

- a) Aguda (el período de exposición es corto en relación al tiempo de generación del organismo de prueba),
- b) Subcrónica (el período de exposición cubre, al menos, el 10% del tiempo de generación del organismo de prueba)
- c) Crónicos (el período de exposición cubre, al menos, una generación del organismo de prueba).

Por otra parte, se pueden llevar a cabo otros tipos de estudios, que involucran efectos sobre la reproducción (por ejemplo en mamíferos) o de recuperación de los organismos luego de la aplicación del tóxico en evaluación.

Para poder determinar la toxicidad de una solución es necesario calcular diferentes parámetros, que indican los efectos o respuestas de los organismos. Dichas respuestas pueden ser de letalidad o de efectos subletales. En el caso de que exista mortalidad de los organismos del ensayo frente al compuesto tóxico se calcula la concentración letal que produce distintos porcentajes de letalidad (0 al 100%). La más utilizada para cuantificar y comparar los efectos tóxicos de diferentes compuestos es la concentración letal 50 (CL₅₀), que indica la concentración de la sustancia probada que produce mortalidad del 50% de los organismos ensayados y la concentración mínima no letal (CMNL) con la cual no se produjo mortalidad de los organismos (Díaz-Báez y col., 2004).

Por otra parte, si los efectos obtenidos sobre el sistema biológico son subletales, se utiliza como parámetro la concentración efectiva (CE) que produce efectos (cambios morfológicos, malformaciones, efectos sobre el desarrollo) en distintos porcentajes de los organismos expuestos. De esta forma, se calcula la concentración efectiva 50 (CE₅₀) que produce efectos subletales en el 50% de los organismos (o que afecta en un 50% el desarrollo de los mismos) y la concentración no efectiva (CMNE) es aquella que no produce ningún efecto.

La selección de un organismo adecuado para los bioensayos depende de varios factores, entre los que se encuentran la sensibilidad a tóxicos, su disponibilidad y abundancia, la estabilidad genética y uniformidad en las poblaciones. Otros factores de relevancia son la representatividad de su nivel trófico en la evaluación del riesgo ecológico del contaminante, la facilidad de cultivo y adaptabilidad a las condiciones de laboratorio.

Por otra parte, las características de la muestra ambiental a evaluar es determinante en el tipo de test seleccionado. Distintos grupos de investigadores han realizado monitoreo del medio ambiente utilizando, además de los test de toxicidad, otros tipos de ensayos biológicos para detectar presencia de compuestos genotóxicos o mutagénicos en agua suelo o aire (Grisolia y col., 2005; Júnior y col., 2007; Gana y col., 2008; Hoshina y Marin-Morales, 2009; Liu y col., 2009). Además se han realizado estudios de monitoreo sobre la descarga de efluentes municipales e industriales en ríos o lagos mediante el empleo diferentes bioensayos de toxicidad. Otros investigadores, apuntan a analizar la toxicidad de los componentes potencialmente tóxicos o mutagénicos

que pueden estar presentes en aguas superficiales, efluentes o al monitoreo de procesos de remoción de los mismos utilizando diferentes ensayos biológicos de toxicidad. Estos estudios incluyen el análisis de agroquímicos, compuestos fenólicos y los procesos de degradación de algunos de ellos (Ateeq y col., 2002; Greulich y Pflugmacher, 2003; Chen y col., 2006; Abdel Migid y col., 2007; Keri y col., 2007; Iamarino y col., 2009; Angelini y col., 2011; González y col., 2012; Young y col., 2012).

Algunos bioensayos son útiles para evaluar la contaminación de suelos y aguas, entre ellos el test de germinación y elongación radicular de *L. sativa* (Charles y col., 2011). Este bioensayo presenta una importante ventaja frente a otros, ya que permite evaluar la fitotoxicidad de muestras coloreadas o con elevada turbidez, incluso suelos contaminados de manera directa y sin necesidad de filtración previa o pre-tratamientos, reduciéndose así las interferencias y simplificando el procedimiento, en relación a otras pruebas en las que se utilizan algas o plantas acuáticas sumergidas. Este test también ha sido aplicado para estudios de toxicidad de efluentes y monitoreo de tratamiento de efluentes industriales (Pandard y col., 2006; Bohórquez-Echeverry y Campos Pinilla, 2007; Valerio y col., 2007; Díaz López y col., 2008)

Por su parte, Herkovits y colaboradores, (2002) destacaron el uso de anfibios en el análisis de la toxicidad de muestras tomadas en cauces naturales de aguas y efluentes industriales potencialmente contaminados de la provincia de Buenos Aires. Este test, denominado ANFITOX mostró ser altamente sensible para la detección de compuestos tóxicos presentes en aguas contaminadas, presentando mayor sensibilidad que los test que utilizan peces.

Mediante el empleo de los test de mutagenicidad o genotoxicidad se ha demostrado que muchos ríos de Europa, Asia y Sudamérica están contaminados con compuestos que presentan potente acción genotóxica. Entre estos, se pueden citar los ríos Matanza-Riachuelo, canales de la zona industrial de Ensenada y Berisso (Buenos Aires) y el río Tercero (Córdoba) para lo cual se aplicaron el test de Ames (que utiliza cepas de *Salmonella*), o el de genotoxicidad/citogenicidad, realizados *In vitro* o *in vivo*, mediante la inducción de micronúcleos en organismos acuáticos, roedores, plantas y cultivos celulares (Ohe y col., 2004).

1.3.1. Test de toxicidad utilizando *Rhinella arenarum*

El sapo americano común, *R. arenarum* (anteriormente *Buffo arenarum*, Hensel) (Figura 8) es una especie ampliamente distribuida en Argentina, y tiene la ventaja de haber sido estudiada en forma muy completa desde el punto de vista fisiológico. Al igual que otros anfibios, se encuentra ubicado estratégicamente en las redes tróficas y es altamente sensible al estrés que generan los compuestos químicos que pueden encontrarse contaminando el ambiente (Lascano y col., 2009).



Figura 8: *Rhinella arenarum* macho adulto.

Los embriones de anfibios están naturalmente expuestos a condiciones oxidantes durante su desarrollo y la presencia de contaminantes en el medio acuático puede afectar la normal respuesta antioxidante de los organismos, generando malformaciones durante su desarrollo o efectos letales (Mussi y Calcaterra, 2010; Ferrari y col., 2011).

Su susceptibilidad es fuertemente dependiente del estadio de desarrollo (E), siendo mayor en los estadios embrionarios y larval, períodos en los que su hábitat es acuático (Greulich y Pflugmacher, 2003; Lascano y col., 2009). Debido a esto, los embriones de anfibios han sido empleados como indicadores ambientales de contaminación y en estudios de toxicidad de sustancias puras (Pérez-Coll y Herkovits, 2004 y citas contenidas en él).

ANFITOX es un test semi estático (las soluciones a evaluar deben ser renovadas diariamente) que puede adaptarse para la evaluación de toxicidad aguda, subcrónica y crónica. Esto permite ajustar las condiciones y los tiempos de exposición apropiados a la toxicidad de las muestras a evaluar (Pérez-Coll y

Herkovits, 2004). A este test podemos subdividirlo en ANFIAGU (test agudo de 96 h de exposición), ANFICORT (test crónico corto de 7 días de exposición) y ANFICRO (test crónico de 14 días de exposición). En estos test se emplean generalmente larvas en estadio 25 de desarrollo (E 25), las cuales son expuestas a distintas dosis del contaminante, a fines de obtener los valores de CL_{50} , CMNE y CL_{100} .

La sensibilidad de este test puede también incrementarse utilizando ANFIEMB, que emplea embriones en las primeras etapas de desarrollo (blastómeros de 2 a 4 células), expuestos durante 7 días a la solución a evaluar, lo que permite observar letalidad, y los posibles efectos teratogénicos producidos por el contaminante sobre el desarrollo de los embriones. En la figura 9 se muestran imágenes correspondientes a distintos estadios embrionarios de *R. arenarum*.

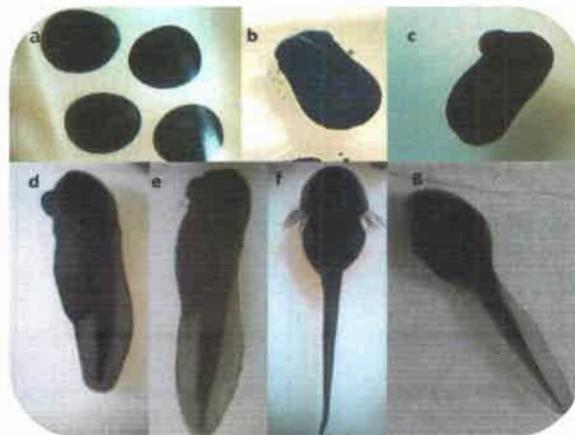


Figura 9: Diferentes estadios del desarrollo embrionario de *R. arenarum*. a) Gástrula tardía (estadio 12); b) Tubo neural (estadio 16); c) Brote caudal (E 17); d) Circulación branquial (E 20); e) Boca abierta (E 21); f) Circulación en la aleta de la cola (E 22); g) Opérculo completo (E 25)

1.3.2. Test de toxicidad y genotoxicidad en ratones

Diferentes ensayos permiten detectar y evaluar los daños en el patrimonio genético provocados por una exposición continua a conocidos o potenciales agentes genotóxicos. Los test de micronúcleos utilizando roedores (generalmente ratones) se han utilizado como método de detección de gran variedad de agentes genotóxicos, como medicamentos, herbicidas o efluentes.

Se trata de un ensayo *in vivo*, de toxicidad aguda, en los cuales los animales son inoculados (intraperitonealmente) o expuestos (por vía oral o respiratoria) al compuesto a evaluar (Schmidt, 1975).

La exposición a un contaminante puede afectar a distintos tejidos o al metabolismo del animal. Incluso, puede producir daños en el ADN de sus células. El test es capaz de detectar la ruptura o pérdida cromosómica (daños clastogénicos o aneugénicos respectivamente) en diferentes células. Esto se puede observar microscópicamente, mediante la formación de micronúcleos en eritrocitos de la médula ósea, los cuales durante su proceso de formación pierden el núcleo, pero no los fragmentos de ADN o cromosomas, que quedan en su citoplasma (Schmidt, 1975; Franco de Diana y col., 1996; Mañas Torres y col., 2006; Molina Jaso y col., 2009).

La utilización de ratones como indicadores de toxicidad permite obtener información adicional sobre el metabolismo de los contaminantes y mecanismos de toxicidad. De esta forma, se pueden monitorear los niveles sanguíneos de las enzimas indicadoras del funcionalismo hepático o renal, o evaluar daños citotóxicos en el tejido hepático (Borzelleca y col., 1985). Sin embargo, es importante tener en cuenta que pueden existir diferencias de susceptibilidad relacionadas al sexo del animal, entre las distintas cepas de ratones, el estado nutricional y/o fisiológico, el tipo de exposición y el agente.

Desde el punto de vista ecológico, estos test brindan una importante información sobre los efectos de los contaminantes en mamíferos.

1.3.3. Test de toxicidad con semillas de *Lactuca sativa*

El bioensayo con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) es un ensayo estático de toxicidad aguda (120 h de exposición), en el que se evalúan los efectos fitotóxicos de un compuesto puro o de una mezcla compleja en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días del crecimiento. Para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la prolongación de la radícula y del hipocótilo (Torres-Rodríguez, 2003).

El fundamento del método se basa en los numerosos procesos fisiológicos que ocurren durante el período de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula. La presencia de una sustancia tóxica puede

interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos. El éxito o aptitud de una plántula para establecerse en un ambiente determinado es relevante para garantizar la supervivencia de la especie, por lo tanto la evaluación del desarrollo de las plántulas constituye un indicador representativo para determinar su capacidad de establecimiento y desarrollo (Torres-Rodríguez, 2003).

En la figura 10 se puede observar una imagen de las semillas de *L. sativa* utilizadas en el test, una placa conteniendo plántulas germinadas sobre papel de filtro y la morfología de una plántula, en donde se señalan el hipocótilo y la radícula de una plántula germinada y con desarrollo normal.

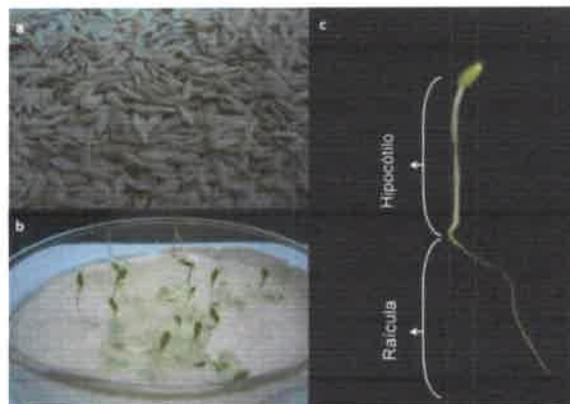


Figura 10: Test de *L. sativa* a) Semillas; b) Plántulas germinadas en placa de petri; c) Morfología de la plántula de *L. sativa*.

La evaluación del efecto en la elongación de las radículas y de los hipocótilos de las plántulas, permite ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en bajas concentraciones, que no son suficientes para inhibir la germinación. Estos compuestos tóxicos pueden retardar o inhibir los procesos de elongación de la radícula o del hipocótilo. De esta manera, la inhibición en la elongación de la radícula e hipocótilo constituyen indicadores de efectos subletales, útiles en la evaluación de efectos tóxicos en vegetales.

Si bien *L. sativa* no es una especie representativa de ecosistemas acuáticos, la información generada a partir de esta prueba de toxicidad proporciona datos acerca del posible efecto de los contaminantes en las

comunidades vegetales cercanas a las márgenes de cuerpos de agua contaminados. Por otra parte, muchas de las reacciones y procesos involucrados son generales para la gran mayoría de las semillas, por lo que la respuesta de esta especie y los datos obtenidos a partir de la aplicación de esta prueba, son en gran medida representativos de los efectos en semillas o plántulas en general (Torres-Rodríguez, 2003).

Cuando se incorpora esta prueba en una batería de bioensayos es importante considerar ciertas ventajas como: la sensibilidad de la especie *L. sativa*, el reducido tiempo de exposición de las semillas, los bajos costos asociados y que no precisa equipamiento sofisticado, además de requerir pequeños volúmenes de muestra, comparado con otros organismos.

1.4. Identificación de los productos obtenidos a partir de la remoción de compuestos fenólicos con peroxidasas

Se ha descrito que, como consecuencia de la reacción de compuestos fenólicos con diferentes peroxidasas, se produce la formación de intermediarios que en general son radicales libres. Estos intermediarios pueden variar de acuerdo a la isoenzima de peroxidasa empleada en la reacción. Posteriormente, gran parte de los mismos, tienden a polimerizar espontáneamente, dando lugar a la formación de polímeros que generalmente precipitan en la solución (Dec y Bollag, 1994). Los fenoles presentan varias alternativas para su polimerización, que involucran principalmente las posiciones *orto* y *para* (Figura 11).

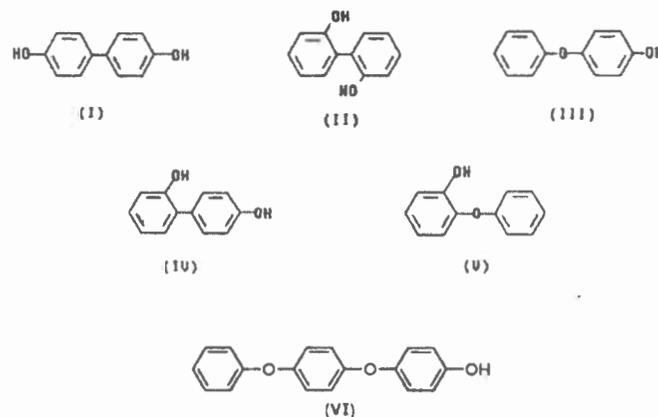


Figura 11: Dímeros y trímeros estables producidos mediante oxidación de fenol con HRP (Extraído de Yu y col., 1994)

El fenol, tendría mayores posibilidades que 2,4-DCF de formar distintos radicales, ya que no tiene grupos sustituyentes bloqueando estas posiciones, pudiendo dar lugar a la formación de una gran variedad de productos como consecuencia de la catálisis mediada por peroxidasa, incluyendo polímeros de bajo peso molecular (Kobayashi e Higashimura, 2003). Por su parte, el 2,4-DCF tendría una sola posición disponible en su anillo fenólico para formar radicales libres y polimerizar. Sin embargo, es factible que por procesos físico-químicos o enzimáticos ocurra la pérdida de los sustituyentes de cloro en una o ambas posiciones, lo que permitiría incrementar el número de posibles especies reactivas (Dec y Bollag, 1994; Antonopoulos y col., 2001; Laurenti y col., 2003; Cheng y col., 2004; Talano y col., 2010). Varios trabajos indican que la oxidación de clorofenoles mediante técnicas físico-químicas y/o por peroxidasa producirían diferentes radicales hidroxilados o quinonas, que luego se condensarían formando distintos dímeros. (Laurenti y col., 2003; Poerschmann y col., 2009). En la figura 12 se describe el posible mecanismo de oxidación y dimerización de 2,4-DCF con HRP propuesto por Laurenti y colaboradores (2003).

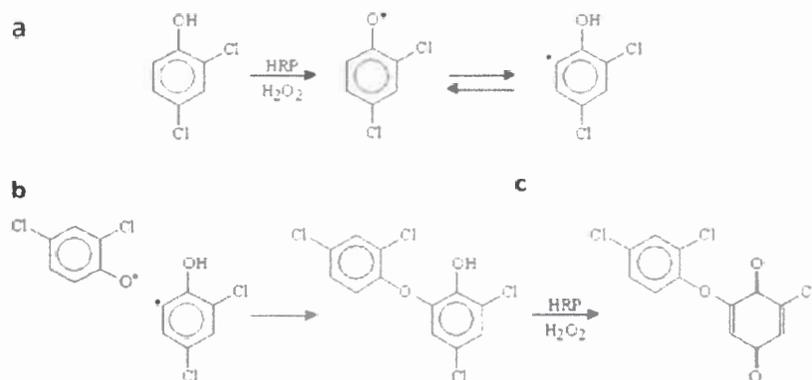


Figura 12: Mecanismo de reacción de oxidación de 2,4-DCF mediado por HRP, propuesto por Laurenti y colaboradores (2003). a) Formación de radicales libres; b) Polimerización espontánea de radicales libres y formación de 2,4-dicloro-6-(2,4-diclorofenoxi)-1,4-benzoquinona; c) Formación de quinona con pérdida de Cl, mediada por HRP, formación de 2-cloro-6-(2,4-diclorofenoxi)-1,4-benzoquinona.

Dentro de las numerosas técnicas utilizadas para estudiar dichos mecanismos podemos señalar a la espectrofotometría como la más ampliamente utilizada para comenzar los análisis de identificación de compuestos químicos. De igual manera, las técnicas electroquímicas, entre ellas la voltamperometría cíclica, permiten la adquisición de información cualitativa acerca de las reacciones de óxido-reducción.

Ambas técnicas presentan un interés particular debido a que son adecuadas para el análisis de la reacción de oxidación de fenol y 2,4-DCF por peroxidasas, lo que permitiría estimar el mecanismo de la reacción mediada por estas enzimas, así como la naturaleza química de los productos obtenidos.

1.4.1. Técnicas espectrofotométricas

El estudio a nivel molecular de cualquier muestra requiere la utilización de técnicas analíticas que permitan su determinación cualitativa y cuantitativa, así como su caracterización físico-química y biológica. La espectroscopía es el estudio de la interacción entre la radiación electromagnética (luz) y la materia, con absorción o emisión de energía radiante (Harris, 2007).

Las moléculas pueden absorber energía luminosa (fotones) y almacenarla en forma de energía interna. Cuando un fotón es absorbido por una molécula se origina un salto desde un estado energético basal o fundamental, S_0 , a un estado de mayor energía (estado excitado), (S_2 o S_3), y sólo se absorberá la energía que permita el salto al estado excitado. Cada molécula tiene una serie de estados excitados que la distingue del resto de las moléculas. Como consecuencia, la absorción que presenta una molécula a distintas longitudes de onda (su espectro de absorción) constituye una señal de identidad, que no cambia de forma con la concentración de la misma (Skoog y col., 2001). Posteriormente, la molécula excitada libera la energía absorbida hasta un estado energético de menor energía (S_1 , S_0 o T), lo cual puede ocurrir por distintos mecanismos, como la fluorescencia, fosforescencia o disipación mediante conversión interna y relajación vibracional, como se muestra en el diagrama de Jablonski (Figura 13).

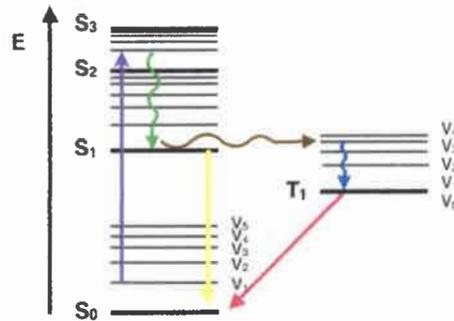


Figura 13: Diagrama de Jablonski (simplificado), procesos físicos que pueden ocurrir cuando una molécula absorbe un fotón de energía y pasa desde su estado basal (S_0) a un estado excitado (S_2 o S_3). S_1 y T_1 son estados excitados de menor energía. Las líneas rectas representan procesos de absorción y liberación de energía radiante, las líneas ondulantes son fenómenos no radiantes. En violeta absorción, en verde conversión interna de la energía, en amarillo regreso a S_0 mediante fluorescencia, en marrón cruce de sistema, azul relajación vibracional y en rosa regreso a S_0 mediante fosforescencia.

Uno de los métodos más sencillos, accesibles, útiles y utilizados en la espectroscopía es la espectroscopía ultravioleta-visible, o espectrofotometría. Por medio de esta técnica se pueden identificar y cuantificar compuestos químicos en solución y en muestras biológicas (Skoog y col., 2001; Harris, 2007). La espectrofotometría es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas para pasar a un estado excitado. Se utiliza radiación electromagnética de las regiones visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (IR) del espectro electromagnético, es decir, longitud de onda entre 380nm y 780nm. La radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas ya que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Además, la absorción de las radiaciones UV, visibles e IR depende de la estructura de las moléculas, y es característica para cada sustancia química (Skoog y col., 2001).

La luz visible o UV es absorbida por los electrones de valencia, éstos son promovidos a estados excitados (de energía mayor). Al absorber radiación electromagnética de una frecuencia correcta, ocurre una transición desde uno de estos orbitales a un orbital vacío. Las diferencias entre energías varían entre

los diversos orbitales. Además, algunos enlaces, como los dobles, provocan coloración en las moléculas ya que absorben energía en el visible así como en el UV. Debido a esto, la espectroscopia UV-visible se utiliza también para identificar algunos grupos funcionales de moléculas.

El análisis espectral se basa en detectar la absorción o emisión de radiación electromagnética a ciertas longitudes de onda y se relacionan con los niveles de energía implicados en una transición cuántica. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma (Harris, 2007).

1.4.2. Técnicas electroquímicas

Las técnicas electroquímicas pueden definirse como el resultado de la combinación entre electricidad y la química, a través de la correlación de parámetros químicos con cantidades cuantificables que derivan de propiedades eléctricas, tales como la corriente, la carga y el potencial eléctrico. Estas técnicas tienen su fundamento en la transferencia de cargas que ocurre cuando dos fases de naturaleza diferente se ponen en contacto. Esto implica la generación de reacciones de oxidorreducción, en la que se pueden diferenciar dos hemirreacciones de transferencia de carga en direcciones opuestas (hemirreacciones de reducción y de oxidación). Esto es lo que ocurre cuando un electrodo entra en contacto con una solución. Si se aplica una diferencia de potencial entre dos electrodos, sumergidos en una solución electrolítica, en uno de los electrodos se favorece una dada reacción (oxidación o reducción) y en el otro la opuesta. Las técnicas pueden emplearse para obtener información sobre la transferencia de cargas del analito de interés o sobre los mecanismos asociados a dichas transferencias electrónicas (Bard, 2001).

Sin embargo, pueden existir fenómenos que modifiquen la superficie del electrodo sin involucrar transferencia de cargas, tales como la adsorción y/o desorción de reactivos o productos de la reacción, los cuales deben tenerse en cuenta ya que pueden afectar el análisis de los resultados obtenidos. En todos los casos es necesario que la corriente generada por estos factores sea determinada mediante un blanco (realizando la experiencia en iguales

condiciones experimentales pero sin la sustancia responsable de la señal electroquímica), y que dicha señal influya lo menos posible en el resultado del análisis (Wang y col., 1992; Bard, 2001).

La implementación de las técnicas electroquímicas implica el manejo de tres variables: potencial (E), corriente (I) y tiempo (t). Por ejemplo, en las técnicas de tipo potencioestáticas se mantiene fijo el valor de E , mientras que la variable I queda libre y evoluciona según las características del sistema electroquímico en estudio. En pruebas de tipo galvanoestáticas se controla I , mientras que E es la variable dependiente. Según la dependencia del tiempo podemos tener procesos electroquímicos estacionarios (las variables E , I y concentración no dependen del tiempo) o no estacionarios (en donde se aplican estímulos que perturban el equilibrio de la reacción, luego el sistema retorna al equilibrio o evoluciona a un nuevo estado estacionario) (Bard, 2001).

Estas técnicas requieren al menos dos electrodos (conductores) y una solución electrolítica en contacto entre ellos, constituyendo de esta manera una celda electroquímica. Es común el uso en estas celdas de tres tipos de electrodos:

- Electrodo de trabajo, en el cual ocurren las hemirreacciones de interés.
- Electrodo auxiliar o contraelectrodo, encargado de cerrar el circuito eléctrico y permitir el pasaje de la corriente eléctrica. En él ocurren las hemirreacciones complementarias.
- Electrodo de referencia, encargado de proveer un potencial estable y reproducible, comparado contra el potencial del electrodo de trabajo.

Durante la determinación electroquímica, el potencial de trabajo es mantenido en un valor constante respecto al electrodo de referencia, lo cual se realiza mediante un potencioestado. La aplicación de los distintos potenciales de trabajo se realiza mediante un generador de funciones, mientras que los datos son obtenidos mediante un registrador (Skoog y col., 2001). En la figura 14 se muestra un diagrama de bloques del circuito básico usado en estas técnicas:

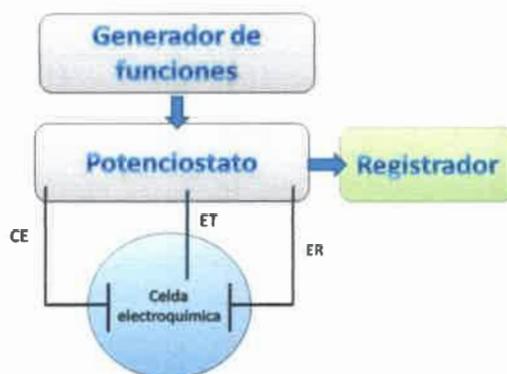


Figura 14: Circuito básico utilizado en las técnicas electroquímicas (Extraído de Granero, 2009). ET: electrodo de trabajo; CE: contraelectrodo; ER: electrodo de referencia.

1.4.2.1. Voltamperometría cíclica

La voltamperometría abarca un grupo de métodos electroanalíticos, en los que la información sobre el compuesto químico de interés se deduce de la medida de intensidad de corriente en función del potencial aplicado.

Es muy utilizada, principalmente como herramienta para dilucidar los mecanismos de reacción de los procesos electroquímicos en diferentes medios, los procesos de adsorción sobre superficies, los mecanismos de transferencias de electrones en superficies de electrodos químicamente modificados y para medir la concentración de especies químicas en solución. (Bard, 2001; Skoog y col., 2001)

Dentro de las técnicas voltamperométricas pueden distinguirse dos grupos principales:

- De variación lineal del potencial aplicado (voltamperometría cíclica y lineal)
- De variación de potencial en forma de pulsos (voltamperometrías de pulso normal, de pulso diferencial y de onda cuadrada)

La voltamperometría cíclica es ampliamente utilizada en la adquisición de información cualitativa de reacciones electroquímicas. El poder de la misma resulta en la habilidad de proveer rápidamente información sobre la termodinámica de los procesos redox y la cinética de las reacciones de transferencia electrónica y sobre reacciones químicas acopladas o procesos de

adsorción. La voltamperometría cíclica es a menudo una de las primeras metodologías llevadas a cabo en un estudio electroquímico. En particular, ella ofrece una rápida localización de los potenciales redox de las especies electroactivas, permitiendo estimar los grupos funcionales involucrados en la reacción de óxido-reducción (Granero y col., 2010; Ramírez y col., 2010; Tesio y col., 2011).

En la voltamperometría cíclica, la región del potencial de trabajo se recorre desde un valor de voltaje inicial hasta un valor final y, al llegar a éste, se invierte el sentido del barrido, dando como resultado la forma de la onda aplicada, que es triangular. El barrido puede realizarse en sentido anódico o catódico dependiendo de la información requerida. Durante el barrido el potenciostato mide la corriente resultante de acuerdo al potencial aplicado, obteniéndose un gráfico, o voltamperograma cíclico (VC), que está formado por picos, uno por cada especie existente en la muestra y que requieren una adecuada interpretación (Bard, 2001).

Hipótesis y Objetivos

2. Hipótesis y objetivos

2.1. Hipótesis

En la presente tesis se plantearon las siguientes hipótesis de trabajo:

Hipótesis I:

Las peroxidasas presentes en las raíces transformadas de distintas especies vegetales participan en la remoción de compuestos fenólicos en soluciones acuosas.

Hipótesis II:

Las peroxidasas, aisladas de tejidos vegetales, pueden ser protegidas con diferentes compuestos o inmovilizadas en distintos soportes, lo que permite aumentar la eficiencia para su aplicación en la remediación de aguas contaminadas.

Hipótesis III:

La determinación de la biotoxicidad/genotoxicidad de los productos formados durante el proceso de remediación, así como el estudio de su naturaleza química, contribuyen a determinar la inocuidad de las soluciones potencialmente detoxificadas y establecer si esta tecnología es adecuada para la eliminación de compuestos fenólicos.

2.2. Objetivo general

Estudiar metodologías alternativas para la remediación de soluciones contaminadas con compuestos fenólicos mediante el uso de extractos totales de peroxidasas provenientes de cultivos de raíces transformadas de distintas especies vegetales; libres o inmovilizados sobre diferentes soportes. Analizar la biotoxicidad/genotoxicidad y estimar la naturaleza química de los compuestos formados post-remoción para determinar la aplicabilidad del proceso a la descontaminación de aguas.

2.2.1. Objetivos específicos

1- Seleccionar extractos enzimáticos de peroxidasas, a partir de cultivos de raíces transformadas de diferentes especies vegetales, que resulten eficientes para la remoción de compuestos fenólicos (fenol, 2,4-DCF).

2- Caracterizar el proceso de remoción enzimática en soluciones conteniendo agentes protectores o diferentes aditivos (detergentes, solventes y compuestos iónicos) que pueden estar presentes junto a compuestos fenólicos en aguas contaminadas.

3- Evaluar comparativamente la remoción de compuestos fenólicos utilizando peroxidasas libres e inmovilizadas sobre diferentes soportes.

4- Analizar la toxicidad de los productos formados en el proceso de remoción mediante diferentes test de biotoxicidad y/o genotoxicidad.

5- Estudiar las soluciones post-remoción, mediante técnicas analíticas, para dilucidar su composición y estimar la naturaleza química de los productos formados.

Materiales y Métodos

3. Materiales y métodos

3.1. Material vegetal

Se utilizaron cultivos *in vitro* de raíces transformadas obtenidos por infección con *Agrobacterium rhizogenes* cepa LBA 9402, a partir de explantos de hojas de nabo (*Brassica napus*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*). Las raíces transformadas fueron mantenidas mediante subcultivos sucesivos cada 25-30 días en condiciones de esterilidad en medio de Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) líquido suplementado con una solución stock de vitaminas, según Agostini y colaboradores (1997), en agitador orbital a 100 r.p.m., en oscuridad y a 25-27°C (Tabla 5). Se empleó como inóculo de raíces una pequeña fracción de la zona periférica (tejido en crecimiento).

Tabla 5. Formulación del medio de cultivo de Murashige y Skoog

| Macroelementos | | Microelementos | |
|--------------------------------------|----------|---|--------------------------|
| NH ₄ NO ₃ | 20,63 mM | MnSO ₄ | 0,1 mM |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 2,99 mM | ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0,03 mM |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 1,50 mM | CuSO ₄ .5H ₂ O | 1.10 ⁻⁴ mM |
| KNO ₃ | 18,81 mM | KI | 5.10 ⁻³ mM |
| KPO ₄ H ₂ | 1,25 mM | CoCl ₂ .6H ₂ O | 1,05.10 ⁻⁴ mM |
| | | H ₃ BO ₃ | 0,1 mM |
| | | FeSO ₄ .7H ₂ O | 0,1 mM |
| | | Na ₂ EDTA.3H ₂ O | 0,1 mM |
| | | Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 1,03.10 ⁻³ mM |

3.2. Obtención de extractos crudos totales a partir de cultivos de raíces transformadas de diferentes especies

A partir de cultivos de raíces transformadas de tabaco se realizaron homogenatos con solución amortiguadora de acetato de sodio/ácido acético 50 mM, pH 5, conteniendo KCl 1M, en proporción 1:3 (una parte de material vegetal/tres partes de solución amortiguadora) de acuerdo a la técnica descrita para tabaco por Sosa-Alderete (2009). Para extraer las peroxidasas de homogenatos de nabo se utilizaron las condiciones descritas como óptimas por Agostini y col., (2003). Para ello se utilizó solución amortiguadora de

acetato de sodio/ácido acético 50 mM, pH 4, conteniendo NaCl 1M, en proporción 1:4.

Las muestras así homogeneizadas se centrifugaron a 5000 rpm 30 min. El sobrenadante constituyó el extracto crudo total de peroxidasas (ECT).

3.3. Determinación cualitativa de actividad peroxidasa

Se utilizó una solución compuesta por bencidina 3,8 mM (en solución alcohólica al 50% V/V) y H₂O₂ 21 mM en solución amortiguadora acetato de sodio/ácido acético 0,5 M, de pH 4,6, (de Forchetti y Tigier, 1990). La presencia de peroxidasas en una muestra dada se evidenció mediante la aparición de un producto azul.

3.4. Determinación cuantitativa de actividad peroxidasa

3.4.1. Utilizando o-dianisidina como sustrato

La actividad peroxidasa total de los diferentes extractos crudos se determinó por método espectrofotométrico continuo siguiendo el aumento de absorbancia a 470 nm como resultado de la aparición de un producto coloreado originado por la oxidación de o-dianisidina (bis (3,3'-dimetoxi-4-amino) azobifenilo) ($\epsilon = 11,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) con H₂O₂ a 35° C (Gaspar y col., 1982) utilizando un espectrofotómetro Beckman 640.

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: 0,63 mM de o-dianisidina y 0,28 mM de H₂O₂ en solución amortiguadora acetato/acético 0,1 M de pH 5,5.

La determinación de la actividad peroxidasa de los ECT obtenidas a partir de los cultivos de raíces transformadas se realizó midiendo el incremento de la absorbancia a 470 nm cada 10 segundos durante el transcurso de 1 minuto.

3.4.2. Utilizando guayacol como sustrato

Se determinó actividad peroxidasa total en los diferentes ECT por método espectrofotométrico continuo siguiendo el aumento de absorbancia a 470 nm como resultado de la aparición de un producto coloreado originado por la oxidación de guayacol (metoxifenol) ($\epsilon = 5570 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) con H₂O₂ a 35° C,

utilizando un espectrofotómetro Beckman 640. La mezcla de reacción se realizó con 0,6 mM de H₂O₂ y 1 mM de guayacol de acuerdo a la técnica descrita por Maehly y Chance (1954). La determinación de la actividad peroxidasa de los ECT obtenidas a partir de los cultivos de raíces transformadas de nabo y tabaco, se realizó midiendo el incremento de la absorbancia a 470 nm cada 10 segundos durante el transcurso de 1 minuto.

Se analizaron las condiciones óptimas para la determinación de actividad peroxidasa, variando alternativamente la concentración de H₂O₂ entre 0,33 y 3,96 mM y la de guayacol entre 0,1 y 0,6 mM.

Para el análisis de actividad peroxidasa de ECT inmovilizados sobre resinas de intercambio iónico se determinó la absorbancia al finalizar 2 minutos de reacción.

3.5. Análisis del perfil de peroxidasas mediante electroforesis por isoelectroenfoque (IEF)

Se realizaron isoelectroenfoques verticales utilizando un equipo BioRad Mini Protean III; en minigeles de poliacrilamida al 7,5%, diseñados para separar proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico (pI) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cada gel se preparó de la siguiente manera:

| | |
|---------------------------------------|---------|
| Agua | 2,6 ml |
| Acrilamida / bis acrilamida (30:1) | 1,33 ml |
| Glicerol 50% | 1 ml |
| Anfolito, rango 3-10 | 66 µl |
| Persulfato de amonio 14% P/V | 25 µl |
| N,N,N',N'-tetrametilendiamida (TEMED) | 9,5 µl |

La solución se vertió sobre el soporte armado previamente. El gel se dejó polimerizar a la luz durante 90 minutos y se mantuvo durante 12 h en heladera para su maduración.

Previo a la siembra, las muestras fueron diluidas al 50% con solución conteniendo 100 µl de anfolito 3-10, 680 µl de glicerol 87% V/V y agua destilada c.s.p. 1000 µl, con el fin de incrementar su densidad.

Se sembraron 2,5 µl de testigo calibrador de pl comercial (BioRad) en una de las calles del gel.

Se utilizaron dos soluciones para efectuar la corrida electroforética: solución de NaOH 25 mM y solución de ácido acético 20 mM.

La corrida electroforética se realizó a voltaje constante (200 voltios) durante aproximadamente 90 minutos.

Para colorear las proteínas marcadoras del testigo se utilizó una solución de croceína escarlata al 27% P/V.

El revelado de peroxidasas se realizó con una solución hidroalcohólica al 50% V/V de bencidina 3,8 mM, H₂O₂ 21 mM en acetato de sodio/ ácido acético 0,5 M de pH 4,6 a temperatura ambiente hasta la aparición de bandas azules. Se enjuagó luego el gel con agua destilada (de Forchetti y Tigier, 1990).

3.6. Inmovilización de peroxidasas de ECT

Para la inmovilización de las peroxidasas de los ECT se seleccionaron la resina de intercambio iónico CM-Sephadex (CMS) y la encapsulación en alginato de calcio.

3.6.1. Inmovilización en resinas de intercambio iónico

Se evaluó la capacidad de inmovilización de la resina de intercambio iónico CMS.

Se hidrataron 6 gr de CMS con 750 ml de solución amortiguadora NaPO₄H₂/Na₂PO₄H 10 mM de pH 6,5, durante 12 h con agitación suave y refrigeración. Luego se realizaron 3 a 4 lavados con la misma solución amortiguadora, dejando decantar y descartando el sobrenadante, con el fin de eliminar impurezas y componentes solubles presentes en la misma. Por último, se dejó decantar a 4°C durante 24 h, se eliminó el sobrenadante, y la resina decantada se pesó en otro vaso de precipitado.

Se separaron 10 gr de resina y se agregó 4 ml de ECT Tab o ECT N, manteniendo en agitación a 4° C durante 24 h. El sobrenadante obtenido contendría las peroxidasas excedentes o no unidas a la resina. Se realizaron dos nuevos lavados de la resina con la solución amortiguadora de baja fuerza iónica y se conservó en refrigeración (4° C) hasta su utilización.

3.6.2. Encapsulación en alginato de calcio

Se utilizaron diferentes concentraciones de ácido algínico (entre 12 a 25 mg por ml de agua o ECT) y de CaCl₂ (100 a 500 mM). Se observó la forma y estabilidad de las cápsulas obtenidas. Estas fueron separadas en grupos que se conservaron en diferentes condiciones de temperatura y humedad (en agua, en placa seca o en cámara húmeda a 4 y 25° C) durante 72 h.

Otro grupo de cápsulas, conservadas en condiciones de humedad durante 24 h, se utilizaron para las reacciones de remoción y determinación de actividad peroxidasa con *o*-dianisidina o guayacol como sustratos.

3.7. Ensayos de remoción

3.7.1. Remoción de 2,4-DCF con ECT

Se realizaron los ensayos en erlenmeyer de 50 ml con 20 ml de solución conteniendo 25 mg/l de 2,4-DCF, 0,5 mM de H₂O₂ y agregando el volumen de extracto de peroxidasas (ECT obtenidos a partir de los diferentes cultivos) necesario para lograr 200 U/ml de peroxidasa. Dicha actividad se determinó con *o*-dianisidina como sustrato. La reacción de remoción se realizó en oscuridad, con agitación orbital a 100 r.p.m., a 25 ± 2°C durante el período de una hora. Posteriormente las soluciones se mantuvieron en refrigeración a 4° C hasta realizar los análisis correspondientes. Los ensayos de remoción se efectuaron en, por lo menos, tres repeticiones independientes, cada una por triplicado. Luego de finalizada cada reacción se determinó la concentración de compuestos fenólicos remanentes en el medio y en las soluciones control, como se describirá más adelante.

Para evaluar la participación de fenómenos no enzimáticos que podrían estar asociados a la desaparición de los compuestos fenólicos, se realizó un control sin agregado de enzima, que se incubó durante el mismo periodo de la reacción.

La eficiencia de remoción se expresó como el porcentaje de remoción del compuesto fenólico, considerando como 100% la concentración inicial del mismo en la mezcla de reacción.

3.7.2. Remoción de fenol con ECT

Se realizaron los ensayos en erlenmeyer de 50 ml con 20 ml de solución conteniendo 10 y 25 mg/l de Fenol, agregando H₂O₂ (en concentraciones comprendidas entre 0,1 y 1 mM) y ECT (entre 200 y 2000 U/ml de peroxidasa determinadas con *o*-dianisidina como sustrato). La reacción se llevó a cabo en las mismas condiciones detalladas anteriormente para 2,4-DCF.

La eficiencia de remoción se expresó como el porcentaje de remoción del compuesto fenólico, considerando como 100% la concentración inicial del mismo en la mezcla de reacción.

3.7.3. Ensayos de remoción utilizando aditivos

Se realizaron las reacciones de remoción de fenol y 2,4-DCF de la forma descrita en los incisos anteriores, agregando al medio de reacción los siguientes compuestos, previamente a la adición de las enzimas:

- Dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,1 %
- Dimetilformamida (DMF) al 20%.
- CO₃HNa 25 mM
- NiCl₂ 0,5 mM
- CuCl₂ 0,12 mM

Al finalizar los ensayos se evaluaron las eficiencias de remoción, como se describió anteriormente.

3.7.4. Ensayos de remoción de 2,4-DCF y fenol con enzimas inmovilizadas en resinas de intercambio catiónico

Se realizaron los ensayos en erlenmeyer de 250 ml conteniendo: 100 ml de solución 25 mg/l de 2,4-DCF, 0,5 mM de H₂O₂ y agregando 2 g/100 ml de enzima inmovilizada o 10 mg/l de fenol, 1 mM de H₂O₂ y agregando 4 g/100 ml de enzima inmovilizada. La reacción de remoción se realizó en oscuridad, con agitación orbital a 100 r.p.m., a 25 ± 2°C durante el período de una hora. Posteriormente las soluciones se mantuvieron en refrigeración a 4° C hasta realizar los análisis correspondientes. Los ensayos de remoción se efectuaron, por lo menos, en dos repeticiones independientes, cada una por duplicado.

Luego de finalizada cada reacción se determinó la concentración de compuestos fenólicos remanentes en el medio y en las soluciones control, como se describirá más adelante.

Para evaluar la implicancia de fenómenos no enzimáticos que podrían estar asociados a la desaparición de los compuestos fenólicos, se realizó un control agregando igual cantidad de la resina sin enzima que se incubó durante el mismo periodo de la reacción.

3.7.5. Ensayos de remoción de 2,4-DCF y fenol con enzimas inmovilizadas en alginato de calcio

Se realizaron los ensayos en erlenmeyer de 50 ml conteniendo 20 ml de solución 25 mg/l de 2,4-DCF, 0,5 mM de H_2O_2 y agregando 2 cápsulas de enzima inmovilizada o con 10 mg/l de fenol, 1 mM de H_2O_2 y agregando 6 cápsulas de enzima inmovilizada (actividad peroxidasa aproximada de 200 y 600 U/ml respectivamente). La reacción de remoción se realizó en las mismas condiciones detalladas anteriormente.

Para evaluar el efecto de PEG-3350 en la remoción de peroxidasas inmovilizadas en alginato de calcio se agregó 100 mg/ml al ECT antes de la encapsulación.

Para evaluar la participación de fenómenos no enzimáticos que podrían estar asociados a la desaparición de los compuestos fenólicos, se realizó un control agregando igual cantidad del soporte sin enzima que se incubó durante el mismo periodo de la reacción.

3.8. Determinación de compuestos fenólicos residuales

La cantidad residual de fenol o 2,4-DCF presente en las mezclas de reacción luego del periodo de incubación de los distintos ensayos fue cuantificada por un método colorimétrico. Para ello se colocó en un tubo de ensayo la siguiente mezcla de reacción: 5 ml de la solución post-remoción, 25 μ l de 4-amino antipirina 0,10 M, 25 μ l de NH_4OH 6 M, 50 μ l de ferricianuro de potasio 0,24 M y 2,5 ml de cloroformo (Klibanov y col., 1980; Dec y Bollag, 1994).

Antes de cada paso se agitó con vortex cada tubo con el objetivo de homogeneizar los reactivos. Finalmente, se retiró la fase acuosa (sobrenadante) y se procedió a medir la absorbancia a 510 nm de la solución clorofórmica, donde están presentes los fenoles residuales, utilizando un espectrofotómetro Beckman 640.

3.9. Ensayos de toxicidad

3.9.1. Evaluación de toxicidad utilizando larvas de *Rhinella arenarum*

3.9.1.1. Estudio de toxicidad aguda

Se realizó el test de acuerdo a la metodología utilizada por Pérez-Coll y Herkovits, (1999a y 1999b). Se utilizaron 10 larvas en estadio 25 (E 25) de desarrollo, que se colocaron en placas de petri conteniendo las soluciones a ensayar (soluciones post-remoción de 2,4-DCF obtenidas con ECT Tab y ECT N libres o inmovilizadas con alginato de calcio, diluciones 1/2, 1/5, 1/10, 1/15 y 1/30 de las mismas), utilizando como control agua destilada. El pH de las soluciones post-remoción se determinó mediante tiras reactivas SIGMA. Las soluciones se renovaron cada 24 h durante un periodo de 120 h en cada uno de los diferentes tratamientos. Se registró el número de larvas muertas por día por cada placa de cada tratamiento. Cada tratamiento se realizó por triplicado, en tres repeticiones independientes y a temperatura ambiente.

3.9.1.2. Análisis de teratogénesis

Se realizó la fecundación y se efectuó el test de acuerdo a la metodología descrita por Pérez-Coll y Herkovits, (1999a y 1999b). Se utilizaron 10 óvulos fecundados de *Rhinella arenarum* que se colocaron en placas de petri conteniendo las soluciones a ensayar (soluciones post-remoción de 10 mg/l de fenol obtenidas con ECT Tab y ECT N) y solución control (Ringer). Las soluciones se renovaron cada 24 h durante un periodo de 120 h en cada uno de los diferentes tratamientos. Se realizó diariamente la observación mediante lupa del estado de las larvas en desarrollo de cada

placa de cada tratamiento. Cada tratamiento se realizó por triplicado a temperatura ambiente.

3.9.2. Evaluación de toxicidad y genotoxicidad en ratón

Se utilizaron ratones Balb-C de 6 semanas de edad, de acuerdo a la técnica descrita por Schmidt (1975). Se dividió a los animales en 5 lotes, de seis individuos cada uno (3 machos y 3 hembras):

- Lote 1: control sin tratamiento alguno.
- Lote 2: Grupo al que se administró por vía oral (como bebida) durante 7 días solución conteniendo 25 mg/l de 2,4-DCF.
- Lote 3: Grupo al que se administró por vía oral (como bebida) durante 7 días solución conteniendo 4 mg/l de 2,4-DCF
- Lote 4: Grupo al que se administró por vía oral (como bebida) durante 7 días solución post-remoción obtenida con ECT N.
- Lote 5: Grupo al que se administró por vía oral (como bebida) durante 7 días solución post-remoción obtenida con ECT Tab.

Se registró el consumo diario de solución por los ratones hembras o machos correspondientes a cada tratamiento. Luego del mismo los animales fueron pesados y sacrificados mediante decapitación, extrayendo de cada uno sangre (para los análisis bioquímicos), el hígado (para el estudio histopatológico) y ambos fémures (para el test de micronúcleos en eritrocitos de medula ósea).

3.9.2.1. Análisis bioquímico de sangre de ratón

El análisis se realizó mediante la utilización de reactivos comerciales (laboratorios Wiener) de uso clínico para determinación de creatinina, urea y glutámico-pirúvico transaminasa (GPT) en suero, siguiendo las metodologías propuestas por los fabricantes.

3.9.2.2. Análisis histopatológico de tejido hepático de ratón

Los hígados de los ratones fueron extraídos cuidadosamente y colocados en frascos de vidrio de 5 ml conteniendo una solución de formol (4%). El

análisis fue realizado como servicio por el personal de la cátedra de Patología Animal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la UNRC.

3.9.2.3. Test de micronúcleos en medula ósea de fémur de ratón

Se distribuyó 1,5 ml de suero fetal bovino estéril (SFB) en tubos de hemólisis o de Khan, (1 para cada animal). Se separó cuidadosamente con bisturí los fémures y las tibias, despojándolos de las epífisis y los músculos circundantes y cortando los extremos de cada hueso con un corte neto. Posteriormente se extrajo la medula ósea con una jeringa conteniendo una fracción de SFB y se transfirió a un tubo de centrifuga. Las células de la medula ósea deben permanecer en el suero como una fina suspensión y no formar gruesas partículas, por lo cual se homogeneizó suavemente utilizando una pipeta tipo pasteur. Se centrifugaron los tubos conteniendo la medula ósea a 1000 r.p.m./min por 5 minutos, el sobrenadante se removió cuidadosamente, reservando el botón (formado por las células) al cual se agregó 2 gotas de SFB para su resuspensión.

Se realizaron los preparados celulares mediante un extendido sobre portaobjetos limpios y rotulados, dejando secar la preparación al aire durante 24 h. Se fijaron los extendidos mediante flameo suave y se tiñó durante 3 minutos con solución May-Grünwald sin diluir. A continuación, se tiñó por otros 2 minutos con colorante May-Grünwald diluido con agua destilada (1:1). Luego se coloreó por 10 minutos con Giemsa diluido con agua destilada 1:6. Se lavó con agua destilada y se dejó secar.

En cada preparado se contaron 1000 eritrocitos policromáticos (eritrocitos inmaduros que han perdido el núcleo principal recientemente), registrando el número de estas células que presentaron micronúcleos.

3.9.3. Ensayo de toxicidad aguda en semillas de *Lactuca sativa*

Se utilizaron semillas de *Lactuca sativa* variedad mantecosa obtenidas en INTA (Estación La Consulta, Mendoza). Se colocaron 20 semillas en cápsulas de petri conteniendo papel de filtro en condiciones de asepsia. Se agregó en cada cápsula 5 ml de la solución problema, realizando esta operación por triplicado. Se mantuvieron a 25° C en oscuridad durante 120 h. Al finalizar este

periodo se realizó el recuento de las semillas germinadas y se determinó la longitud de la radícula y el hipocótilo de cada plántula, en cada cápsula de petri correspondiente a cada tratamiento. En base a los datos registrados se calcularon los porcentajes de germinación relativa de las semillas (GR) y longitud relativa de radículas (LRR) e hipocótilos (LRH), a partir de los cuales se determinó el índice de germinación (IG) (Barrena y col., 2009).

$$GR = \frac{\text{semillas germinadas en solución problema}}{\text{semillas germinadas en agua}} \times 100$$

$$LRR = \frac{\text{media de longitud de radícula en solución problema}}{\text{media de longitud de radícula en agua}} \times 100$$

$$LRH = \frac{\text{media de longitud de hipocótilo en solución problema}}{\text{media de longitud de hipocótilo en agua}} \times 100$$

$$IG = \frac{GR \times LRR}{100}$$

3.10. Estimación de la naturaleza química de los productos de remoción de fenol y 2,4-DCF

3.10.1. Determinaciones espectrofotométricas

Las medidas se realizaron empleando un espectrofotómetro UV-Visible Hewlett Packard, modelo HP 8453, con celdas de cuarzo de 1 ml de capacidad y un camino óptico de 1 cm.

Se realizaron barridos de longitud de onda entre 240 y 515 nm de las soluciones control (agua bidestilada, 25 mg/l de 2,4-DCF, 10 mg/l de fenol, 200 y 1000 U/ml de peroxidasa de los ECT) y de la mezcla de reacción a 1, 24 y 48 h de incubación.

Los estudios cinéticos de la remoción se realizaron directamente en el interior de la celda de cuarzo de 3 ml de capacidad, y se determinaron los

cambios en el espectro de absorción de la mezcla en periodos de un minuto durante una hora.

Una vez determinado el pico de absorción correspondiente a los productos de reacción de 2,4-DCF por los ECT, se realizó un seguimiento de los cambios de densidad óptica producidos durante la remoción a la longitud de onda seleccionada, (252 nm) en periodos de un minuto, durante una hora.

3.10.2. Determinaciones electroquímicas

Las determinaciones electroquímicas mediante voltamperometría cíclica se realizaron en una celda de vidrio con tres electrodos. Como electrodo de trabajo se empleó un disco de carbono vítreo (diámetro 3,0 mm, área 0,0707 cm²). El contraelectrodo fue de platino, con un área aproximada de 2 cm². Como electrodo de referencia se utilizó uno de calomel saturado.

El electrodo de trabajo fue sometido a pulido con polvo de alúmina 0,05 µm, enjuagado con abundante agua (Sintorgan, calidad HPLC) y posteriormente fue sonicado en un baño de agua de la misma calidad durante 2 minutos, de acuerdo a la metodología descrita por Granero, 2009.

Las soluciones blanco utilizadas fueron:

- NaCl 0,1 M
- Soluciones de ECT de 200 - 1000 U/ml de peroxidasa con 0,1 M de NaCl.
- Soluciones de ECT de 200-1000 U/ml de peroxidasa con 0,1 M de NaCl y 0,5-1 mM de H₂O₂.

Las soluciones evaluadas fueron:

- Solución 10 mg/l de fenol
- Solución 25 mg/l de 2,4-DCF
- Soluciones post-remoción de fenol y 2,4-DCF obtenidas con ECT Tab y ECT N de 1, 24, 48 y 72 h de incubación.

Las medidas electroquímicas se realizaron empleando el potenciostato Autolab PGSTAT 10, con su correspondiente software incorporado.

3.4. Análisis estadísticos

La media y los errores estándar de los distintos parámetros evaluados fueron calculados y representados gráficamente mediante el programa Microsoft Excel 2007.

Para determinar diferencia estadística entre al menos un par de medias, se utilizó la prueba de análisis de la varianza (ANOVA), y para determinar cuáles de ellas presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto del control se aplicó la prueba de Dunnett, con un nivel de significación en ambos casos de 0,05. El programa estadístico empleado fue Statgraphics Plus versión 4.0. Las concentraciones letales o inhibitorias medias (CL_{50} y CI_{50} respectivamente) para los test de toxicidad de *L. sativa* y *R. arenarum* se calcularon usando el programa Probit versión 1.4.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Obtención y caracterización de extractos crudos totales de peroxidasas de raíces transformadas de tabaco y nabo

Se obtuvieron extractos crudos totales (ECT) a partir de cultivos de raíces transformadas de tabaco (Tab) y nabo (N), de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos y se determinó la actividad peroxidasa de cada uno de los extractos utilizando *o*-dianisidina (*o*-D) como sustrato reductor (Tabla 6).

Estos ECT se obtuvieron con la finalidad de utilizarlos posteriormente en los ensayos de inmovilización enzimática.

Tabla 6: Actividad peroxidasa (%), con *o*-D como sustrato, de ECT de raíces transformadas de tabaco (Tab) y nabo (N).

| Actividad peroxidasa de ECT de raíces transformadas (U/ml .10 ³) | |
|--|-------------|
| Extracto | Actividad |
| ECT Tab | 125,1 ± 7,0 |
| ECT N | 158,0 ± 6,6 |

Ambos ECT mostraron elevada actividad peroxidasa, siendo mayor en ECT N que en ECT Tab.

A fin de caracterizar cada uno de los extractos, se realizaron isoelectroenfoques (IEF). Como se muestra en la figura 15, se obtuvieron los perfiles de isoformas de peroxidasa y se determinó el punto isoeléctrico (pI) de las isoformas mayoritarias.

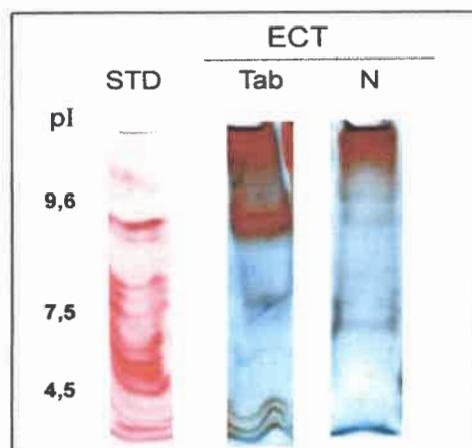


Figura 15: Perfil electroforético obtenido por IEF de las isoformas de peroxidasa de ECT Tab y N. pI: punto isoeléctrico; STD: Estándar de pI

Los perfiles de peroxidasas de ambos ECT fueron diferentes. Sin embargo, tanto en el ECT Tab como en el ECT N, se observó la predominancia de isoformas básicas, con pI mayor o igual a 9,6. También se observaron bandas menos intensas correspondientes a isoformas ácidas (pI menores a 4,5), y a un grupo de peroxidasas con pI cercano a la neutralidad (pI 6 y 7,5).

4.2. Ensayos de remoción con ECT Tab y N

4.2.1. Remoción de 2,4-DCF

Se evaluó comparativamente la eficiencia de remoción de 2,4-DCF por las peroxidasas de ambos extractos crudos en estudio, aplicando condiciones óptimas determinadas previamente en nuestro laboratorio. Para ello se utilizaron soluciones conteniendo 25 mg/l de 2,4-DCF y 0,5 mM de H_2O_2 . La reacción de remoción se realizó utilizando 200 U/ml de peroxidasas de cada ECT, actividad que se determinó con *o*-D. Las soluciones obtenidas en dichas condiciones fueron denominadas como post-remoción (PR).

Con el fin de analizar el tiempo de reacción que se requiere para lograr la remoción total del contaminante, se evaluó la eficiencia de remoción luego de 1 y 24 h de incubación (Figura 16).

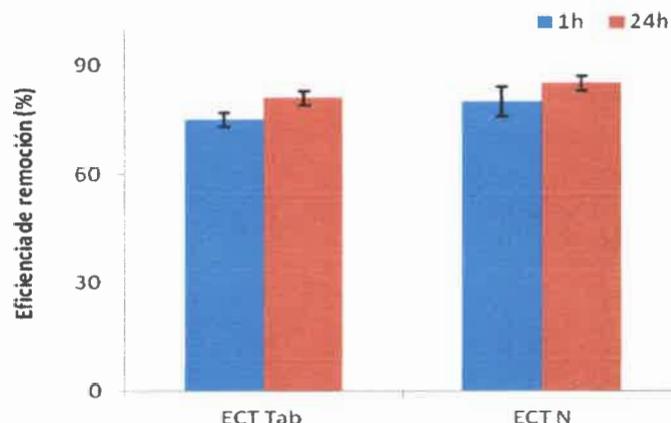


Figura 16: Eficiencia de remoción (%) de 2,4-DCF (25 mg/l) con 0,5 mM de H₂O₂ y 200 U/ml de peroxidasas de los diferentes ECT luego de 1 y 24 h de incubación.

Las eficiencias de remoción registradas en la primera hora de incubación fueron de 75 y 80 % para ECT Tab y N respectivamente y no hubo diferencias significativas luego de 24 h de incubación lo cual podría atribuirse a la disminución de la actividad de las peroxidasas contenidas en estos extractos. Teniendo en cuenta que este proceso podría atenuarse o revertirse mediante el agregado de aditivos, que actuarían como agentes protectores de peroxidasas durante la remoción de compuestos fenólicos, se decidió utilizar algunos de estos compuestos, sugeridos en la bibliografía, a los fines de incrementar las eficiencias de remoción.

4.2.1.1. Efecto de polietilenglicol (PEG) en la remoción de 2,4-DCF

Se evaluó comparativamente el efecto del agregado de PEG-3350 (100 mg/l) al medio de reacción sobre la eficiencia de remoción de las peroxidasas presentes en ECT Tab y N (Figura 17).

Las eficiencias de remoción de ECT Tab y N en presencia de PEG, alcanzaron valores entre 87 y 89 % en una hora de reacción.

Con el fin de analizar el efecto del agregado de PEG sobre la estabilidad de las peroxidasas, se determinó el porcentaje de actividad enzimática remanente luego de la primera hora de reacción en las soluciones PR en ausencia o presencia del aditivo (utilizando *o*-D como sustrato) (figura 18).

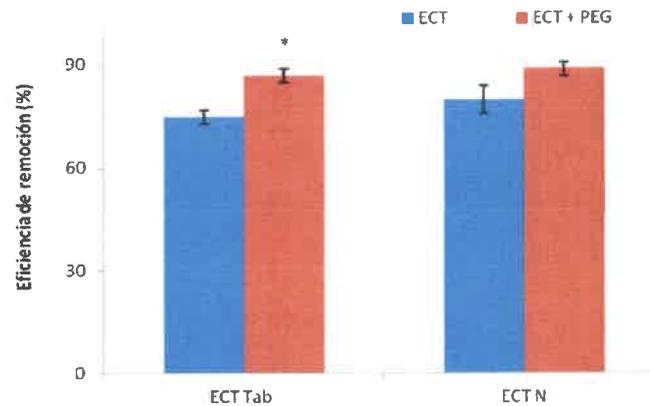


Figura 17: Eficiencia de remoción (%) de 2,4-DCF (25 mg/l) con 0,5 mM de H_2O_2 utilizando 200 U/ml de peroxidasas de los ECT de tabaco y nabo, en ausencia y presencia de PEG-3350 durante 1 hora de incubación.. Los asteriscos señalan diferencias estadísticamente significativas mediante test de ANOVA ($p \leq 0,05$).

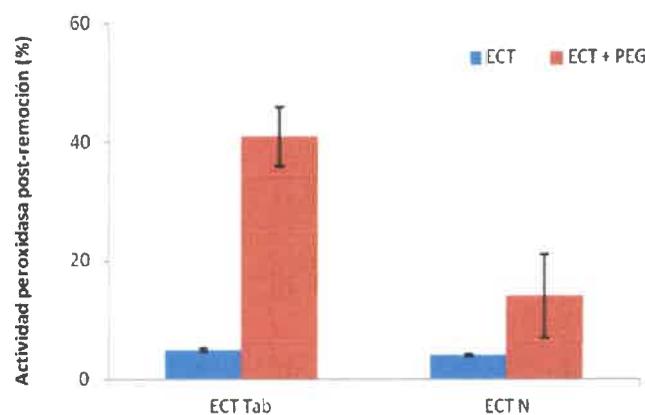


Figura 18: Actividad peroxidasa (%) determinada con *o*-D de las diferentes soluciones post-remoción de 2,4-DCF (25 mg/l) obtenidas con 0,5 mM de H_2O_2 y 200 U/ml de peroxidasas de ECT de tabaco y nabo, en presencia de PEG-3350 durante 1 h de reacción.

Los valores obtenidos de la actividad post-remoción en ausencia de PEG fueron menores al 5% en ambos extractos, lo cual indicaría que se estaría produciendo inactivación de las peroxidasas de los ECT durante la reacción.

El agregado de PEG-3350 protegió efectivamente a las peroxidasas en estudio, ya que la actividad peroxidasa detectada fue del 41% respecto a la actividad inicial cuando se utilizó ECT Tab y del 15% cuando se empleó ECT N. El efecto protector puede ser más importante para alguna de las isoformas de

peroxidasa presentes en los ECT, o de todas las peroxidasas por igual, disminuyendo la pérdida de actividad de las mismas y mejorando, en consecuencia, la eficiencia del proceso.

Con el fin de evaluar el efecto del tiempo de incubación sobre la remoción del contaminante en presencia de PEG-3350, se realizaron estudios extendiendo el tiempo de reacción hasta 24 h (Figura 19).

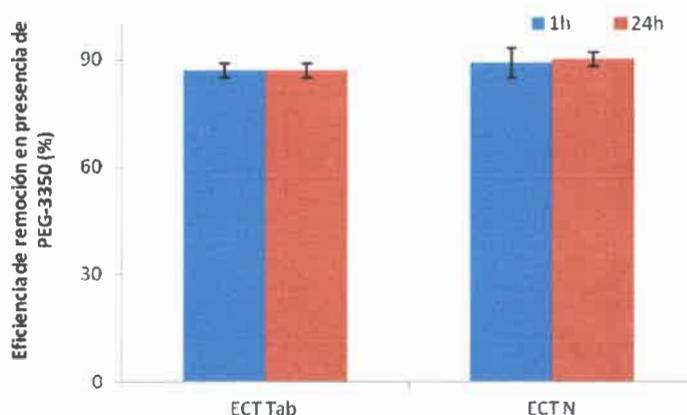


Figura 19: Eficiencia de remoción (%) de 2,4-DCF (25 mg/l) con 0,5 mM de H_2O_2 y 200 U/ml de peroxidasas de ECT de tabaco y nabo en presencia de PEG-3350 durante 1 y 24 h de reacción.

Al comparar las eficiencias obtenidas luego de 1 y 24 h de reacción en presencia de PEG, se pudo observar que los ECT de las raíces transformadas en estudio mostraron similar eficiencia de remoción.

Los resultados sugieren que el PEG tendría un efecto protector sobre las peroxidasas de ambos ECT, disminuyendo su inactivación, principalmente en el caso de ECT Tab. Sin embargo, esto no se traduciría en un incremento de la eficiencia de remoción cuando se utilizan estos extractos para tratar soluciones conteniendo 25 mg/l de 2,4-DCF durante 24 h de incubación.

4.2.2. Remoción de fenol

El fenol es otro de los contaminantes frecuentemente encontrado en efluentes y en aguas residuales y, por su estructura química, tiene altas posibilidades de reaccionar con halógenos formando compuestos de mayor toxicidad que el compuesto original (incluyendo clorofenoles). En consecuencia, se consideró relevante analizar la remoción de soluciones

conteniendo este contaminante. Para ello, se utilizaron soluciones de fenol (10 mg/l) y H_2O_2 (1 mM), concentraciones que se seleccionaron en base a estudios previos realizados en nuestro laboratorio, que fueron tratadas con 1000 U/ml de peroxidasas de ECT Tab y N. En dichas condiciones se obtuvieron eficiencias de remoción de 35 y 31% para ECT Tab y N respectivamente, luego de 1 h de reacción. Sin embargo, las eficiencias de remoción de las peroxidasas de ambos ECT se incrementaron en un 20% al extender el tiempo de incubación de 1 a 24 h, alcanzando valores de 55 y 50 % para ECT Tab y N respectivamente. Los resultados se muestran en la figura 20.

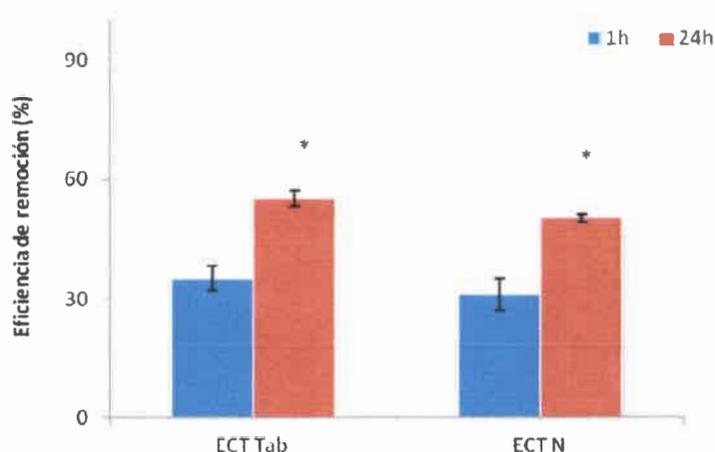


Figura 20: Eficiencia de remoción (%) de fenol (10 mg/l) con 1 mM de H_2O_2 y 1000 U/ml de peroxidasas de ECT de tabaco y nabo luego de 1 y 24 h de reacción. Los asteriscos señalan diferencias estadísticamente significativas mediante test de ANOVA ($p \leq 0,05$).

4.2.2.1. Efecto de PEG en la remoción de fenol

Al igual que el estudio realizado con 2,4-DCF, se evaluó el efecto de PEG sobre la eficiencia de remoción de las peroxidasas de ambos ECT luego de una hora de incubación (Figura 21).

El agregado de este polímero al medio de reacción incrementó aproximadamente un 20% la eficiencia de remoción de las peroxidasas en una hora de incubación. Por lo tanto, para evaluar si dichos incrementos se relacionan con cambios en la actividad peroxidasa se determinó dicha actividad en las soluciones PR luego de la primera hora de reacción (Figura 22).

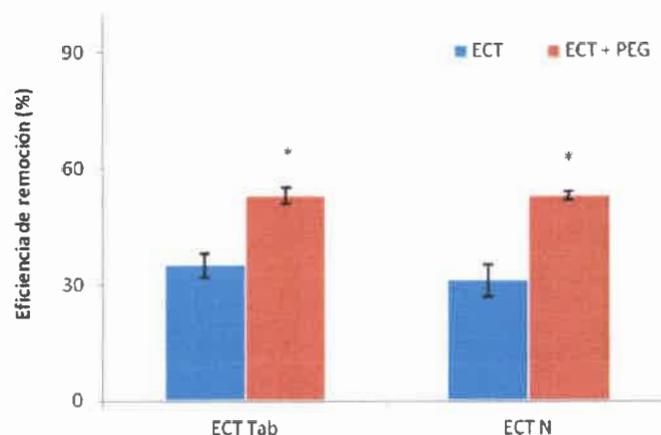


Figura 21: Eficiencia de remoción (%) de fenol (10 mg/l) con 1 mM de H_2O_2 y 1000 U/ml de peroxidasas de ECT de tabaco y nabo con agregado de PEG-3350 en 1 h de incubación. Los asteriscos señalan diferencias estadísticamente significativas mediante test de ANOVA ($p \leq 0,05$).

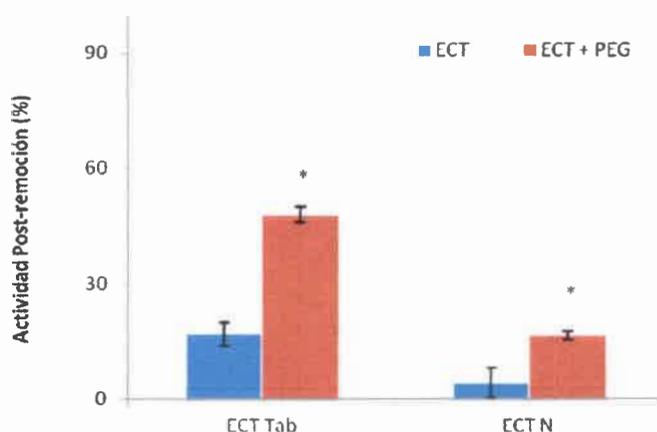


Figura 22: Actividad peroxidasa (%) determinada con *o*-D de las diferentes soluciones PR de fenol (10 mg/l) obtenidas con 1 mM de H_2O_2 y 1000 U/ml de peroxidasas de los diferentes ECT en presencia de PEG-3350 durante 1h de incubación. Los asteriscos señalan diferencias estadísticamente significativas mediante test de ANOVA ($p \leq 0,05$).

En presencia de PEG se detectó un mayor porcentaje de actividad peroxidasa luego de la remoción (48%) respecto de la actividad peroxidasa en medios de reacción sin PEG (17%) cuando se utilizaron ECT Tab. En el caso del ECT N solo se detectó un 4,2% de actividad en los medios PR sin PEG y un 17% de actividad peroxidasa en las soluciones post remoción a las que se agregó previamente PEG al medio de reacción.

Para estudiar el efecto del tiempo de incubación en presencia de PEG, el mismo se extendió a 24 h (Figura 23).

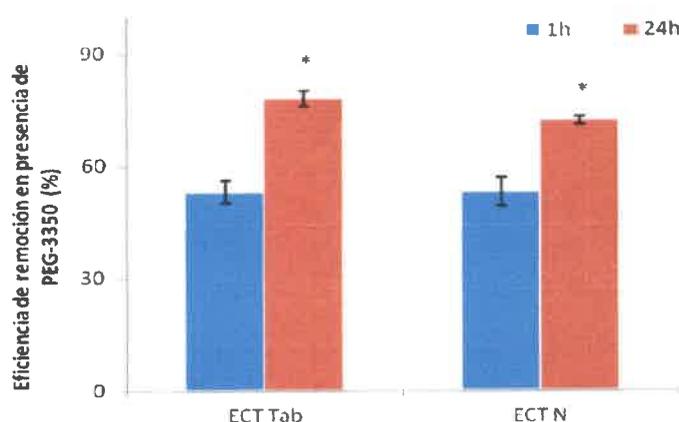


Figura 23: Eficiencia de remoción (%) de fenol (10 mg/l) con 1 mM de H_2O_2 y 1000 U/ml de peroxidasas de ECT de Tab y N en presencia de PEG-3350 luego de 1 y 24 h de incubación. Los asteriscos señalan diferencias estadísticamente significativas mediante test de ANOVA ($p \leq 0,05$).

Los medios de reacción conteniendo PEG e incubados durante 24 h alcanzaron eficiencias de remoción de 78 y 72%, lo que muestra un incremento de un 25 y 19% para ECT Tab y N respectivamente, en relación a las eficiencias obtenidas luego de una hora de reacción.

Los resultados sugieren que el agregado de PEG al medio de reacción incrementa la eficiencia de remoción de fenol, tanto luego de 1 h como de 24 h de reacción y este efecto estaría relacionado con una mayor protección de la actividad enzimática que resulta más evidente en las peroxidasas de ECT Tab.

4.3. Ensayos de remoción en presencia de aditivos

Los efluentes a tratar pueden contener distintos compuestos químicos que afectarían la actividad y la eficiencia de las enzimas, así como su estabilidad, los cuales son parámetros fundamentales para su aplicación en bioprocesos. Entre estos compuestos se encuentran los detergentes, solventes y sales de metales pesados o metaloides (Flegger y col., 2003; Tonegawa y col., 2003; Fatima y col., 2007; Sidrach y col., 2013). El detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS) ha sido descrito como inhibidor e inactivador de HRP por

algunos autores, y como activador de la actividad de SBP y HRP por otros grupos de investigación (Nazari y col., 2005b; Fatima y col., 2007). Asimismo, el efecto de los solventes orgánicos es también importante, indicándose a y se sabe que varios de ellos como activadores y/o protectores de la estabilidad de peroxidasas, como es el caso de dimetilformamida (DMF), polisorbato (Tween) y dimetilsulfóxido (DMSO), entre otros (Fatima y col., 2007; Sidrach y col., 2013; Thomas, 2013). Como se mencionó previamente, otros compuestos que pueden estar presentes en efluentes o aguas naturales contaminadas son las sales de metales o metaloides, entre ellas las de Ni^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} y Cd^{+2} (Hoshina y Marin Morales, 2009), algunas de las cuales pueden interactuar con los grupos cargados del sitio activo de las peroxidasas, produciendo activación, incrementos de estabilidad, inhibición o inactivación, dependiendo de las concentraciones en que se encuentren (Nazari y col., 2005a; Ashger y col., 2012). Por otra parte, los aniones también podrían interactuar con grupos cargados de la estructura proteica de las enzimas, como es el caso del anión bicarbonato, que ha sido descrito como estimulador de la actividad peroxidasa (Liochev y Fridovich, 2004).

En este contexto, se evaluó el efecto de distintos tipos de aditivos sobre la remoción de los compuestos fenólicos. Para este estudio se utilizaron el detergente aniónico SDS, el solvente orgánico DMF, bicarbonato de sodio (Bic) y dos sales de metales pesados, tales como NiCl_2 (Ni^{+2}) y CuCl_2 (Cu^{+2}), durante el proceso de remoción de 2,4-DCF (25 mg/l) y fenol (10 mg/l). Las concentraciones empleadas para cada aditivo fueron seleccionadas en función de antecedentes de estudios de distintos autores sobre diferentes peroxidasas (Liochev y Fridovich, 2004; Nazari y col., 2005a; 2005b; Fatima y col., 2007).

4.3.1. Remoción de 2,4-DCF en presencia de aditivos

Se evaluaron los efectos de los distintos aditivos sobre la eficiencia de remoción de 2,4-DCF por peroxidasas de ECT de Tab y N, luego de una hora de incubación (Figura 24).

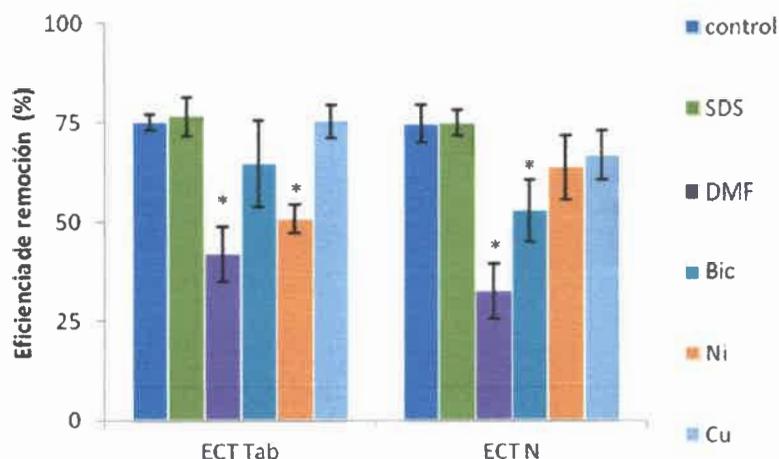


Figura 24: Eficiencia de remoción (%) de 2,4-DCF (25 mg/l) con 0,5 mM de H₂O₂ y 200 U/ml de peroxidasa de ECT de tabaco y nabo en presencia de distintos aditivos durante 1 h de incubación. Los asteriscos señalan diferencias estadísticamente significativas con el control ($p \leq 0,05$)

La presencia del detergente SDS, o de Cu no afectó la eficiencia de remoción del contaminante por las enzimas en estudio, mientras que DMF, Ni y bicarbonato de sodio disminuyeron dicha eficiencia.

A fin de determinar los efectos que generan los aditivos sobre la estabilidad de las enzimas, se realizó el análisis de la actividad peroxidasa residual en cada uno de los medios de remoción. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Actividad peroxidasa remanente en los medios post-remoción de 2,4-DCF en presencia de distintos aditivos, luego de 1 h de incubación.

| | ECT Tab (%) | ECT N (%) |
|--------------------|-------------|-------------|
| Control | 15,0 ± 5,3 | 11,2 ± 4,7 |
| SDS | 11,5 ± 3,5 | 6,6 ± 2,5 |
| DMF | 43,3* ± 7,1 | 19,8* ± 5,5 |
| Bicarbonato | 30,3* ± 5,1 | 11,6 ± 2,8 |
| Ni | 25,3* ± 4,6 | 14,5 ± 5,1 |
| Cu | 39,0* ± 7,1 | 14,2 ± 4,5 |

(% promedio ± ES). Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas con el control ($p \leq 0,05$).

En general, el efecto de los distintos aditivos sobre la actividad peroxidasa fue más evidente en los medios de remoción que contenían ECT Tab. El agregado de DMF, CO_3HNa , NiCl_2 y CuCl_2 permitió conservar un mayor porcentaje de la actividad peroxidasa inicial, comparado con el control sin aditivos. Por el contrario, en los medios conteniendo SDS la actividad residual detectada fue menor, aunque no presentó diferencias estadísticamente significativas.

Al determinar la actividad peroxidasa PR en las reacciones catalizadas por ECT N se observó una tendencia similar, pero con porcentajes de actividad mucho menores. En este caso, solo se pudo detectar una mayor actividad peroxidasa PR respecto al control sin aditivos, en los medios de reacción que contenían DMF.

Teniendo en cuenta que un porcentaje de la actividad enzimática se conserva luego de una hora de incubación, se extendió el tiempo de reacción a 24 h (Figura 25).

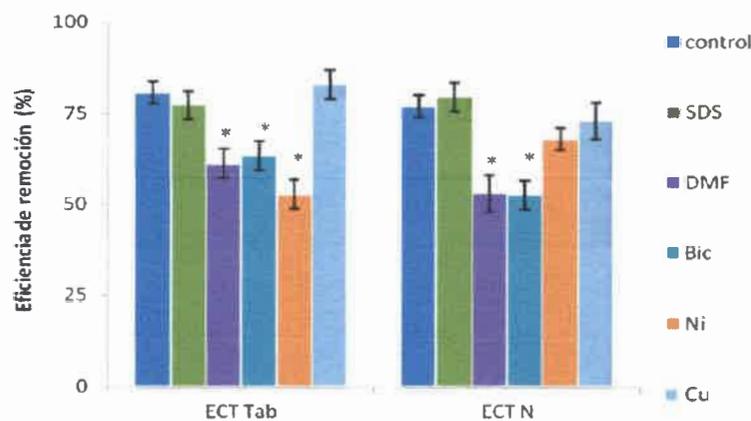


Figura 25: Eficiencia de remoción (%) de 2,4-DCF (25 mg/l) con 0,5 mM de H_2O_2 y 200 U/ml de peroxidases utilizando ECT de tabaco y nabo en presencia de distintos aditivos durante 24 h de reacción. Los asteriscos señalan diferencias estadísticamente significativas con el control ($p \leq 0,05$)

Al extender el tiempo de incubación de 1 a 24 h, se observó un incremento en la eficiencia de remoción de hasta 25 % solamente en los medios conteniendo DMF, con respecto al registrado en una hora de reacción. Sin embargo, las eficiencias registradas en los medios de reacción con DMF,

no alcanzaron los valores del control sin aditivos. El efecto negativo del bicarbonato y Ni^{+2} sobre la eficiencia de los ECT N y Tab respectivamente, para remover 2,4-DCF, no se revirtió luego de 24 h de incubación.

4.3.2. Remoción de fenol en presencia de aditivos

Se analizó el efecto de los aditivos, mencionados precedentemente, en la remoción de fenol. Los resultados correspondientes a 1 h de incubación se muestran en la figura 26.

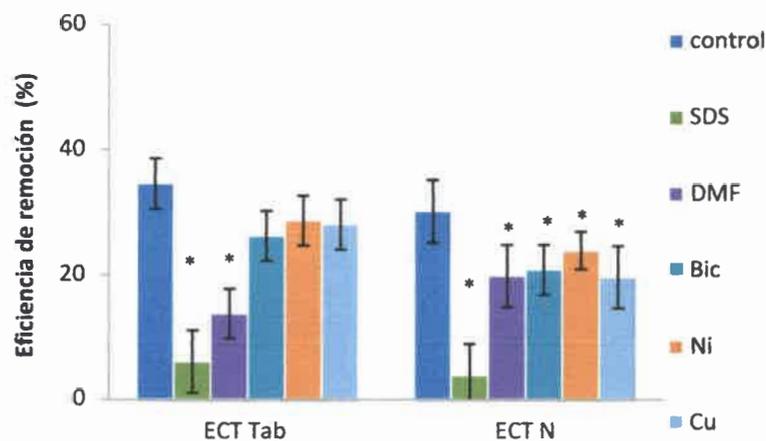


Figura 26: Eficiencia de remoción (%) de fenol (10 mg/l) con 1 mM de H_2O_2 y 1000 U/ml de peroxidasas utilizando ECT de tabaco y nabo en presencia de distintos aditivos durante 1 h de incubación. Los asteriscos señalan diferencias estadísticamente significativas con el control ($p \leq 0,05$).

Se observó que todos los aditivos produjeron una disminución de las eficiencias de remoción de las peroxidasas de ambos ECT luego de una hora de reacción.

Para analizar el efecto de estos aditivos sobre las peroxidasas, se determinó la actividad enzimática remanente en el medio de reacción para ese mismo tiempo de incubación. Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Actividad peroxidasa remanente en los medios post-remoción de fenol en presencia de distintos aditivos luego de una hora de incubación.

| | ECT Tab (%) | ECT N (%) |
|--------------------|-------------|-------------|
| Control | 17,7 ± 0,7 | 4,2 ± 0,9 |
| SDS | 15,8 ± 5,2 | 6,5 ± 0,7 |
| DMF | 28,0* ± 1,9 | 19,5* ± 1,4 |
| Bicarbonato | 24,2 ± 0,8 | 5,0 ± 0,3 |
| Ni | 24,6* ± 0,9 | 10,5* ± 0,7 |
| Cu | 10,2 ± 1,7 | 20,5* ± 2,6 |

(% promedio ± ES). Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas con el control ($p \leq 0,05$).

El SDS y el anión bicarbonato no tuvieron efectos sobre la actividad peroxidasa remanente de ambos extractos, mientras que el DMF y Ni^{+2} permitieron conservar mayor porcentaje de actividad. La actividad remanente del ECT N en presencia de Cu fue hasta 5 veces mayor a la registrada en el control sin aditivo, mientras que con el ECT Tab, se observó una disminución en la actividad detectada en el medio PR con respecto a su control. Posteriormente, se extendió el tiempo de incubación a 24 h para analizar el efecto sobre la eficiencia de remoción. Los resultados se muestran en la figura 27.

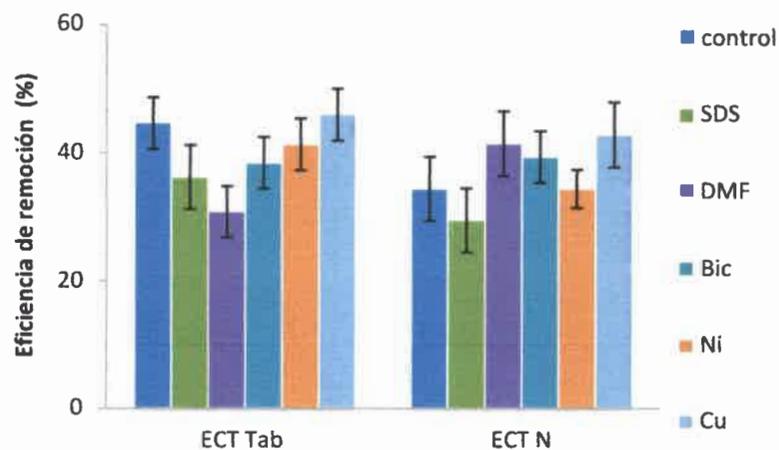


Figura 27: Eficiencia de remoción (%) de fenol (10 mg/l) con 1 mM de H_2O_2 y 1000 U/ml de peroxidasas de ECT de tabaco y nabo en presencia de distintos aditivos luego de 24 h de incubación. (% promedio ± ES). Los asteriscos señalan diferencias estadísticamente significativas con el control ($p \leq 0,05$).

En general, las eficiencias de remoción de fenol se incrementaron conforme se extendió el tiempo de la incubación de 1 a 24 h, tanto en los controles como en los medios con aditivos. Dichos incrementos variaron entre el 10 y el 30 % al utilizar ambos ECT con los diferentes aditivos, siendo en los medios con SDS en los que se observaron los mayores efectos en la eficiencia de remoción en relación a la obtenida luego de una hora de incubación (incrementos de 30 y 25% para el ECT Tab y N respectivamente).

Al evaluar el efecto de la presencia de los aditivos en el medio de reacción luego de 24 h de incubación no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la eficiencia máxima de remoción de fenol de la mayoría de los medios en relación al control.

4.4. Inmovilización de ECT en diferentes soportes

Una estrategia para aportar estabilidad a las enzimas utilizadas en los procesos de remoción, y para separarlas del medio post-remoción es la inmovilización de las mismas. La selección del soporte es fundamental para obtener una buena eficiencia del proceso. Por ejemplo, las resinas de intercambio iónico, así como las sales de ácido algínico, son soportes de bajo costo operativo y de fácil manipulación que han sido ampliamente utilizados para la inmovilización de enzimas con distintos fines biotecnológicos (Kulshrestha y Husain, 2006a; 2006b; Akamatsu y col., 2011; Handayani y col., 2012).

En base a estudios previos realizados en nuestro laboratorio que señalan a las peroxidasas básicas como el principal grupo de isoformas involucradas en la remoción de compuestos fenólicos (Wevar–Oller y col., 2005, Coniglio y col., 2008; Angelini y col., 2011), se seleccionó a la resina de intercambio catiónico carboximetil sephadex (CMS) para los estudios de inmovilización de las peroxidasas correspondientes a la fracción de isoenzimas básicas.

Por otra parte, se consideró interesante probar la encapsulación de extractos enzimáticos en alginato de calcio, ya que brinda la posibilidad de inmovilizar en esta matriz a la totalidad de enzimas de los ECT, e inclusive permite el agregado de aditivos u otros componentes que podrían incrementar la eficiencia del proceso (Trivedi y col., 2006; Quintanilla–Guerrero y col., 2008).

4.4.1. Inmovilización de los ECT en CMS

La inmovilización se realizó agregando a 10 gr de resina de CMS hidratada, un volumen pre-establecido de cada uno de los ECT seleccionados de acuerdo a la actividad peroxidasa determinada previamente con o-D. Luego de incubar y separar la resina de la solución acuosa, se observó que, en general, aproximadamente el 30% de la actividad peroxidasa permaneció en la fracción soluble. Como se muestra en la tabla 9, las peroxidasas unidas a la resina alcanzaron un 29 y 28% para ECT Tab y ECT N respectivamente.

Tabla 9. Actividad peroxidasa de ECT Tab y ECT N inmovilizados en la resina de intercambio catiónico carboximetil sephadex (CMS).

| | Peroxidasas (U/gr 10 ³) | Peroxidasas unidas (U/gr 10 ³) | Peroxidasas unidas (%) |
|-------------|--|--|---------------------------|
| CMS-ECT Tab | 35,5 | 10,4 | 29 |
| CMS-ECT N | 11,5 | 3,2 | 28 |

4.4.2. Inmovilización de ECT en alginato de calcio

Para establecer las concentraciones de ácido algínico y de CaCl₂ óptimas para la formación de las cápsulas se variaron las concentraciones de ambos compuestos. Las concentraciones de ácido algínico que se utilizaron en este trabajo fueron de 14 a 23 mg/ml, mientras que la de CaCl₂ varió entre 100 y 500 mM y el tiempo de permanencia de las cápsulas formadas en la solución de CaCl₂ fue entre 10 minutos a 24 h.

La concentración óptima de ácido algínico fue de 20 mg/ml la cual se mezcló con cada ECT y se hizo gotear sobre una solución de CaCl₂ 200 mM manteniendo el sistema en agitación durante 10 minutos. En esta condición se obtuvieron esferas perfectamente definidas de alginato de calcio conteniendo en su interior al ECT. Éstas fueron separadas en grupos que se conservaron en diferentes condiciones de temperatura y humedad durante 7 días. Las cápsulas que se mantuvieron sin humedad se deshidrataron y no fue posible su rehidratación (Figura 28).



Figura 28: Cápsulas de alginato de calcio. a) Deshidratadas; b) Conservadas en humedad.

Cuando las cápsulas con los ECT inmovilizados fueron conservadas sumergidas en solución amortiguadora o agua se pudo determinar actividad peroxidasa en el medio que las contenía, lo que indicaría que parte de las enzimas difundirían durante dicha conservación. Un método alternativo para su mantención fue colocar las cápsulas en el interior de placas de petri en condiciones de elevada humedad, a 4°C y 25°C. Se pudo observar que las cápsulas a 4°C se mantuvieron inalteradas durante un periodo de observación de 7 días, mientras que las cápsulas conservadas a 25°C mostraron signos de deterioro, posiblemente por contaminación.

De acuerdo a estos resultados, la forma óptima de conservación de las cápsulas fue en el interior de una placa con elevada humedad y con refrigeración.

4.4.3. Determinación de propiedades bioquímicas de peroxidasas de ECT libres e inmovilizadas

Al realizar la determinación de actividad peroxidasa, de las enzimas inmovilizadas sobre CMS o en las cápsulas de alginato utilizando *o*-dianisidina como sustrato, la reacción ocurrió muy lentamente, y en general, el producto permaneció contenido dentro de la cápsula o se adhirió a la resina sin difundir hacia el medio de reacción.

Por ello, se utilizó como sustrato alternativo al Guayacol cuyo producto de oxidación es un tetrámero de bajo peso molecular que podría difundir con mayor facilidad al medio de reacción.

Este sustrato permitió detectar el producto de oxidación cuando se utilizaron peroxidasas inmovilizadas en CMS. Sin embargo, no se obtuvieron

resultados reproducibles para las peroxidasas inmovilizadas en cápsulas de alginato de calcio, por lo cual no se consideraron en este estudio.

El máximo valor de actividad enzimática se obtuvo con el agregado de 0,8 mM de Guayacol y 1,32 mM de H₂O₂ para ambos ECT. En dichas condiciones se realizó el análisis de parámetros cinéticos de las peroxidasas libres e inmovilizadas en CMS ($K_{m_{ap}}$ y $V_{max_{ap}}$).

Debido a la interferencia ocasionada por las partículas de la resina en suspensión, la determinación de la actividad peroxidasa con ECT inmovilizados en CMS se realizó mediante una reacción a tiempo final. Para ello se agregaron los sustratos y diferentes cantidades de resina al tubo de ensayo, permitiendo a la mezcla reaccionar y sedimentar durante un tiempo total de 2 minutos.

Los $K_{m_{ap}}$ para Guayacol, obtenidos con ECT Tab y N libres fueron de 1,4 y 2,2 mM respectivamente. Cuando estos ECT fueron inmovilizados en CMS los valores de $K_{m_{ap}}$ aumentaron, siendo de 2,5 y 3,6 mM respectivamente.

En relación a los valores registrados de $V_{max_{ap}}$, los mismos fueron de 9,1 y de 6,0 para las peroxidasas de ECT Tab y N libres, disminuyendo dichos valores a 6,0 y 3,3 para los respectivos ECT inmovilizados en esta resina.

4.4.4. Ensayos de remoción de fenol y 2,4-DCF con ECT libres e inmovilizados

Las enzimas inmovilizadas en CMS y en alginato de calcio fueron utilizadas para los estudios de remoción de 2,4-DCF (25 mg/l) y fenol (10 mg/l). Debido a que el alginato de calcio brinda la posibilidad de inmovilizar las enzimas junto a otros componentes, se agregó a un grupo de cápsulas PEG-3350 (100 mg/ml).

Por otra parte, dado que para obtener elevadas eficiencias de remoción de fenol se necesitan períodos de incubación más prolongados se realizó la experiencia determinando el fenol residual luego de 24 y 48 h de tratamiento. Los resultados obtenidos para los dos contaminantes se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Eficiencias de remoción (%) de 2,4-DCF (25 mg/l) y fenol (10 mg/l) por peroxidasas de ECT de tabaco y nabo libres e inmovilizados sobre CMS y alginato de calcio.

| | Eficiencia de remoción de 2,4-DCF (%) | | Eficiencia de remoción de fenol (%) | |
|------------------------|---------------------------------------|--------|-------------------------------------|--------|
| | 1 h | 24 h | 24 h | 48 h |
| ECT Tab | 75 ± 4 | 76 ± 4 | 53 ± 6 | 54 ± 3 |
| ECT N | 75 ± 2 | 80 ± 4 | 47 ± 5 | 50 ± 3 |
| CMS (control) | 5 ± 1 | 5 ± 1 | 18 ± 2 | 20 ± 2 |
| ECT Tab-CMS | 89 ± 4 | 92 ± 4 | 64 ± 1 | 67 ± 2 |
| ECT N-CMS | 87 ± 4 | 90 ± 3 | 62 ± 1 | 66 ± 1 |
| Agua-Alg (control) | nd | 5 ± 1 | 14 ± 2 | 18 ± 3 |
| ECT Tab-Alg | 56 ± 2 | 90 ± 2 | 41 ± 5 | 53 ± 4 |
| ECT N-Alg | 60 ± 4 | 80 ± 5 | 37 ± 4 | 47 ± 3 |
| Agua-Alg-PEG (control) | nd | 5 ± 1 | 15 ± 2 | 20 ± 2 |
| ECT Tab-PEG-Alg | 58 ± 3 | 90 ± 1 | 53 ± 2 | 66 ± 5 |
| ECT N-PEG-Alg | 65 ± 4 | 80 ± 5 | 60 ± 1 | 68 ± 4 |

nd: no detectado

Las eficiencias de remoción de 2,4-DCF fueron elevadas, tanto en las determinaciones realizadas luego de 1 hora como de 24 h de incubación; comparadas con la remoción de fenol. En general, este proceso ocurrió durante la primera hora de reacción. En el caso de las peroxidasas inmovilizadas en alginato de calcio el tiempo necesario para alcanzar una alta eficiencia de remoción fue mayor respecto a las enzimas libres o inmovilizadas en CMS.

En términos generales, se obtuvieron mayores eficiencias de remoción de 2,4-DCF cuando las enzimas fueron inmovilizadas en ambos soportes, principalmente en el caso de ECT Tab. Es importante considerar que una proporción de ambos contaminantes se adsorbió sobre la resina o en las cápsulas de alginato, sin embargo esta contribución sería minoritaria comparada con la remoción por parte de las enzimas. El porcentaje de adsorción sobre los soportes de inmovilización se hizo más evidente en la reacción de remoción de fenol, llegando al 20%, ya que la proporción de resina o cápsulas utilizadas fue mayor a la utilizada para remover 2,4-DCF.

La eficiencia de remoción de los contaminantes por las peroxidasa inmovilizadas en alginato de calcio fue similar a la obtenida con enzimas libres, pero cuando las enzimas se inmovilizaron en CMS las eficiencias aumentaron hasta un 15%.

Por otra parte, el agregado de PEG a las cápsulas de alginato se reflejó en incrementos en la eficiencia de remoción de fenol por ambos ECT, siendo dicho incremento del 13 % para ECT Tab y del 20% para ECT N en relación a las cápsulas sin PEG.

Se pudo observar que tanto la resina como las cápsulas de alginato de calcio conteniendo las peroxidasa adquirieron una coloración oscura al finalizar el tratamiento de las soluciones conteniendo fenol o 2,4-DCF (Figura 29). Esto podría deberse a que los productos poliméricos de la reacción quedan incluidos dentro de la misma. Estos posibles productos no pudieron ser analizados debido a la imposibilidad de extraerlos de la cápsula mediante lavados con diferentes solventes (metanol, etanol, acetona o cloroformo).

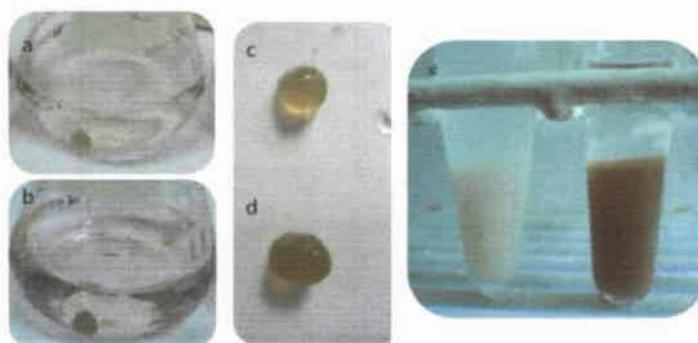


Figura 29: Coloración del medio de reacción y de las cápsulas de alginato de calcio con ECT Tab antes y después de la reacción de remoción. a) cápsula de alginato de calcio en solución de 2,4-DCF pre-remoción. b) cápsula de alginato en solución post-remoción. c) cápsula de alginato de calcio pre-remoción. d) cápsula de alginato post-remoción. e) resina CMS-ECT Tab pre y post-remoción.

4.5. Ensayos de toxicidad y genotoxicidad

Los organismos vivos son afectados por la presencia de niveles peligrosos de cualquier sustancia química o mezcla compleja de tóxicos presentes. Los ensayos de toxicidad han ganado aceptación entre las estrategias de biomonitorio ambiental, fundamentalmente porque suministran

resultados confiables, son costo-efectivos, simples y rápidos (Gustavson y col, 2000). Estos bioensayos pueden ayudar a evaluar los efectos sobre la salud humana y brindan importante información sobre el impacto que puede tener un contaminante o mezclas, sobre determinados organismos y/o los ecosistemas, al ser introducidos al medio ambiente.

Estos test son necesarios si se considera la posible aplicación de un bioproceso, y adquieren mayor relevancia cuando se desconocen cuáles son los productos obtenidos luego del mismo, como es el caso de las reacciones de remoción de 2,4-DCF y fenol utilizando peroxidasas de ECT Tab y N.

En este trabajo realizó la evaluación de toxicidad de las soluciones PR, además y el análisis del posible efecto tóxico de otros componentes de la reacción que podrían estar presentes en las soluciones PR utilizando test que empleen organismos de diferentes niveles tróficos y de ecosistemas acuáticos y aeroterrestres. Para este fin, se seleccionaron los test que emplean larvas de *R. arenarum*, el ensayo de toxicidad y genotoxicidad de micronúcleos empleando ratones Balb-C y el test de *L. sativa*.

4.5.1. Evaluación de la toxicidad de 2,4-DCF y sus productos de remoción

4.5.1.1. Evaluación de toxicidad aguda utilizando larvas de *Rhinella arenarum*

Este ensayo fue seleccionado en base a diferentes estudios realizados en embriones de anfibios, que indican que éstos son adecuados para detectar la toxicidad de distintos contaminantes del medio ambiente. Se trata de organismos altamente sensibles al estrés oxidativo y a la contaminación del agua por metales pesados o compuestos orgánicos (Herkovits y col., 2002; Pérez-Coll y Herkovits, 2004).

En estudios previos de nuestro laboratorio se determinaron efectos letales del fenol sobre larvas de *R. arenarum* en estadio 25, obteniendo una CL₅₀ de 183,7 mg/l de dicho compuesto y de 0,98 mM en el caso de H₂O₂ (Paisio y col., 2009; 2010). Los derivados halogenados del fenol suelen tener mayor toxicidad que el mismo (ATSDR, 1999). En base a estos antecedentes se realizó una

evaluación para determinar la toxicidad del 2,4-DCF para estos anfibios, y obtener la CL_{50} para dicho compuesto.

Debido a que las soluciones de 2,4-DCF y las soluciones PR se realizan diluyendo los componentes con agua destilada se utilizaron dos tipos de controles, uno de ellos con solución Ringer y el otro con agua destilada. Por otra parte, durante la remoción de 2,4-DCF el pH tiende a disminuir, por lo que se evaluó el efecto del pH sobre las larvas, utilizando soluciones Ringer de pH 5, 6 y 7 sin observarse efectos negativos sobre las mismas. En general, en los controles no se detectó mortalidad en las distintas repeticiones.

Además, se determinó que la concentración 0,5 mM de H_2O_2 no produce efectos tóxicos sobre las larvas.

Para la evaluación de toxicidad de 2,4-DCF se realizó una curva de calibración en la que se expusieron larvas de *R. arenarum* en estadio 25 de desarrollo a concentraciones entre 1 a 25 mg/l de 2,4-DCF, que se colocaron en placas de petri. Posteriormente, se observó el estado general de las larvas y se registró la cantidad de larvas muertas diariamente, hasta completar el periodo de tratamiento de 96 h de exposición a la solución del contaminante (Figuras 30 y 31). Se obtuvo de esta forma la CL_{50} para dicho compuesto, siendo de 5,4 mg/l con un 95% de límite de confianza, calculado mediante el software PROBIT. Los resultados indican que dicho compuesto tendría una elevada toxicidad sobre las larvas.

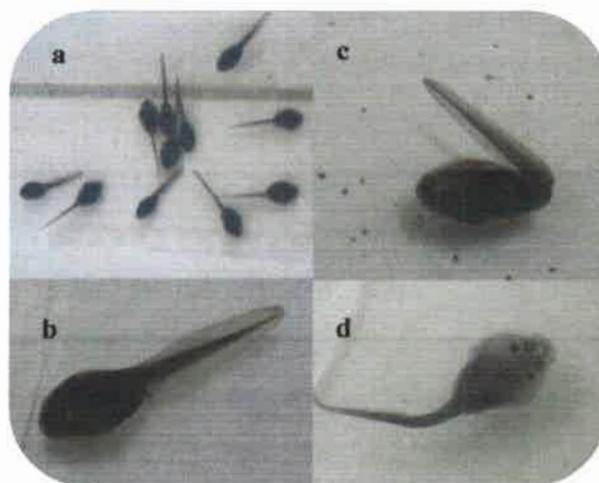


Figura 30: Larvas de *R. arenarum* obtenidas durante los ensayos de toxicidad. a-b) larvas normales en estadio 25 de desarrollo; c-d) larvas muertas, afectadas por la presencia de 2,4-DCF.

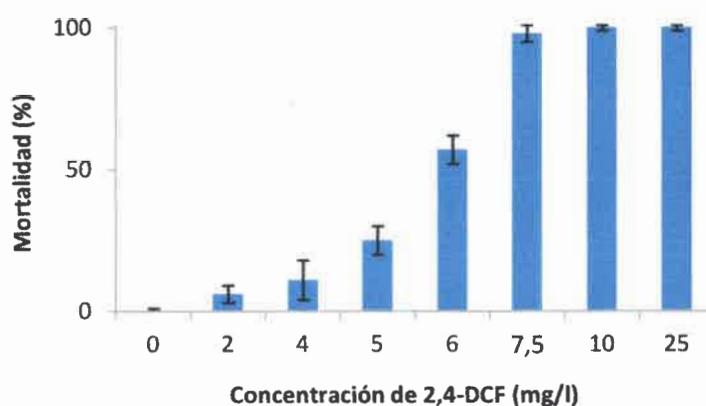


Figura 31: Mortalidad (%) de larvas de *R. arenarum* expuestas durante 96 h a diferentes concentraciones de 2,4-DCF.

Posteriormente se realizó la evaluación de las soluciones PR de 2,4-DCF (25 mg/l) con 0,5 mM de H_2O_2 y 200 U/ml de peroxidasas libres. En estas condiciones, se observó un 100% de mortalidad de las larvas en estadio 25 al ser expuestas a dichas soluciones. Si bien se desconoce la identidad de los productos de oxidación se determinó que las soluciones evaluadas contenían entre 2 y 4 mg/l de compuestos fenólicos, dentro de los cuales se encontraría el 2,4-DCF residual. La elevada toxicidad, no podría ser atribuida al efecto individual del 2,4-DCF o del H_2O_2 residual en la solución. Sin embargo, podría deberse a un posible efecto sinérgico entre los mismos y/o a los productos de su oxidación por acción de las peroxidasas, entre otras posibles causas que puedan generar un estrés adicional en dichas larvas (por ejemplo: pH o salinidad).

Para descartar efectos producidos por exceso de salinidad en el medio se incluyeron como controles a las soluciones de los ECT (aproximadamente 100 μ l de ECT/10 ml de solución que corresponden a 200 U/ml de peroxidasa), sin detectarse efectos letales.

Estos resultados indicarían que mediante la reacción de remoción de 2,4-DCF con los ECT no disminuirían los efectos tóxicos del contaminante sobre estos organismos. Debido a ello se efectuaron distintas diluciones de las soluciones PR obtenidas con ambos ECT (100, 50, 20, 10, 5 y 1%), a fines de evaluar la magnitud de dicha toxicidad. En las figuras 32 y 33 se muestran los resultados obtenidos al utilizar las soluciones diluidas hasta el 10%.

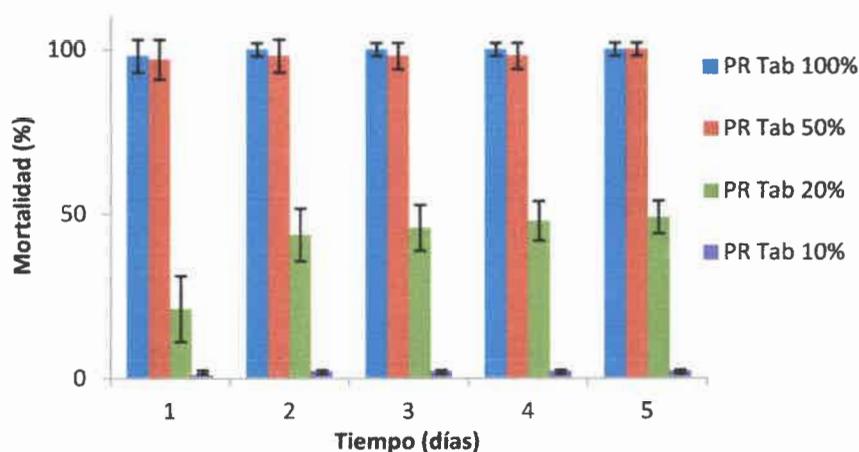


Figura 32: Mortalidad (%) de larvas de *R. arenarum* en estadio 25 de desarrollo durante el tratamiento con las distintas diluciones de las PR Tab.

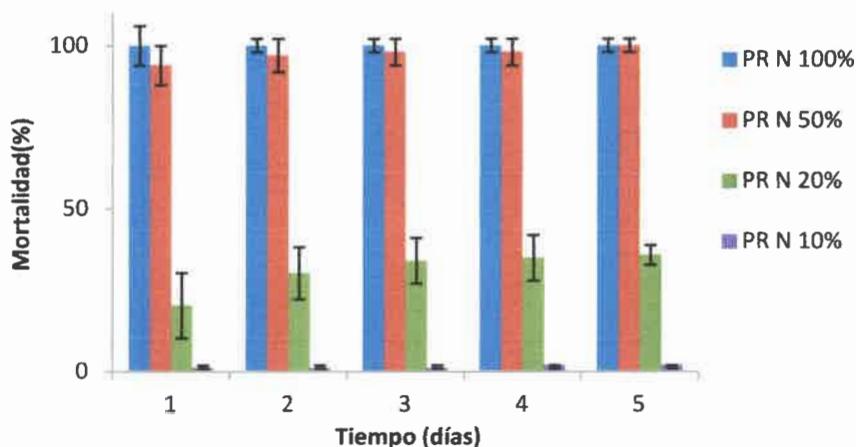


Figura 33: Mortalidad (%) de larvas de *R. arenarum* en estadio 25 de desarrollo durante el tratamiento con las distintas diluciones de las soluciones PR N.

Desde el primer día de tratamiento, se pudo observar que al exponer las larvas a ambas soluciones PR puras o diluidas al 50% la letalidad de las mismas llegó al 100%. Sin embargo, cuando la solución PR fue diluida al 20% la misma se redujo llegando a 49 y 35% para ECT Tab y N respectivamente, mientras que al utilizar la dilución al 10% solo se registró un 1% de mortalidad y las soluciones PR al 5 o 1% fueron inocuas.

Para determinar si dicha toxicidad podría cambiar al utilizar las enzimas inmovilizadas se expusieron larvas en estadio 25 a soluciones PR obtenidas con ECT de tabaco y nabo inmovilizados en alginato de calcio (figuras 34 y 35).

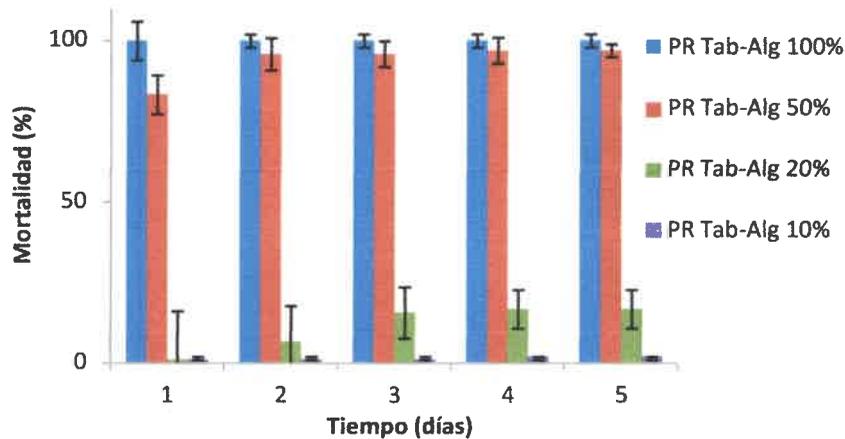


Figura 34: Mortalidad (%) de larvas de *R. arenarum* en estadio 25 de desarrollo durante el tratamiento con las distintas diluciones de las soluciones post-remoción obtenidas con ECT Tab inmovilizado en alginato de calcio.

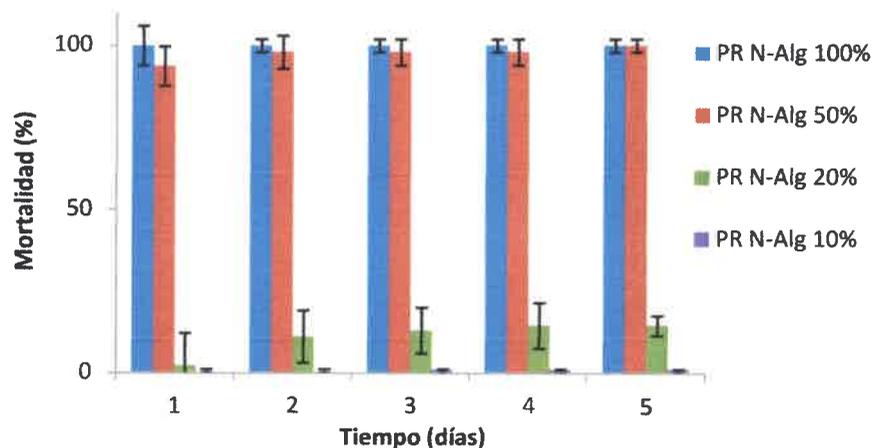


Figura 35: Mortalidad (%) de larvas de *R. arenarum* en estadio 25 de desarrollo durante el tratamiento con las distintas diluciones de las soluciones post-remoción obtenidas con ECT N inmovilizado en alginato de calcio.

De forma similar a lo observado con los ECT libres, las soluciones PR puras o diluidas al 50% produjeron un 100% de mortalidad para las larvas en estadio 25 desde los primeros días de tratamiento. La letalidad de la dilución al 20% fue de 17 y 14%, para los ECT Tab y N inmovilizados en alginato de calcio respectivamente.

Para descartar los posibles efectos tóxicos producidos por los componentes de las cápsulas se realizaron controles con la misma cantidad de

cápsulas de alginato (conteniendo los ECT inmobilizados) utilizadas en la remoción sumergidas en solución Ringer, sin observarse efectos de toxicidad.

Posteriormente, en las mismas condiciones de los ensayos anteriores, se evaluó la toxicidad de soluciones obtenidas con los ECT inmobilizados en CMS. Los resultados se muestran en las figuras 36 y 37.

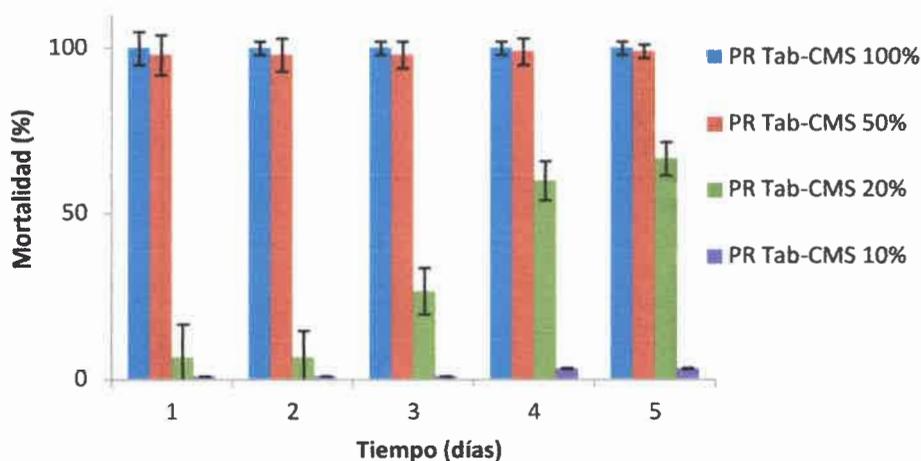


Figura 36: Mortalidad (%) de larvas de *R. arenarum* en estadio 25 de desarrollo durante el tratamiento con las distintas diluciones de las soluciones post-remoción obtenidas con ECT Tab inmobilizado en CMS.

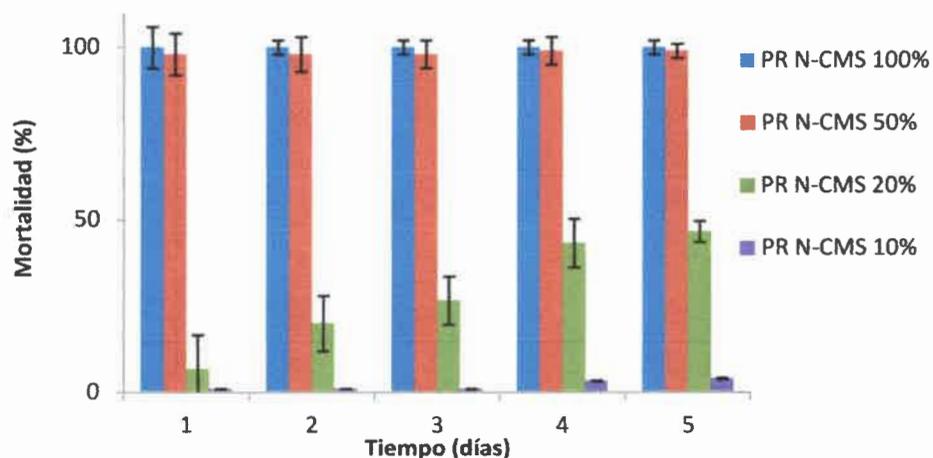


Figura 37: Mortalidad (%) de larvas de *R. arenarum* en estadio 25 de desarrollo durante el tratamiento con las distintas diluciones de las soluciones post-remoción obtenidas con ECT N inmobilizado en CMS.

La letalidad de las soluciones PR obtenidas fue nuevamente del 100%. La dilución de estas soluciones al 20% produjo una mortalidad de 67 y 47%,

para ECT Tab y ECT N inmobilizados en CMS respectivamente. En la dilución al 10%, de las soluciones obtenidas con ambos ECT, se registró un 4% de mortalidad. Se agregó para este ensayo un control con similar cantidad de resina a la utilizada en el ensayo de remoción suspendida en solución Ringer, observándose valores menores al 5% de mortalidad.

Los resultados de toxicidad obtenidos con las diferentes soluciones PR en el test de toxicidad aguda con *R. arenarum* fueron comparados entre sí, como se muestra en la figura 38.

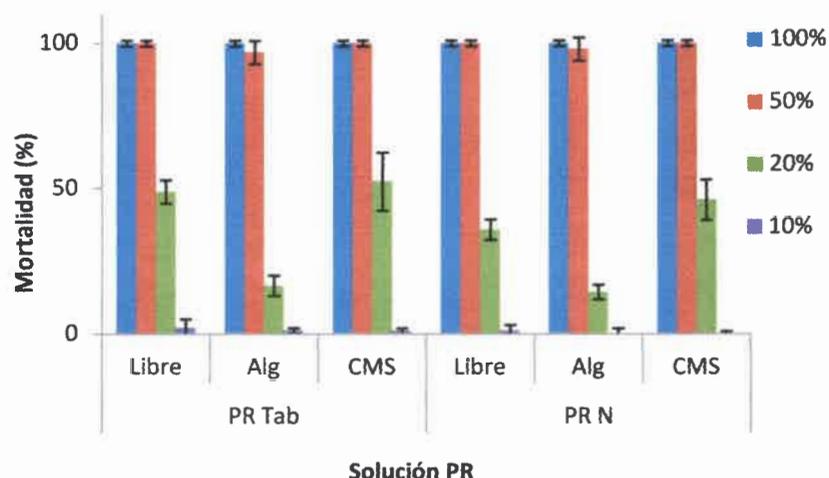


Figura 38: Mortalidad (%) de larvas de *R. arenarum* en estadio 25 de desarrollo frente a diluciones de las soluciones post-remoción obtenidas con ECT Tab y N libres e inmobilizadas.

Las soluciones PR de 2,4-DCF obtenidas con ECT Tab y N, libres o inmobilizadas en alginato de calcio y CMS produjeron un 100% de letalidad de las larvas en estadio 25 de desarrollo. Al diluir estas soluciones al 50% no se registró disminución de dicho efecto.

El porcentaje de mortalidad de las larvas expuestas a soluciones PR diluidas al 20% obtenida con enzimas libres fue mayor a la generada por las soluciones PR obtenidas con las enzimas inmobilizadas en alginato de calcio en la misma dilución. Sin embargo, la inmobilización en CMS no produjo disminución de la toxicidad. A partir de la dilución al 10%, de dichas soluciones, no se registró mortalidad de las larvas.

4.5.1.2. Evaluación de toxicidad y genotoxicidad en ratón

Debido a que el 2,4-DCF y las soluciones PR mostraron elevada toxicidad, según el test de *R. arenarum*, se decidió evaluar el efecto de estas soluciones en otro sistema biológico que podría verse afectado por la presencia de estos compuestos, como son los roedores. Para ello se utilizaron ratones Balb-C, como representantes de mamíferos que pueden consumir agua contaminada y presentar signos de toxicidad. Además, el empleo de estos animales permite determinar la genotoxicidad de la solución consumida por los animales mediante el test de inducción de micronúcleos.

Para tal fin se trataron diferentes lotes de animales según lo descrito en Materiales y Métodos. Para tener en cuenta los posibles cambios en los resultados atribuidos al sexo de los animales mantuvieron los roedores machos y hembras en jaulas separadas (OECD, 2014). Considerando que el remanente de 2,4-DCF en las distintas soluciones PR puede alcanzar los 4 mg/l se utilizó como control una solución de dicha concentración del contaminante. De esta forma se podrían discriminar los efectos tóxicos del remanente de 2,4-DCF y de sus productos de oxidación, por las peroxidasas de los ECT, en estas soluciones.

La cantidad de solución consumida es determinante en la evaluación de los efectos que podrían producirse en los animales, por lo tanto se registró diariamente su consumo por hembras y machos por separado. Los resultados se muestran en la figura 39.

De acuerdo a lo registrado diariamente, se observó que en general los ratones machos consumieron mayores volúmenes de líquido que las hembras. Por otra parte, el consumo de solución 25 mg/l de 2,4-DCF fue menor que el registrado para agua o soluciones conteniendo 4 mg/l de dicho compuesto, para ambos sexos.

El mismo efecto fue observado con ambas soluciones PR, en general los machos consumieron mayor cantidad de las soluciones correspondientes a cada tratamiento que las hembras. En el caso de la solución PR obtenida con ECT Tab el consumo registrado fue similar en machos y hembras.

Estas diferencias de consumo podría deberse del tamaño de los animales por lo cual se pesó a cada animal luego del tratamiento. Sin embargo, los pesos promedio de los ratones correspondientes a cada tratamiento no

presentaron diferencias estadísticamente significativas con los controles que consumieron agua durante el mismo periodo.

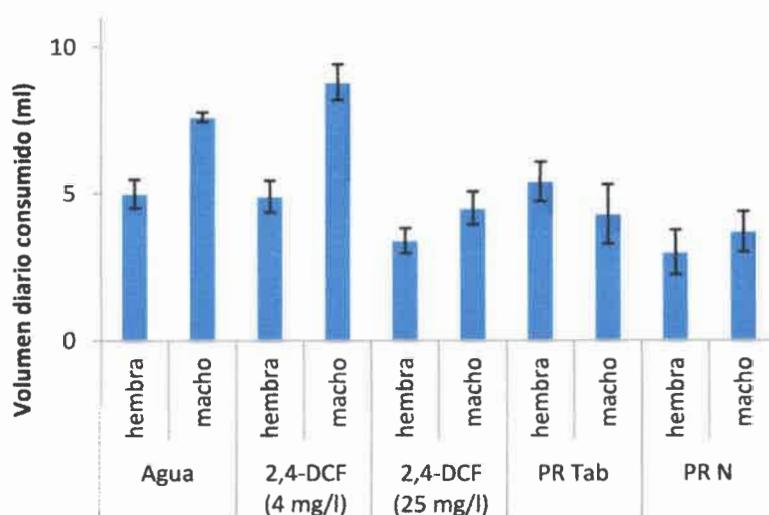


Figura 39: Consumo diario promedio (ml) de agua (control), 2,4-DCF (4 y 25 mg/l) y soluciones post-remoción (PR Tab, PR N) por ratones hembras y machos.

No se registró mortalidad de los ratones en ninguno de los tratamientos realizados, por lo cual, se procedió a sacrificar a los animales y se extrajo sangre para la realización de análisis de parámetros bioquímicos de daño hepático (determinación de actividad de la enzima Glutámico-pirúvico transaminasa (GPT)) y de daño renal (concentración de urea y creatinina en suero). Por último, se les extrajo el hígado para efectuar un análisis histopatológico. Además, en todos los tratamientos, se realizó extracción y análisis de la médula ósea de los fémures de cada ratón para el recuento de micronúcleos.

4.5.1.2.1. Análisis de parámetros bioquímicos

A partir del suero obtenido de cada ratón se realizó la determinación de actividad de la enzima GPT, como indicador de daño hepático. Los resultados se muestran en la figura 40.

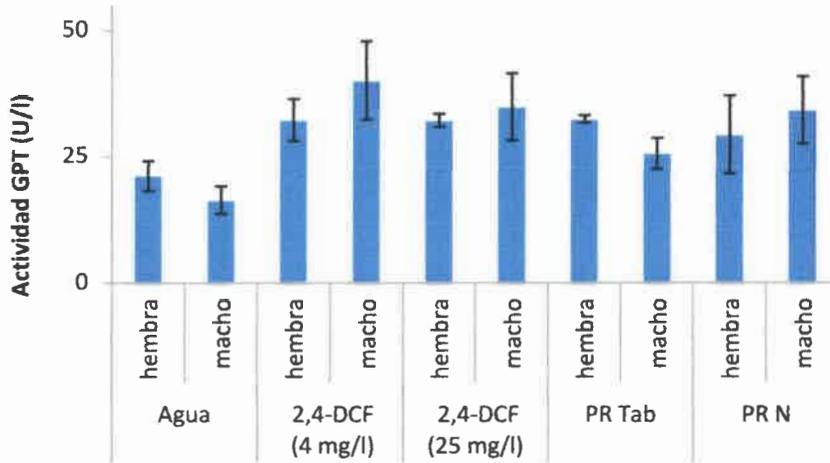


Figura 40: Actividad de la enzima GPT (U/l) en suero de ratones hembra y macho correspondientes a los tratamientos con agua (control), 2,4-DCF (4 y 25 mg/l) y soluciones post-remoción (PR Tab, PR N).

En general, la actividad de GPT fue mayor en los ratones que consumieron las distintas soluciones con respecto a los que consumieron agua, con incrementos promedio entre 38 a 145%. Los mayores niveles de esta enzima se observaron en los animales tratados con las soluciones de 2,4-DCF, que duplicaron los valores obtenidos en hembras y machos control.

Para estimar si el consumo de estas soluciones genera algún daño renal se determinaron los niveles de creatinina y urea en el suero de todos los animales. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 41 y 42.

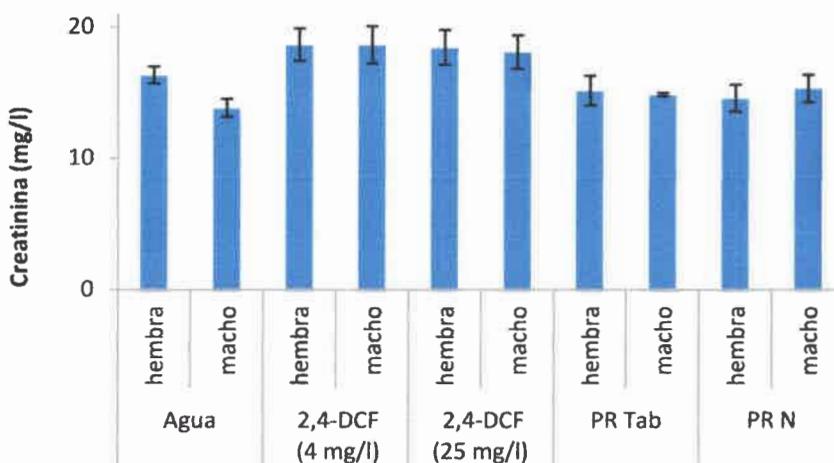


Figura 41: Concentración de creatinina (mg/l) en suero de ratones hembras y machos correspondientes a los tratamientos con agua (control), 2,4-DCF (4 y 25 mg/l) y soluciones post-remoción (PR Tab, PR N).

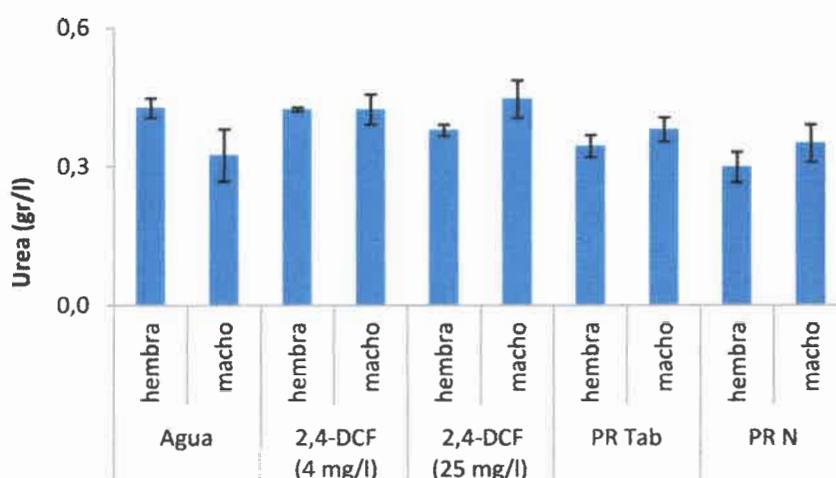


Figura 42: Concentración de urea (g/l) en suero de ratones hembras y machos correspondientes a los tratamientos con agua (control), 2,4-DCF (4 y 25 mg/l) y soluciones post-remoción (PR Tab, PR N).

Los niveles de creatinina y urea en suero de los ratones correspondientes a los distintos tratamientos no presentaron variaciones significativas con respecto a los controles. Sin embargo, en términos generales fueron menores en aquellos animales tratados con soluciones PR respecto a los tratados con soluciones de 2,4-DCF.

4.5.1.2.2. Estudio histopatológico

De acuerdo a los resultados de los estudios histopatológicos de los hígados de los ratones tratados por vía oral, no se encontraron evidencias de efectos citotóxicos o genotóxicos sobre los hepatocitos de estos animales al ser comparados con los controles (ratones sin tratamiento que solo bebieron agua destilada). En general, se observaron hepatocitos con intensa mitosis, zonas de degeneración hidrópica moderada, y algunos microabscesos con células mono y polimorfonucleares tanto en hígados de ratones controles como en los hígados de ratones tratados. La figura 43 muestra un corte histológico de hígado de un ratón tratado con 25 mg/l de 2,4-DCF, a modo de ejemplo.

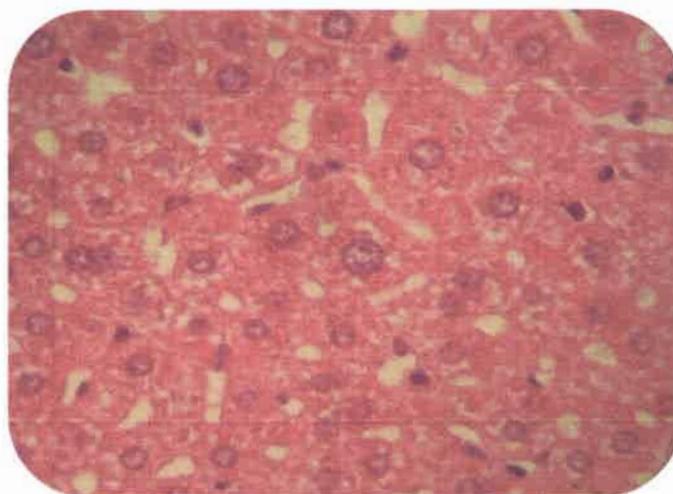


Figura 43: Fotografía de un campo de un preparado histológico de tejido hepático de ratón tratado con una solución de 2,4-DCF (25 mg/l).

4.5.1.2.3. Test de micronúcleos en médula ósea de ratón

Este test es utilizado para detectar presencia de efectos clastogénicos de distintas sustancias. Durante la maduración de las células sanguíneas, que ocurre en médula ósea, los eritrocitos pierden su núcleo, pero no pueden eliminar fragmentos cromosómicos, los cuales pueden haber sido generados por algún efecto clastogénico natural, o inducidos por algún compuesto químico. Estos fragmentos de ADN se visualizan al microscopio como micronúcleos (Figura 44).

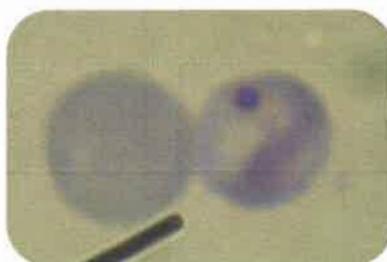


Figura 44: Fotografía de dos eritrocitos de médula ósea de ratón, uno de ellos presentando un micronúcleo.

Para estudiar el efecto de las soluciones de 2,4-DCF y sus productos de remoción se realizó el recuento de eritrocitos policromáticos (inmaduros), registrándose la cantidad de éstos que presentaron micronúcleos en un total de mil células por cada tratamiento. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 11.

Tabla 11: Micronúcleos (‰) en eritrocitos de medula ósea de ratones Balb-C correspondientes a los tratamientos con agua (control), 2,4-DCF (4 y 25 mg/l) y soluciones post-remoción (PR Tab, PR N).

| | Micronúcleos (‰) | | |
|-------------------|------------------|--------|----------|
| | Hembras | Machos | Promedio |
| Control (agua) | 0,33 | 0,38 | 0,35 |
| 2,4-DCF (4 mg/l) | 0,13 | 0,15 | 0,14 |
| 2,4-DCF (25 mg/l) | 1,40* | 1,10* | 1,25* |
| PR Tab | 0,69* | 0,53* | 0,61* |
| PR N | 0,75* | 1,50* | 1,13* |

Los asteriscos señalan las diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de los tratamientos y el control ($p \leq 0,05$) mediante prueba T.

En el grupo de ratones que consumió por 7 días la solución conteniendo 25 mg/l de 2,4-DCF se observó un incremento significativo en la cantidad de micronúcleos, con respecto al control. Sin embargo, en el caso de los animales que consumieron la solución de 2,4-DCF de menor concentración (4 mg/l) no se registro un incremento en el número de micronúcleos en relación a los que consumieron agua.

El análisis de los preparados correspondientes a los ratones que consumieron las soluciones PR mostró efectos clastogénicos en los eritrocitos, ya que la cantidad de micronúcleos registrados fue mayor a los obtenidos en el control. Sin embargo, los efectos producidos por la solución PR Tab fueron menores que los producidos por la solución de 2,4-DCF (25 mg/l) sin tratar

4.5.1.3. Ensayo de toxicidad aguda utilizando *Lactuca sativa* L

Este ensayo ha sido empleado en el monitoreo de contaminación en ríos, ya que presenta gran sensibilidad a la materia orgánica disuelta y ha sido sugerido para la evaluación de calidad de aguas por la US-EPA (Bohórquez-Echeverry y Campos-Pinilla, 2007). También se ha utilizado en la determinación de fitotoxicidad de contaminantes presentes en el suelo, y en la evaluación de la toxicidad residual de efluentes fenólicos tratados mediante

biorremediación (Sampedro y col., 2007; Valerio y col., 2007; Barrientos y col., 20028; Díaz Lopez y col., 2008; Angelini y col., 2011).

Debido a la aceptación de este test por los Organismos Internacionales y la necesidad de utilizar pruebas que involucren a organismos pertenecientes a distintos niveles tróficos se seleccionó al mismo como modelo vegetal, para estudiar la toxicidad de las soluciones PR de 2,4-DCF obtenidas con ECT de Tab y N.

Para ello se hizo germinar a semillas de *L. sativa* en presencia de soluciones PR obtenidas con ambos extractos, y soluciones control de 2,4 DCF (25 mg/l) sin encontrar efectos tóxicos sobre la germinación de las mismas (porcentajes de germinación mayores al 95%). Considerando estudios previos, en los cuales se observó que la concentración de 2,4-DCF remanente en la solución (hasta 4 mg/l) no genera efectos tóxicos sobre la germinación de las semillas de *L. sativa* (Angelini, 2010), en este estudio, se agregó como control una solución de 2,4-DCF de 10 mg/l, correspondiente a la CME.

El estado de las plántulas germinadas fue normal en todos los tratamientos, sin aparición de signos como necrosis o amarronamiento de las raíces, hipocótilos o cotiledones. A continuación, se determinaron las longitudes relativas de radículas (LRR) e hipocótilos (LRH) a fines de evidenciar los efectos subletales producidos por dichas soluciones (figura 45).

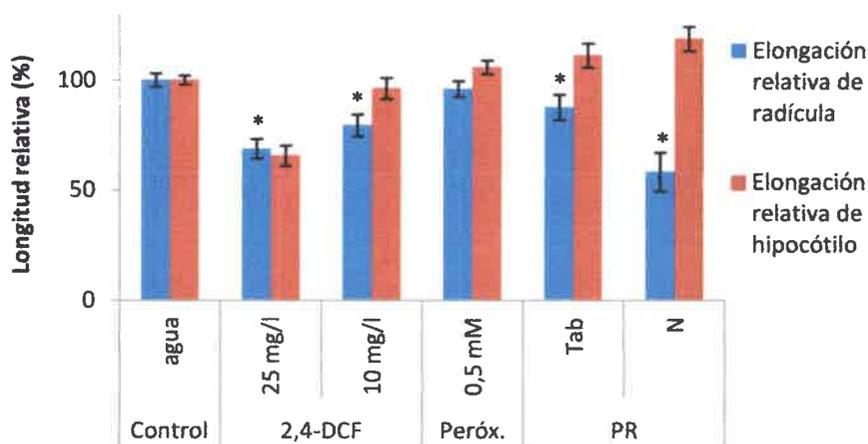


Figura 45: Longitudes relativas de radículas e hipocótilos de plántulas de *L. sativa* tratadas con agua (control), 2,4-DCF (25 y 10 mg/l), peróxido de hidrógeno (0,5 mM) y soluciones post-remoción (PR Tab, PR N).

Se pudo observar que, para las muestras evaluadas, la elongación de la radícula es un parámetro más sensible que la germinación o elongación de los hipocótilos. En este ensayo, se observó una disminución del 34% en la LRH en el tratamiento con 2,4-DCF (25 mg/l). Sin embargo, los promedios de las LRR de las plántulas de los distintos tratamientos fueron menores a los valores de las desarrolladas en agua, produciéndose efectos inhibitorios del crecimiento sobre las plántulas de *L. sativa* al germinar en presencia de las distintas soluciones.

En el caso de las soluciones de 2,4-DCF se observó una disminución relativa al control de 31 y 20 % para soluciones 25 y 10 mg/l respectivamente. Las soluciones PR Tab y N generaron una disminución de las radículas de 13 y 42% respectivamente, sin detectarse cambios significativos en la longitud de los hipocótilos.

Posteriormente se calculó el índice de germinación (IG) que permite hacer una estimación general del efecto del contaminante sobre la germinación de las plántulas. Los resultados se muestran en la figura 46.

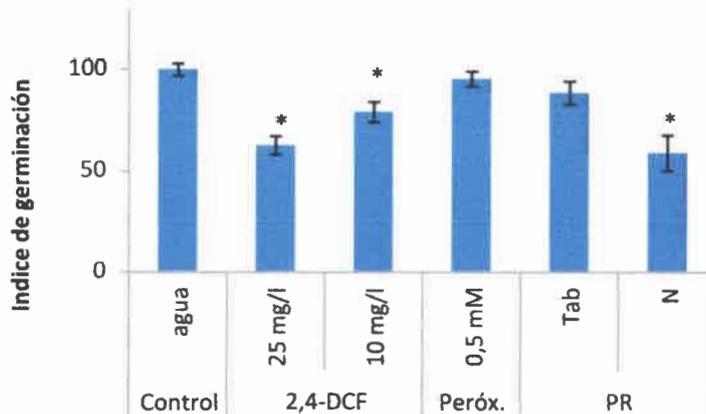


Figura 46: Índices de germinación de plántulas de *L. sativa* tratadas con agua (control), 2,4-DCF (25 y 10 mg/l), peróxido de hidrógeno (0,5 mM) y soluciones post-remoción (PR Tab, PR N).

De acuerdo a los resultados, los IG de las plántulas crecidas en soluciones conteniendo 10 y 25 mg/l de 2,4-DCF presentaron una disminución de 20 y 40% respectivamente en relación al control. Las plántulas crecidas en la solución PR obtenida con ECT N mostraron también un descenso del 40%

en dicho índice. Los resultados indican que se estarían produciendo efectos subletales en el desarrollo de dichas plántulas al crecer en presencia de soluciones de 2,4-DCF y PR N.

4.5.2. Evaluación de la toxicidad de fenol y sus productos de remoción

4.5.2.1. Determinación de efectos teratogénicos sobre el desarrollo de larvas de *R. arenarum*

Los ensayos de toxicidad aguda aplicados anteriormente no poseen la sensibilidad necesaria para la evaluación de toxicidad de soluciones conteniendo fenol o sus productos de remoción, ya que las concentraciones utilizadas en este trabajo son mucho menores a las concentraciones efectivas reportadas para este compuesto. De acuerdo a antecedentes, la CL₅₀ de fenol para larvas de *R. arenarum* en E 25 de desarrollo es de 183,7 mg/l, con una NOEC de 60 mg/l (Paisio y col., 2009). Por su parte, mediante el test de toxicidad aguda que utiliza *L. sativa* se ha descrito una CI₅₀ de 146 mg/l (Maglione, 2010).

Resultados previos de nuestro laboratorio indican que, soluciones conteniendo entre 25 y 100 mg/l de fenol generan entre 30 y 62% de anomalías morfológicas en las larvas expuestas desde estadios tempranos, sin embargo no se analizó el efecto de concentraciones menores a ese rango (Paisio y col., 2009). Por lo tanto, teniendo en cuenta estos antecedentes, se realizaron los estudios para la determinación de efectos teratogénicos de soluciones conteniendo 1 y 10 mg/l de fenol y de las soluciones PR, en larvas de *R. arenarum* durante los primeros estadios de desarrollo de estos organismos.

La exposición a las soluciones se inició cuando los óvulos ya fecundados comenzaron a dividirse por mitosis, utilizándose blastómeros de 4 células. En general, las soluciones evaluadas causaron baja mortalidad sobre los embriones, como se muestra en la figura 47.

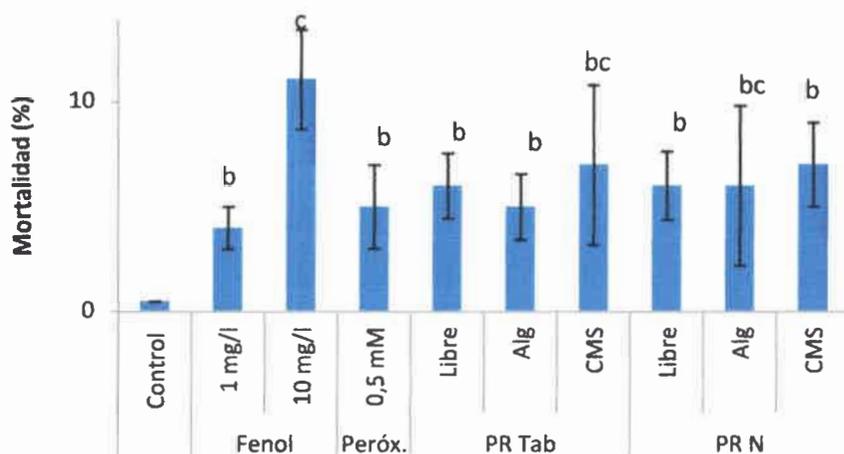


Figura 47: Mortalidad (%) de embriones expuestos a las diferentes soluciones de fenol (1-10 mg/l), peróxido de hidrógeno (0,5 mM) y soluciones PR Tab y N obtenidas con ECT libres e inmovilizados en alginato de calcio y CMS. Las letras indican diferencias estadísticas entre tratamientos mediante test de ANOVA.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la mortalidad de los embriones desarrollados en condiciones control fue del 0,5%. Las soluciones conteniendo 10 mg/l de fenol causaron un 11% de mortalidad sobre los mismos. Por su parte, las soluciones conteniendo fenol (1 mg/l), H₂O₂ (0,5 mM) y las diferentes soluciones PR produjeron, en general, una mortalidad aproximada del 6%.

Se pudieron observar anomalías en el desarrollo de las larvas expuestas a los distintos tratamientos. En varias de ellas se detectó más de un tipo de malformación. Algunas de las malformaciones comenzaron a evidenciarse mediante la aparición de gemas o vesículas sobre la superficie de algunas larvas en estadios embrionarios tempranos, como se muestra en las figuras 48 y 49 para larvas en E 15 y 18 respectivamente. Estos efectos fueron cuantificados y clasificados hacia el final del ensayo, cuando las larvas se encontraron en E 21. Algunas de las anomalías de las larvas, registradas en E 21, se muestran en la figura 50.

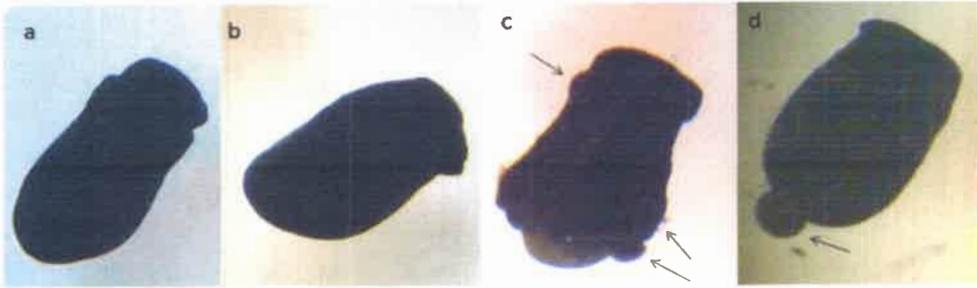


Figura 48: Larvas en estadio 15 de desarrollo (48 h), a y b) normales, c y d) larvas con gemas o protuberancias. Las flechas señalan las principales anomalías observadas.

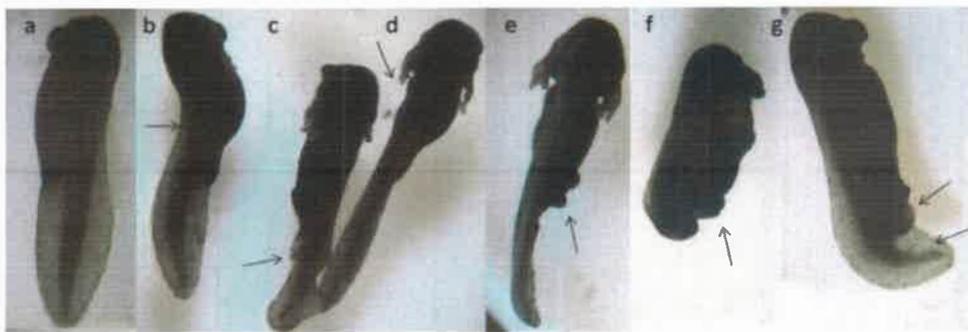


Figura 49: Larvas en estadio 18 de desarrollo (72 h), a) normales, b) curvatura axial; c) malformación en aleta caudal; d-e) larvas con vesículas y protuberancias; f-g) larvas con escaso desarrollo de cola, protuberancias y curvatura del eje axial. Las flechas señalan las principales anomalías observadas.

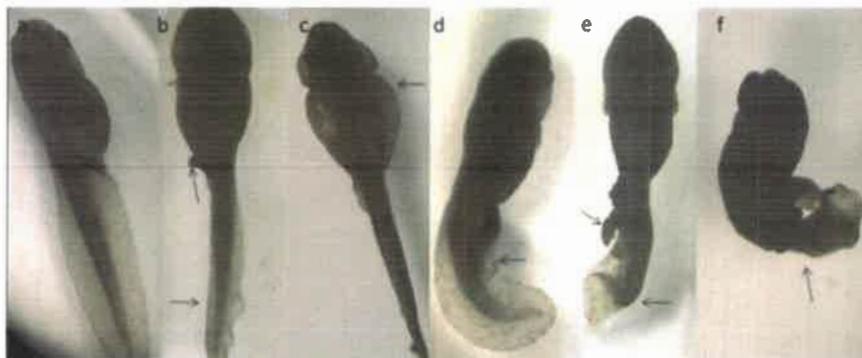


Figura 50: Larvas en estadio 21 (96 h) de desarrollo con malformaciones, a) normal, b) larva con protuberancia y alteración en aleta caudal, c) larva con edema d) larva con curvatura del eje axial e) larva con extensiones endodérmicas y desarrollo anormal de aleta caudal, f) larva con forma irregular, escaso desarrollo de aleta caudal y curvatura del eje axial. Las flechas señalan las principales anomalías observadas.

Los porcentajes de embriones que registraron malformaciones en los distintos tratamientos se muestran en la figura 51.

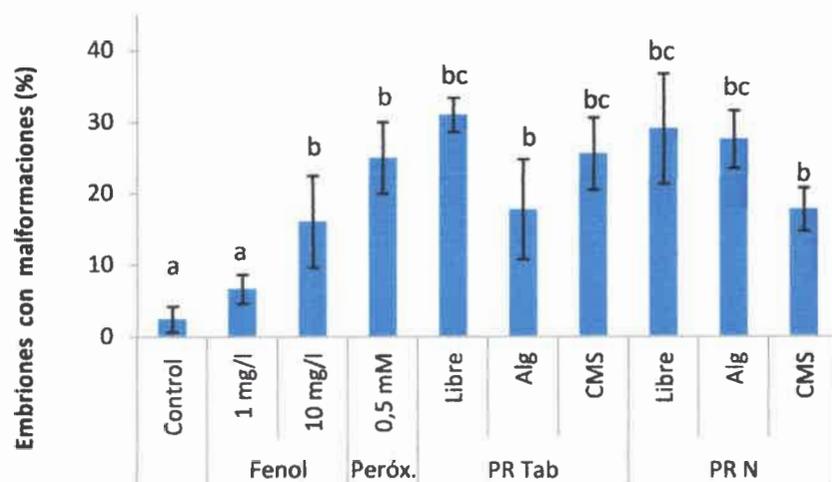


Figura 51: Embriones con malformaciones (%) presentadas en larvas en estadio 21, desarrolladas en las diferentes soluciones de fenol (1-10 mg/l), peróxido de hidrógeno (0,5 mM) y soluciones PR Tab y N obtenidas con ECT libres e inmovilizados en alginato de calcio y CMS. Las letras indican diferencias entre tratamientos.

Se pudo observar que las soluciones conteniendo 1 mg/l de fenol causaron muy bajo porcentaje de anomalías en el desarrollo de los embriones, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas con el control. Sin embargo, concentraciones de 10 mg/l produjeron efectos teratogénicos, registrándose anomalías de hasta 16% en los embriones.

La solución de H_2O_2 produjo anomalías en un 25% de los embriones, principalmente edema y subdesarrollo de la aleta caudal. Por su parte, las soluciones PR produjeron en general entre 17 y 30% de larvas con anomalías. En el caso de las soluciones PR Tab se pudo observar una disminución de la toxicidad cuando los ECT fueron inmovilizados en alginato de calcio en comparación con los ECT libres, sin producirse el mismo efecto con el ECT inmovilizado en CMS. En contraste, con ECT N se detectó una disminución de la toxicidad mediante el empleo de CMS, mientras que no se registró disminución de la toxicidad con el ECT inmovilizado en alginato de calcio.

En muchos de los casos, las larvas mostraron más de un tipo de anomalía. Los porcentajes de anomalías observados en las larvas en E 21 con los distintos tratamientos se resumen en la tabla 12.

Tabla 12: Diferentes malformaciones observadas en las larvas tratadas con soluciones de fenol (1-10 mg/l), peróxido de hidrógeno (0,5 mM) y soluciones PR Tab y N obtenidas con ECT libres e inmovilizados en alginato de calcio y CMS.

| | Fenol | | Peróx. | PR Tab | | | PR N | | |
|--------------------------------------|--------|---------|--------|--------|-----|-----|-------|-----|-----|
| | 1 mg/l | 10 mg/l | 0,5 mM | Libre | Alg | CMS | Libre | Alg | CMS |
| Edema | 33 | 59 | 98 | 67 | 25 | 6 | 80 | 100 | 100 |
| Curvatura del eje axial | 33 | 100 | 59 | 70 | 100 | 39 | 98 | 49 | 100 |
| Subdesarrollo de aleta caudal | 100 | 34 | 79 | 100 | 25 | 39 | 89 | 49 | 33 |
| Forma irregular | 0 | 6 | 39 | 0 | 0 | 29 | 45 | 0 | 30 |
| Vesículas - Extensiones | 0 | 72 | 29 | 44 | 0 | 18 | 35 | 100 | 10 |
| Inhibición del desarrollo | 0 | 67 | 20 | 11 | 100 | 19 | 18 | 49 | 0 |

(% promedio \pm ES)

Las soluciones PR Tab y N obtenidas con ECT libres generaron principalmente subdesarrollo de aleta caudal, curvatura del eje axial y edema, observándose un bajo porcentaje de vesículas y extensiones.

Por otra parte, las larvas crecidas en agua presentaron mayor tamaño y alcanzaron un estadio de desarrollo mayor en menor tiempo que las desarrolladas en los distintos tratamientos, ya que los controles alcanzaron el estadio 25 en 96 h, mientras que las larvas mantenidas en soluciones de fenol, H₂O₂ y las diferentes soluciones PR se encontraban entre el E 21 y 22.

Para poder determinar la disminución del tamaño de las larvas desarrolladas en las soluciones evaluadas se realizó la medición de las mismas, mediante el empleo de un micrómetro. Los resultados se muestran en la figura 52.

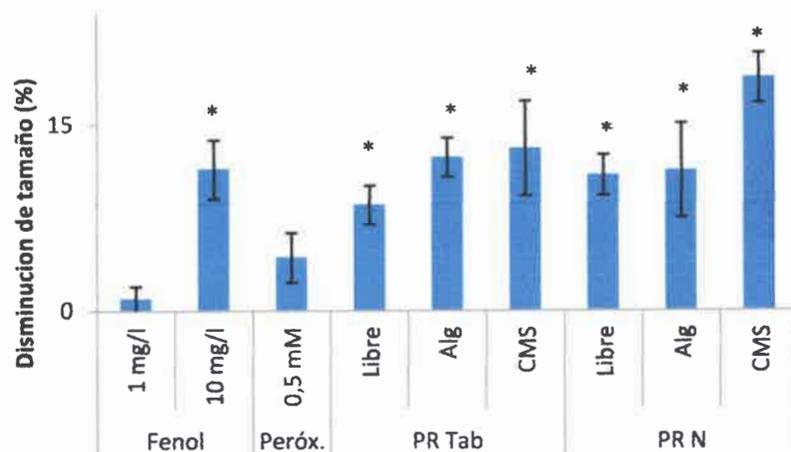


Figura 52: Disminución del tamaño (%) de larvas en estadio 21, desarrolladas en las diferentes soluciones de fenol (1-10 mg/l), peróxido de hidrógeno (0,5 mM) y soluciones PR Tab y N obtenidas con ECT libres e inmovilizados en alginato de calcio y CMS. Los asteriscos señalan diferencias estadísticamente significativas con el control.

Los resultados demuestran que efectivamente las larvas desarrolladas en las soluciones de fenol (10 mg/l), y PR obtenidas con los distintos ECT libres o inmovilizados presentaron disminución del tamaño entre 9 y 19%. De acuerdo al análisis estadístico, solamente las soluciones de fenol (1 mg/l) y de peróxido no presentan diferencias significativas con el control.

4.6. Estudio de la naturaleza química de los productos de remoción de fenol y 2,4-DCF

4.6.1. Estudios espectrofotométricos

Las peroxidasas de las raíces transformadas de tabaco y nabo removieron efectivamente fenol y 2,4-DCF, sin embargo, los resultados de los test de toxicidad revelaron la posibilidad de que se generaran nuevos productos tóxicos luego de la reacción. Considerando que no contamos con información sobre los productos obtenidos en cada reacción se iniciaron los estudios para estimar la naturaleza química de los mismos. En los medios de remoción de 2,4-DCF, se observó la aparición de un color rosado cuando se utilizaron los diferentes ECT. Sin embargo, cuando el sustrato fue fenol, se observó una tonalidad amarillo-marrón y eventualmente se detectó un precipitado marrón

oscuro o negro. Esto nos indujo a pensar que los productos de remoción de ambos compuestos fenólicos serían diferentes.

A fines de dilucidar cuáles serían los posibles productos de dichas reacciones se llevaron a cabo los espectros de absorción de 2,4-DCF y fenol, observando que tienen un pico máximo de densidad óptica (DO) a 284 y 267 nm, respectivamente (Figura 53).

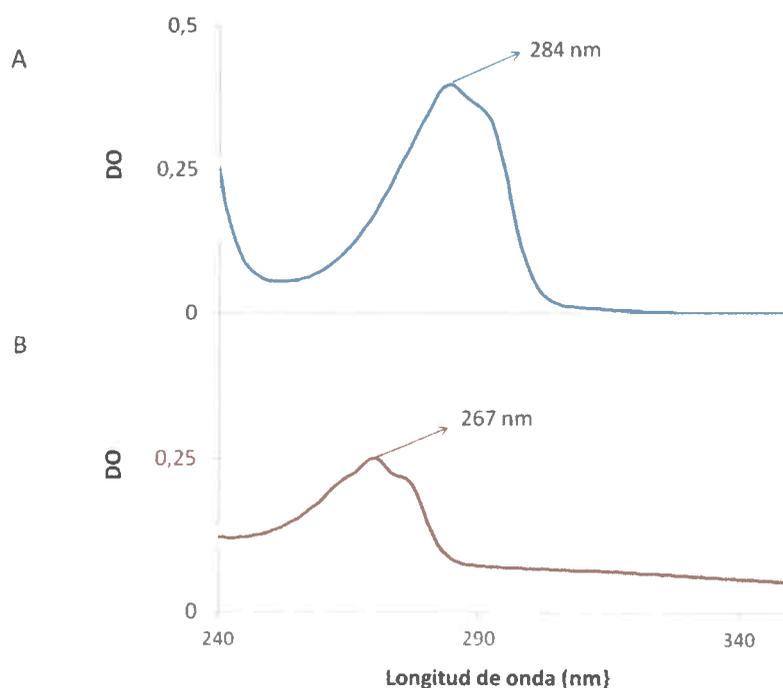


Figura 53: Espectros de absorción entre 240 y 350 nm. A) 2,4-DCF (25 mg/l). B) fenol (10 mg/l)

El agregado del co-sustrato H_2O_2 a la solución conteniendo cada compuesto fenólico (2,4-DCF, 25 mg/l o fenol, 10 mg/l) no modificó los espectros de absorción de las mismas. Con el fin de detectar los cambios de DO durante la reacción, se analizó el espectro de absorción entre 240 y 350 nm a distintos tiempos durante una hora de reacción para ambos ECT.

En la figura 54 se muestran los resultados obtenidos con extractos de raíces transformadas de tabaco y nabo respectivamente en la reacción de remoción de 2,4-DCF.

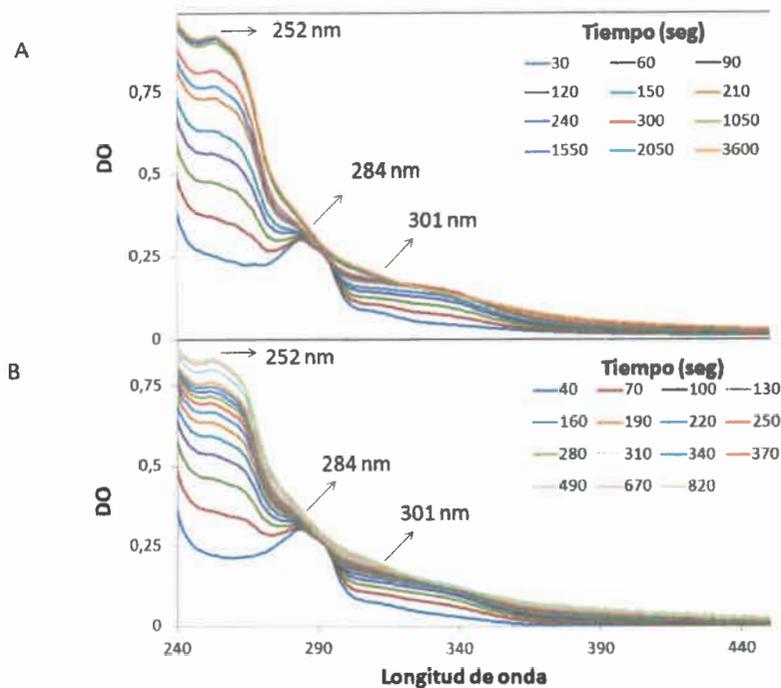


Figura 54: Cambios en el espectro de absorción de la mezcla de reacción con 25 mg/l de 2,4-DCF y 0,5 mM de H_2O_2 entre 240 y 350 nm durante 1 h. A) ECT Tab, B) ECT N

Al comienzo de la reacción (30 segundos) se encontró una baja DO a 252 nm y un único pico a 284 nm que correspondería al 2,4-DCF (dado que se superpone con el espectro de absorción de dicha sustancia). Al final de la reacción (1 h) se observó un importante aumento de la DO a 252 nm, acompañado de un incremento de menor intensidad a 301 nm, lo que podría indicar la presencia de los productos de la reacción (Hammel y Tardone 1988; Laurenti y col. 2003). El pico registrado inicialmente (284 nm), que correspondería al sustrato, incrementó levemente su valor de DO con el tiempo.

Los cambios de densidad óptica en el rango del espectro analizado fueron más notables durante los primeros 300 segundos de reacción, observándose que a medida que transcurre el tiempo estas diferencias tienden a disminuir, obteniéndose espectros prácticamente superpuestos entre sí, entre los 2050 y 3600 segundos. Para evaluar este efecto, se realizó un seguimiento de la densidad óptica a 252 y 301 nm durante la reacción de remoción de 2,4-DCF utilizando ambos extractos enzimáticos (Figura 55).

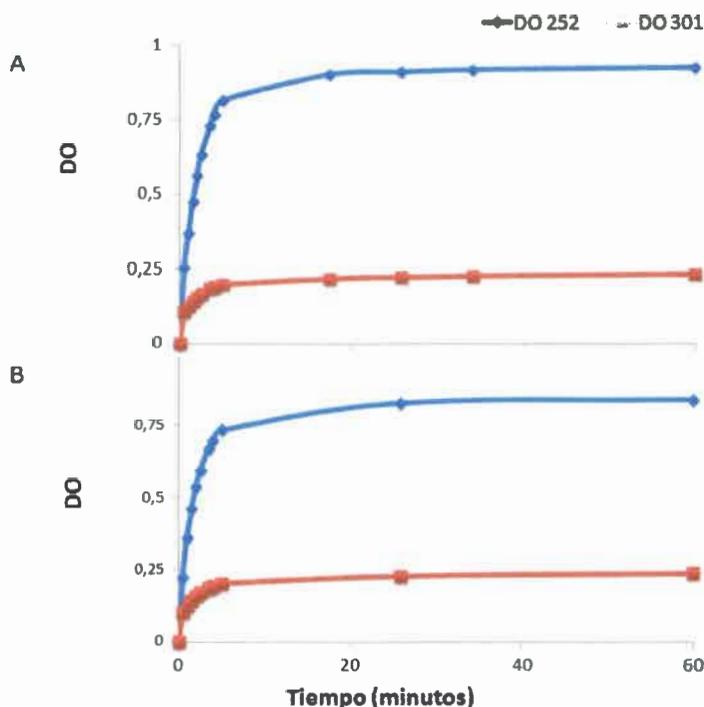


Figura 55: Variación de la densidad óptica a 252 y 301 nm en función del tiempo de remoción de 2,4-DCF (25 mg/l) con 0,5 mM de H_2O_2 y 200 U/ml de peroxidasa de A) ECT Tab, B) ECT N

De acuerdo a los gráficos obtenidos, se pudo comprobar que la reacción ocurriría muy rápidamente durante los primeros 5 minutos, hasta alcanzar una meseta alrededor de los 10-15 minutos, lo que podría indicar que la reacción llegaría a un equilibrio.

A fines de detectar si estos espectros presentan variaciones luego del periodo estudiado, se llevó a cabo la reacción de remoción de 2,4-DCF durante 1, 24 y 48 h de incubación para ambos ECT. Los resultados se muestran en la figura 56.

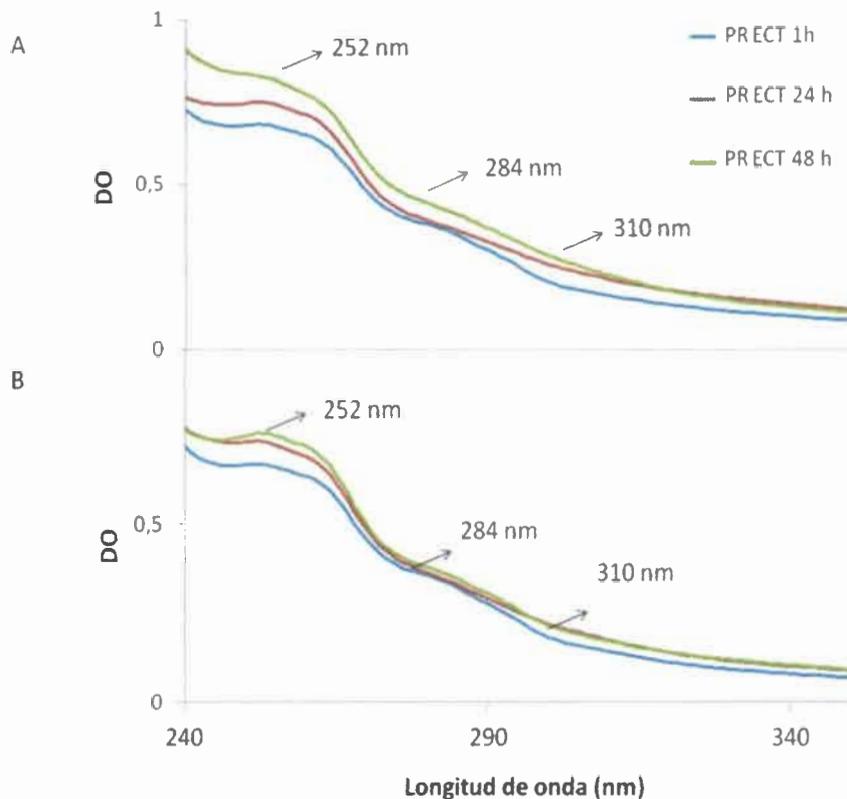


Figura 56: Espectro de absorción de la mezcla post-remoción de 2,4-DCF (25 mg/l), con 0,5 mM de H_2O_2 y 200 U/ml de peroxidasas de ECT, entre 240 y 350 nm a 1, 24 y 48 h de incubación. A) ECT Tab, B) ECT N

Se detectó un leve incremento en los valores de DO en el rango de longitud de onda analizada hasta las 48 h de incubación. Esto podría indicar que la reacción de remoción de 2,4-DCF por peroxidasas de ECT continuaría al menos durante ese lapso de tiempo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para 2,4-DCF, se realizaron los análisis espectrofotométricos para la remoción de fenol con ECT Tab y N. Se observó que la mezcla inicial de reactivos mostraba un único pico a 267 nm, correspondiente a fenol. Luego del agregado de 1000 U/ml de peroxidasas al medio de reacción se registraron cambios en el espectro de absorción. La figura 57 muestran los cambios de densidad óptica entre 240 y 450 nm en una hora de reacción para ECT Tab y N.

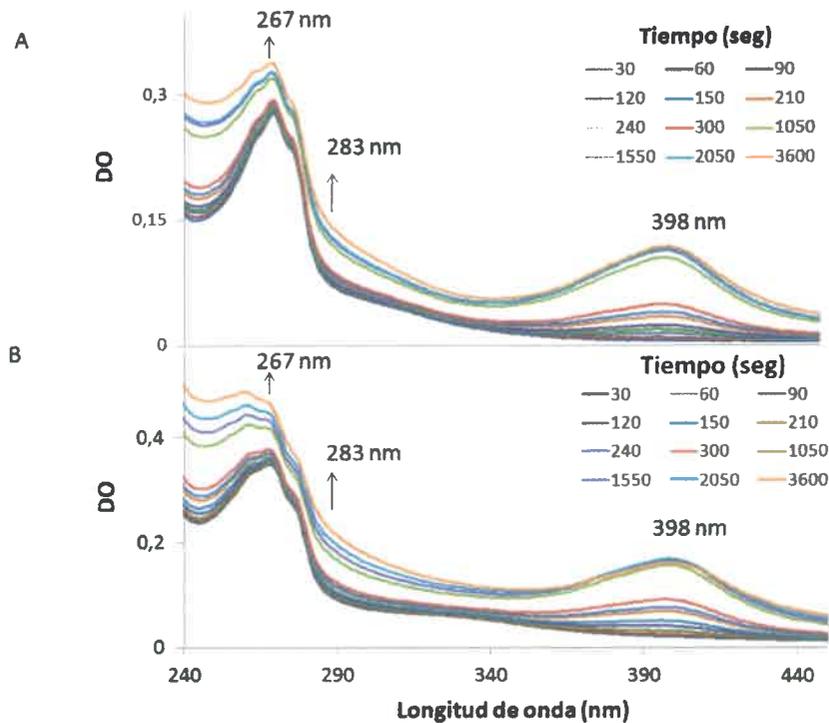


Figura 57: Cambios en el espectro de absorción de la mezcla de reacción de fenol (10 mg/l) con 1 mM de H_2O_2 y 1000 U/ml de peroxidasas de ECT, entre 240 y 450 nm durante una hora. A) ECT Tab, B) ECT N

Al comienzo de la reacción se encontró un pico a 267 nm que correspondería al fenol (dado que se superpone con el espectro de absorción de dicha sustancia). La densidad óptica se incrementó levemente con el tiempo, en todo el rango del espectro analizado, lo que podría deberse a la presencia de los productos de la reacción.

Se registró un incremento de la densidad óptica entre 240 y 283 nm con ambos ECT, acompañados de la aparición de un pico de absorción a 398 nm. Para analizar la cinética de la reacción se realizó el seguimiento del aumento de densidad óptica entre 283 y 398 nm (ya que fueron los que mostraron mayores variaciones) durante una hora de reacción (Figura 58).

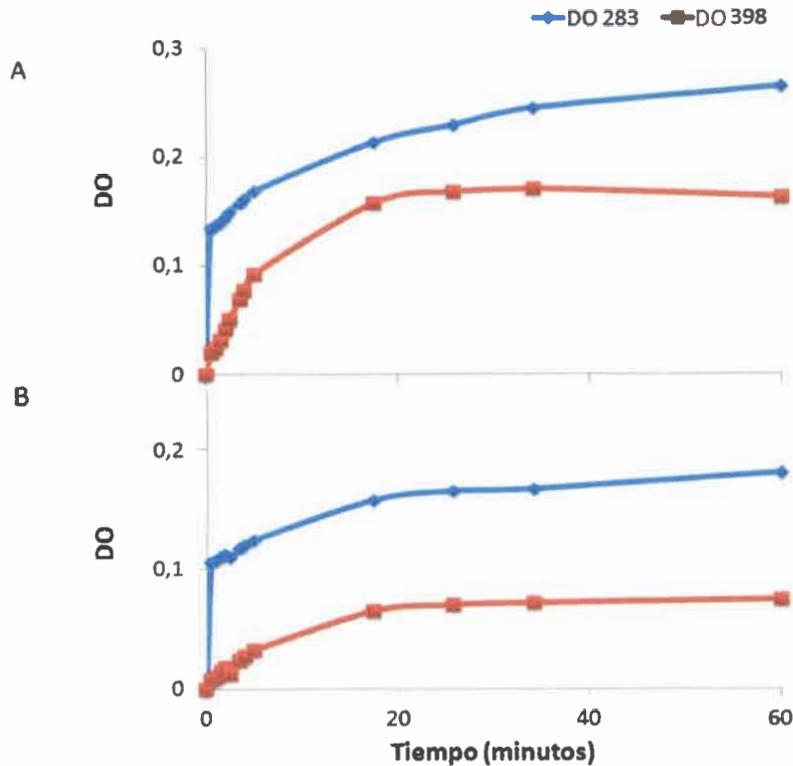


Figura 58: Variación de la densidad óptica a 283 y 398 nm en función del tiempo de remoción de fenol (10 mg/l) con 1 mM de H_2O_2 y 1000 U/ml de peroxidasas de A) PR Tab, B) PR N

Se observó que las cinéticas de las reacciones catalizadas por las peroxidasas de ambos extractos fueron similares. En ambos casos, se registraron dos etapas de reacción: durante los primeros 10 minutos hubo un incremento rápido en la DO en las longitudes de onda analizadas, lo que indicaría una elevada velocidad de reacción en dicho periodo de tiempo. Posteriormente, la DO incrementó lentamente, pero sin llegar a un estado estacionario en el periodo estudiado.

De la misma forma que lo realizado anteriormente para 2,4-DCF se analizaron los espectros de absorción de la solución PR de fenol durante 1, 24 y 48 h de reacción utilizando ECT Tab y N (Figura 59)

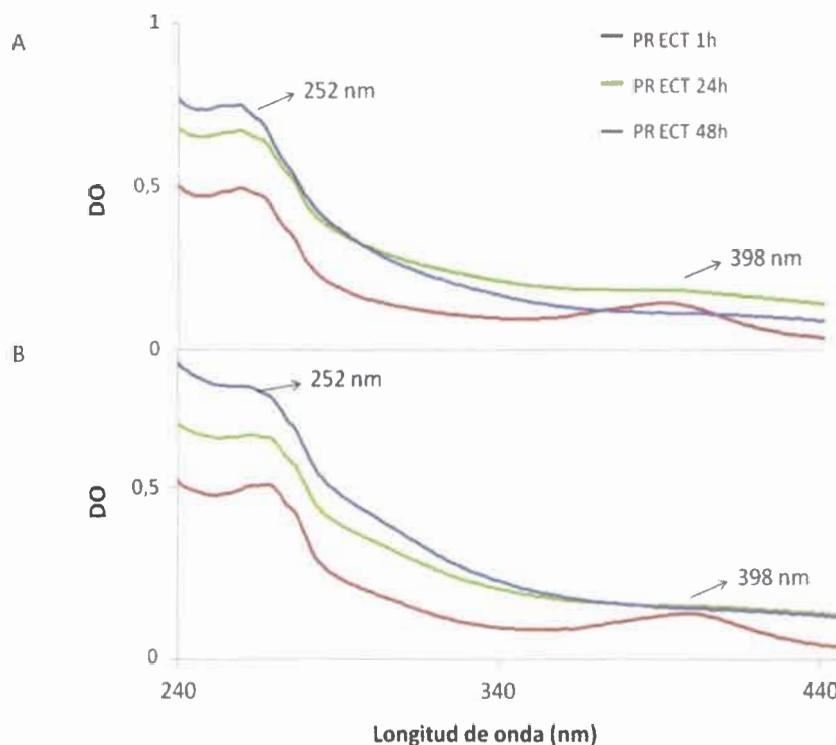


Figura 59: Espectro de absorción de la solución post-remoción de fenol (10 mg/l) con 1 mM de H_2O_2 entre 240 y 450 nm a 1, 24 y 48 h de incubación. A) PR Tab, B) PR N

La densidad óptica, en el rango del espectro analizado, incrementó incluso hasta las 48 h de reacción, disminuyendo la intensidad del pico registrado inicialmente a 398 nm. Esto podría indicar que la reacción de remoción de fenol por peroxidasas de ECT continuaría transcurriendo al menos durante ese período.

4.6.2. Estudios electroquímicos

El mecanismo redox de fenol y algunos derivados han sido estudiados por distintos autores mediante la aplicación de técnicas electroquímicas, utilizando electrodos de diferentes materiales, entre ellos oro, platino y carbono. Dentro de las técnicas electroquímicas más utilizadas se encuentra la voltamperometría cíclica. Esta técnica permitiría estimar la naturaleza química de los productos de remoción de los compuestos fenólicos.

Para ello se emplearon las soluciones control (fenol y 2,4-DCF) y las soluciones PR Tab y N en solución acuosa con NaCl 0,1 M, utilizando

electrodos de carbono vítreo, a una velocidad de barrido de 50 mV s^{-1} . Se recorrió el potencial del área de trabajo entre un potencial inicial de $-0,25 \text{ V}$ y uno final de $1,25 \text{ V}$ (escaneo positivo), al llegar al valor final se invirtió el sentido de barrido (escaneo negativo), dando como resultado una onda aplicada de forma triangular. Durante el barrido, la corriente resultante (I) medida en amperes (A) se detectó mediante un potenciostato, del cual se obtuvo un gráfico corriente-potencial denominado voltamperograma cíclico (VC). Luego de cada escaneo se limpió cuidadosamente el electrodo para evitar la adhesión de productos de reacción al mismo que pudieran atenuar o modificar su respuesta.

Las figura 60 muestra los VC obtenidos para 2,4-DCF (25 mg/l) y fenol (10 mg/l) utilizados como control y las soluciones post-remoción obtenidas con ambos ECT para cada sustrato.

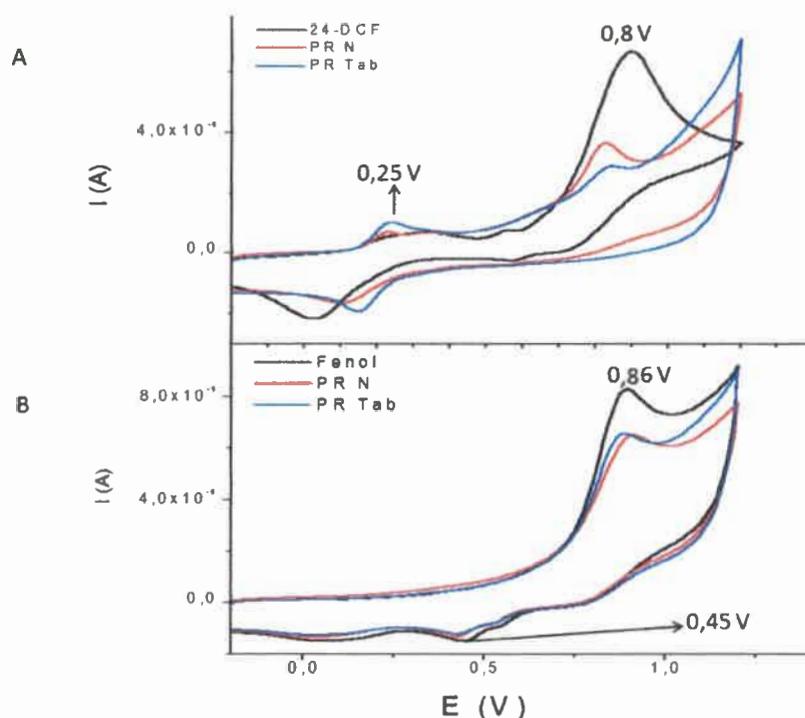


Figura 60: Voltamperogramas cíclicos entre $-0,25$ y $1,25 \text{ V}$ de las soluciones post-remoción obtenidas con ambos ECT A) 2,4-DCF (25 mg/l); B) fenol (10 mg/l).

Al analizar los sustratos puros, se pudo observar un único pico de oxidación a $0,8 \text{ V}$ para 2,4-DCF y a $0,86 \text{ V}$ para fenol al realizar el escaneo

positivo. Durante el escaneo negativo se detectaron picos a 0,3 V para 2,4-DCF y a 0,45 V para fenol.

En el análisis de las soluciones post-remoción de 2,4-DCF se observó una notable disminución de la señal a 0,8 V luego de la reacción de remoción. Por otra parte, en el escaneo negativo se detectó la aparición de picos de reducción entre 0,1 y 0,2 V en las soluciones post-remoción obtenidas con ambos ECT.

Los VC obtenidos con fenol y con las soluciones PR del mismo mostraron una disminución de la señal a 0,86 V luego de la reacción de remoción con ambos ECT. Por otra parte, los picos de reducción registrados fueron similares a los obtenidos con el sustrato puro (0,45 V), mostrando una leve disminución en la intensidad de la señal.

En la voltamperometría, los barridos pueden ser repetidos en sucesivos ciclos, sin efectuar la limpieza del electrodo entre barridos. Esta etapa fue realizada con el fin de generar la polimerización de 2,4 DCF (o fenol) sobre la superficie del electrodo y de esta manera comparar la señal obtenida con aquella proveniente de la post-remoción, con los distintos ECT (Figura 61).

Al analizar los VC de 2,4-DCF en los 2 siguientes ciclos consecutivos (que corresponderían a los primeros productos de oxidación electroquímica) se observó la aparición de dos picos catódicos a 0,25 y 0,59 V que luego disminuyeron su intensidad en los sucesivos ciclos. Además, se detectó la presencia de dos picos anódicos, uno a 0,59 V que disminuyó de intensidad a medida que incrementó el número de ciclos y otro que inicialmente se presentó a 0,1 V y luego mostró un corrimiento hacia potenciales negativos, llegando a -0,05 V en el quinto ciclo (Figura 61 A).

En el caso de fenol, en un segundo escaneo sucesivo de VC se pudo observar la aparición de dos nuevos picos catódicos (0,5 V y 0,6 V) (Figura 61 B).

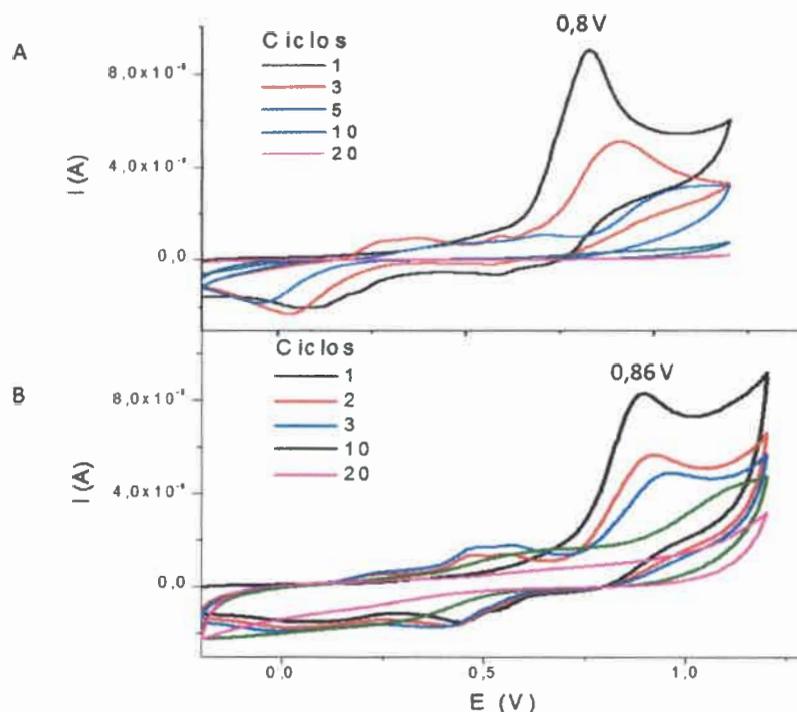


Figura 61: Voltamperogramas de ciclos sucesivos (1 a 20) entre potenciales de -0,2 y 1,2 V. A) 2,4-DCF (25 mg/l); B) fenol (10 mg/l)

En ambos casos, al realizar sucesivos ciclos se observó una disminución marcada de la señal registrada por el electrodo. Esto puede ocurrir como consecuencia de que los productos de reacción generan especies que pasivan la superficie del electrodo (posiblemente polímeros), lo cual se evidencia luego de realizar sucesivos ciclos con ambos analitos puros.

Los sucesivos ciclos de oxidación electroquímicas fueron comparados posteriormente con los VC obtenidos con las soluciones post-remoción. Para ello se seleccionaron dos de los ciclos de cada sustrato (ciclo 1 y 3 de 2,4-DCF, ciclo 1 y 2 para fenol) (Figura 62).

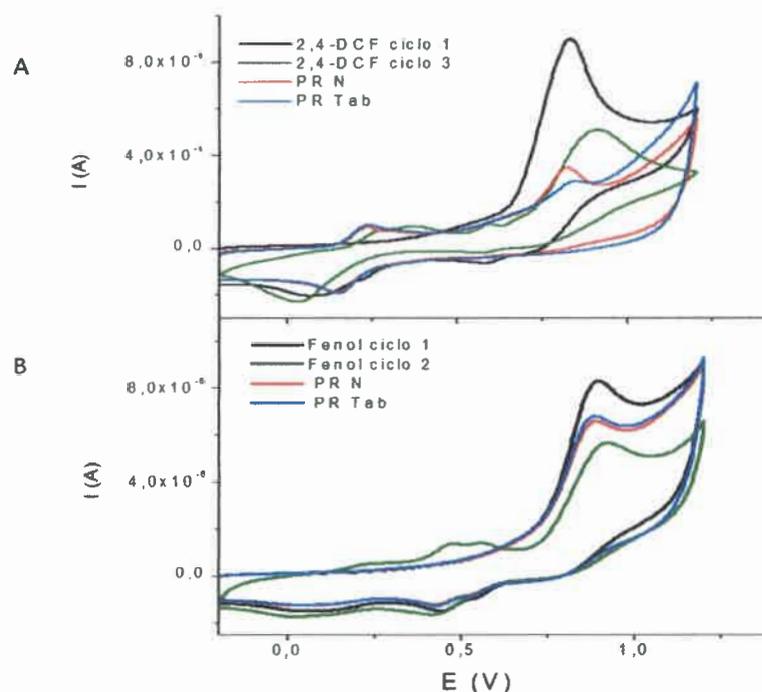


Figura 62: a) Voltamperogramas cíclicos entre potenciales de -0,2 y 1,2 V de soluciones post-remoción obtenidas con ambos ECT, comparadas con dos ciclos de oxidación electroquímica de cada sustrato puro. A) 2,4-DCF; B) fenol

Como se observó en la figura 63, existe muy poca similitud al comparar las curvas de oxidación electroquímica de 2,4-DCF con las de las soluciones post-remoción obtenidas con ECT N y Tab para dicho sustrato. Sin embargo, las curvas de oxidación de fenol se superpusieron con las obtenidas en los voltamperogramas de las soluciones post-remoción.

Para evaluar si existirían cambios en los voltamperogramas a distintos tiempos de reacción se realizaron los mismos utilizando soluciones post-remoción con 1, 24 y 48 h de incubación. En la figura 63 se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos para 2,4-DCF, fenol y las soluciones post-remoción de ambos ECT en distintos periodos de incubación.

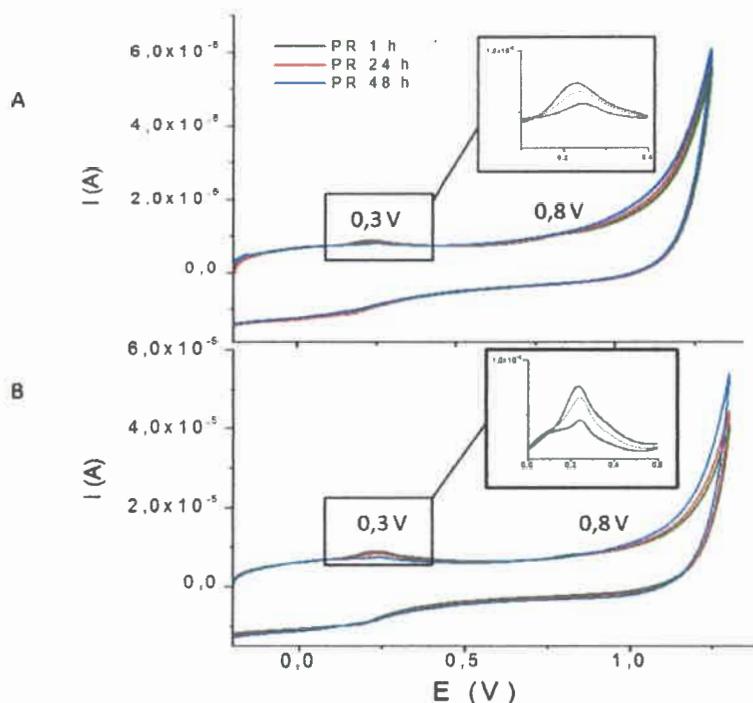


Figura 63: Voltamperogramas cíclicos entre potenciales de -0,25 y 1,25 V de las soluciones post-remoción de 2,4-DCF con 0,5 mM de H_2O_2 con ECT de 1, 24 y 48 h de incubación, A) PR Tab; B) PR N

Al analizar las soluciones PR Tab y N para 2,4-DCF se observó la disminución del pico correspondiente al sustrato puro (0,8 V), siendo dicha señal prácticamente nula a las 24 y 48 h. Como se observó en experiencias previas, esta desaparición fue acompañada con la aparición de una cupla de oxido-reducción alrededor de los 0,3 V. Esta señal también mostró una tendencia a disminuir a medida que se incrementó el tiempo de incubación de las mezclas de reacción con ambos ECT (figura ampliada).

Posteriormente se realizaron los voltamperogramas correspondientes a las soluciones PR Tab y N de fenol en los distintos periodos de incubación. Los resultados se muestran en la figura 64.

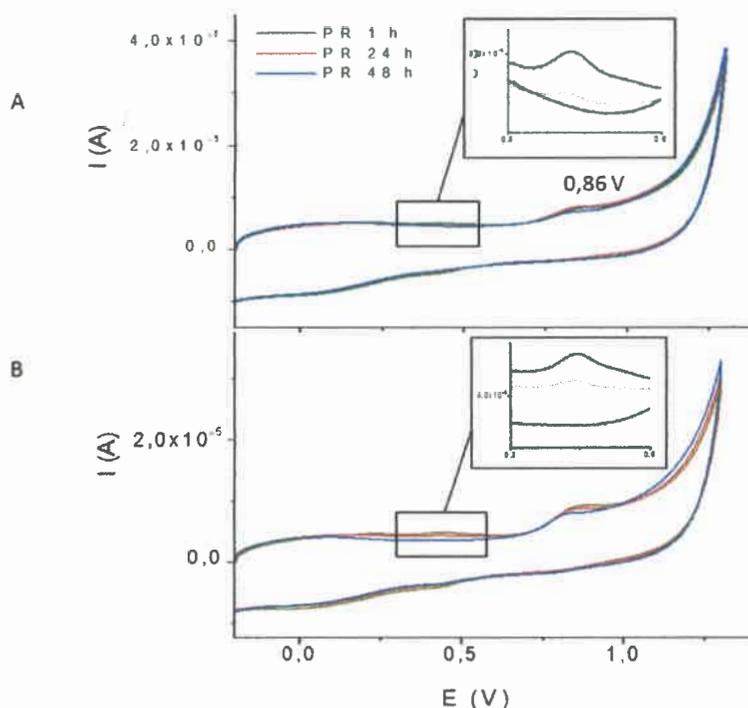


Figura 64: Voltamperogramas cíclicos entre potenciales de -0,25 y 1,25 V de la solución post-remoción de fenol con 1 mM de H_2O_2 con ECT de 1, 24 y 48 h de incubación; A) PR Tab; B) PR N

El pico inicial a 0,86 V correspondiente al sustrato pudo observarse en las distintas soluciones PR. Sin embargo, se produjo una disminución de la señal del mismo a medida que se incrementó el tiempo de incubación de las mezclas de reacción con ambos ECT. Se pudo observar la presencia de un nuevo pico en el voltamperograma a 0,4 V, el cual desapareció entre las 24 y 48 h.

Los resultados indicaron la necesidad de realizar los voltamperogramas de las reacciones de remoción a cortos tiempos de incubación, y por otra parte, observar con mayor detalle los cambios producidos en el mismo debido a la aparición de productos de la reacción de remoción de los compuestos fenólicos por las peroxidasas de ECT. Con este fin, se decidió analizar en particular la zona en donde se registrarían los picos correspondientes a los productos, realizando la VC en potenciales alrededor de 0,3 V. Debido a que el potencial aplicado no es suficiente para realizar la oxidación electroquímica de los compuestos fenólicos, no se producirían los polímeros que pasivan la superficie del electrodo, y de esta forma no es necesario realizar limpieza del electrodo entre las determinaciones. En las figura 65 se muestran los cambios entre 0,2

y 0,5 V de los voltamperogramas obtenidos en cortos periodos de incubación para las reacciones de remoción de 2,4-DCF con ECT Tab y N.

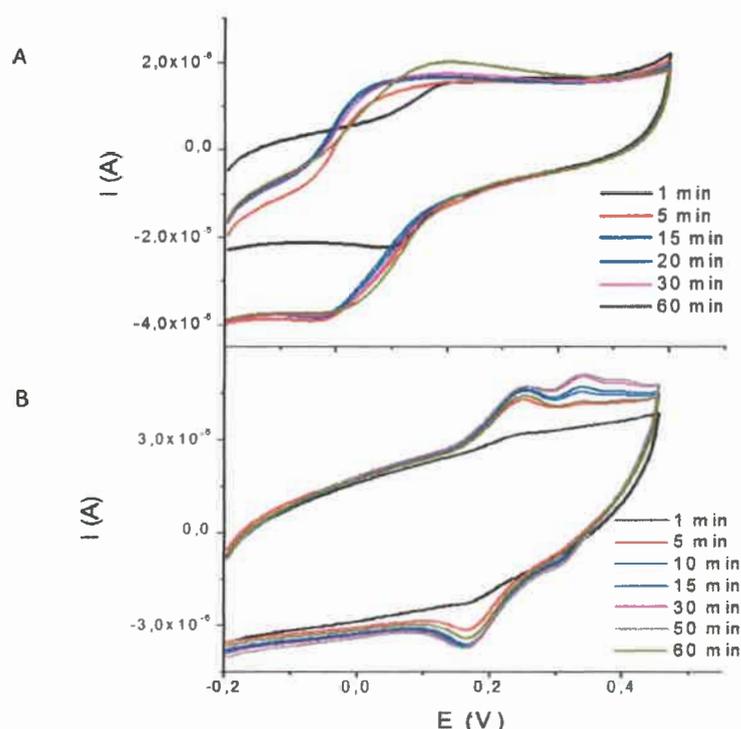


Figura 65: Voltamperogramas cíclicos entre potenciales de -0,2 y 0,5 V de la solución post-remoción de 2,4-DCF a distintos tiempos de incubación. A) PR Tab; B) PR N

Se observó la aparición de picos correspondientes a cuplas de oxidoreducción durante las reacciones de remoción, sin embargo los VC fueron diferentes para ambos ECT. En la reacción de ECT Tab con 2,4-DCF se registró una señal electroquímica, pero no fue posible identificar picos correspondientes a cuplas de óxido reducción. En el caso de la reacción de ECT N con dicho contaminante se observaron varios picos entre 0,2 y 0,4 V que variaron en intensidad durante el periodo estudiado, incrementando entre los 5 a 30 minutos y luego descendiendo nuevamente hacia los 60 minutos.

Para los VC de fenol se seleccionó un rango de -0,2 y 0,7 V que permite realizar una ampliación de la zona en donde aparecerían los productos, de acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente (Figura 66).

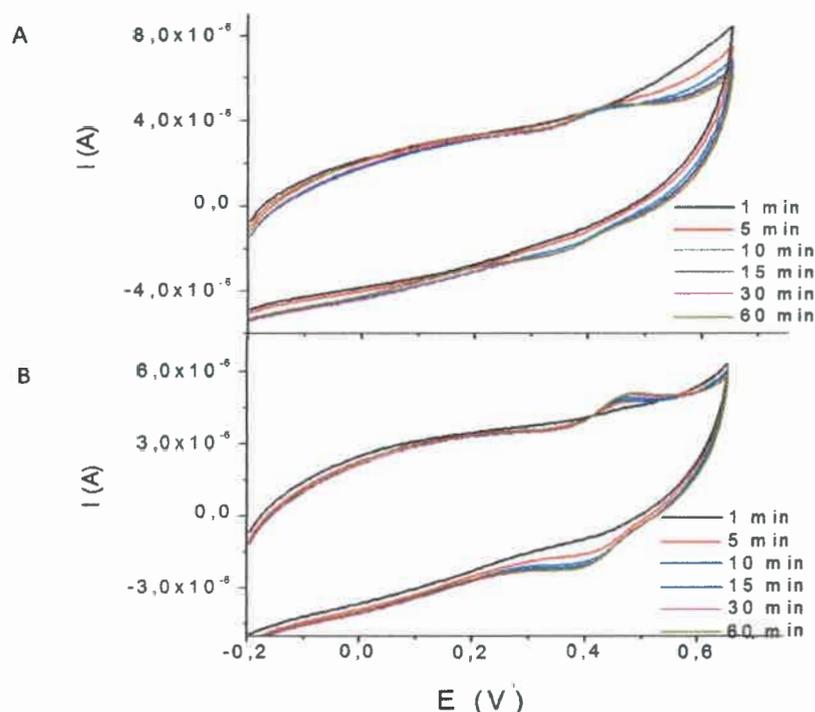


Figura 66: Voltamperogramas cíclicos entre potenciales de -0,2 y 0,7 V de la solución post-remoción de fenol a distintos tiempos de incubación. A) PR Tab; B) PR N

Durante la reacción de remoción de fenol, con ambos ECT, se detectó un pico principal de oxidación a 0,5 V con su correspondiente cupla a 0,4 V. La intensidad de los mismos se incrementó constantemente en el periodo de 60 minutos.

Los resultados sugieren que durante la remoción por peroxidasas de 2,4-DCF y fenol se obtienen productos intermedarios cuyas señales incrementan durante la primera hora de reacción, pero que posteriormente descienden, tendiendo a desaparecer entre las 24 y 48 h.

Discusión

5. Discusión

5.1. Remediación de compuestos fenólicos con ECT de raíces transformadas de tabaco y nabo

La intensa actividad antropológica, tanto agrícola como industrial ha determinado que, por descuido o por mal manejo, distintos productos contaminantes sean liberados indiscriminadamente al medioambiente, provocando daños ecológicos y a la salud humana. Esta problemática es global y se acentúa más en los países desarrollados, aunque es un problema creciente en los países en vías de desarrollo (www.unesco.org).

Entre estos contaminantes, encontramos al fenol y sus derivados halogenados, los cuales son tóxicos y recalcitrantes encontrándose ampliamente distribuidos en el medio ambiente. La contaminación con estos compuestos es un problema mundial, debido a que se los ha detectado en suelo, aire y agua, lo que causa importantes daños ecológicos. El agua, en particular, es un recurso fundamental para la vida que se encuentra cada vez más limitado debido a su contaminación.

En la actualidad la fito y bioremediación se presentan como estrategias atractivas para el tratamiento de distintos contaminantes del ambiente. Los cultivos *in vitro* de raíces transformadas de diferentes especies vegetales han mostrado un gran potencial de aplicación para eliminación de contaminantes fenólicos de medios acuosos. La remoción de estos compuestos ocurriría mediante un proceso de oxidación y polimerización catalizados por enzimas, principalmente peroxidasas. En este sentido y con el objetivo de estudiar, en esta tesis, alguna opción alternativa a los métodos tradicionales que permita la eliminación de compuestos fenólicos de aguas contaminadas, se propuso efectuar un estudio comparativo utilizando extractos totales de peroxidasas (ECT) libres e inmovilizadas, obtenidas a partir de cultivos de raíces transformadas de tabaco (Tab) y nabo (N) para la eliminación de 2,4-DCF y fenol. Estos cultivos de raíces transformadas fueron seleccionados por ser los mejor caracterizados en nuestro laboratorio en relación a las características bioquímicas de las peroxidasas de sus extractos y su implicancia en la

remoción de 2,4-DCF y fenol (Agostini y col., 2003; Coniglio y col., 2008; Sosa-Alderete y col., 2009).

Los ECT de raíces transformadas de tabaco y nabo presentaron una elevada actividad peroxidasa con valores superiores a 120×10^3 U/ml, obteniéndose una mayor actividad para los ECT de nabo y presentaron, un predominio de isoformas de peroxidasas básicas, con pI iguales o superiores a 9,6. Las distintas isoformas detectadas en estos extractos serían responsables de las diferencias de actividad peroxidasa encontradas.

Por otra parte, las peroxidasas presentes en los cultivos de raíces transformadas de las especies vegetales analizadas fueron altamente eficientes en la remoción de 2,4-DCF, que se produjo en una hora de reacción. En el caso de fenol, se obtuvieron eficiencias de aproximadamente 50%, con periodos de incubación de la mezcla de reacción de 24 h con ambos ECT. Sin embargo, las enzimas se inactivarían durante el proceso, ya que pudo detectarse muy baja actividad peroxidasa post-remoción.

Algunos autores proponen el agregado de PEG, solventes, detergentes, u otros aditivos para lograr incrementos en la actividad y eficiencia de remoción de compuestos fenólicos, con peroxidasas obtenidas a partir de rábano picante, soja y nabo (Wu y col., 1993; Ghiourelotis y Nicell 1999; Bratkovskaja y col., 2004; Quintanilla-Guerrero y col., 2008; Feng y col., 2013). Por lo tanto, se estudió el efecto del agregado de PEG-3350 al medio de reacción, el cual tendría una acción protectora sobre las mismas. El efecto de este aditivo se pudo evidenciar con un incremento en la eficiencia de remoción de fenol y 2,4-DCF, acompañado por un aumento en la actividad peroxidasa residual detectada, principalmente en el caso de ECT Tab. Nuestros resultados mostraron que el agregado de PEG-3350 al medio de reacción permitió incrementar el porcentaje de actividad peroxidasa en las soluciones post-remoción, tanto de fenol como de 2,4-DCF y con ambos ECT, lo que indicaría que los incrementos en las eficiencias observados se deberían el efecto protector del polímero.

El incremento sobre la eficiencia de remoción de 2,4-DCF y fenol producido por el agregado de PEG-3350 coincide con lo observado en trabajos previos de nuestro laboratorio y también ha sido descrito por otros autores, al remover fenoles con peroxidasas de diferentes orígenes (Bratkovskaja y col.,

2004; González y col., 2008; Husain y col., 2009). De acuerdo a los antecedentes bibliográficos, los efectos de PEG pueden ser variables. De hecho, Bódalo y col. (2006), detectaron que el PEG incrementa la eficiencia de remoción de fenol al utilizar la isoenzima comercial obtenida a partir de raíces de rábano picante (HRP) pero no en la isoenzima comercial de soja (SBP). Por otra parte, González y col. (2008), no observaron modificaciones en la eficiencia de remoción de 2,4-DCF, ni mayor actividad peroxidasa post-remoción, utilizando ECT derivados de raíces transformadas de tomate.

En nuestro trabajo, el efecto del aditivo indicaría ser de mayor relevancia en la remoción de fenol que de 2,4-DCF, ya que incrementó en un 20% la eficiencia del proceso, tanto para peroxidases de ECT Tab y N durante la primera hora de reacción y permitió obtener eficiencias de hasta 78 y 72% respectivamente luego de 24 h. Este compuesto protegería efectivamente a las peroxidases de la inactivación durante la remoción de fenol y 2,4-DCF, permitiendo la recuperación de mayor actividad enzimática después del proceso en comparación con los controles sin polímero. De acuerdo al modelo descrito por Wu y colaboradores (1998) el PEG tendría mayor afinidad de partición por los productos de reacción que por la peroxidasa que cataliza la reacción, de esta forma disminuiría la interacción de los productos de reacción con la peroxidasa, reduciendo la inactivación. Sin embargo, recientemente Mao y colaboradores (2013) han presentado las primeras evidencias que indican que mediante el agregado de PEG-3350 se protegería efectivamente al sitio activo de las peroxidases, impidiendo la destrucción del grupo hemo y la liberación del átomo de Fe del sitio activo, disminuyendo de esta forma la inactivación de las enzimas. Por lo tanto, el agregado de PEG, empleado como agente protector de enzimas, podría reducir la inactivación de las mismas durante la reacción de remoción de fenol y 2,4-DCF.

5.2. Efecto de aditivos en la remoción de compuestos fenólicos

5.2.1. Efectos de solventes y detergentes

En los diferentes efluentes que se liberan y que contienen compuestos fenólicos pueden eliminarse en forma conjunta otras sustancias, como sales, solventes, detergentes o ciertos surfactantes. Los efectos de estos aditivos han

sido estudiados a nivel bioquímico y algunos podrían considerarse como agentes activadores y/o protectores de peroxidasa, ya que evitarían la adhesión del producto de la reacción al sitio activo de la misma, durante su aplicación en bioprocesos, o inhibidores y/o inactivadores de las mismas, produciendo alteraciones en el sitio activo (Nazari y col., 2005; Kulys y Ivanec-Goranina, 2009).

En este trabajo, se evaluó el efecto del solvente orgánico dimetilformamida (DMF) y del detergente dodecil sulfato sódico (SDS) en el proceso de remoción de 2,4-DCF y fenol por peroxidasa de ECT de tabaco y nabo. El agregado de estos compuestos al medio de reacción disminuyó la eficiencia de remoción de ambos contaminantes. Además, aunque no se produjeron cambios en la eficiencia de remoción de 2,4-DCF en presencia del detergente aniónico SDS, se observó una importante disminución en la eficiencia de remoción de fenol con ambos ECT, tanto en 1 hora como en 24 h de incubación. Esta disminución en la eficiencia no se correlacionó con pérdida de la actividad enzimática luego de la reacción de remoción. Por lo tanto, estos aditivos podrían interferir con el mecanismo de acción de las enzimas, actuando posiblemente como inhibidores, disminuyendo la velocidad de transformación del sustrato (fenol o 2,4-DCF). Esto se vería reflejado en la mayor recuperación de actividad peroxidasa en las soluciones post-remoción como se detectó en la mayoría de los medios con aditivos, comparados con el control.

Los mecanismos por los cuales cada uno de los aditivos afecta a la actividad de estas enzimas son diferentes. Por ejemplo, los solventes orgánicos incrementan la solubilidad de los sustratos y productos, facilitando la obtención de polímeros de alto peso molecular, a la vez que permiten separar el polímero de la enzima, evitando el bloqueo del sitio activo, sin generar modificaciones en el sitio activo de la misma (Lu y col., 1997; Santucci y col., 2002; Kobayashi e Higashimura, 2003). Las concentraciones de estos aditivos serían el principal factor determinante de sus efectos sobre las enzimas. Por ejemplo, la presencia de DMF en concentraciones menores al 20 % v/v no afectaría o tendría efectos protectores sobre las peroxidasa, mientras que a concentraciones mayores al 20% v/v este solvente podría interferir con su actividad o producir desnaturalización (Fatima y col., 2007). En este contexto,



Santucci y colaboradores (2002), han observado que la estructura de HRP no se ve afectada con concentraciones de hasta 60% v/v de otro solvente orgánico, el dimetilsulfóxido, pero cuando dicha concentración es mayor al 70% v/v se produce desnaturalización. Esto se debe a que varios solventes pueden modificar las propiedades fisicoquímicas de las enzimas. Dichos efectos son generalmente atribuidos a alteraciones producidas por interacciones no covalentes con la proteína, incluyendo solvatación de grupos iónicos o dipolos. Estas alteraciones pueden resultar en la modificación de la estructura terciaria de la proteína y producir la desnaturalización (Lu y col., 1997).

Por su parte, los detergentes como Triton-X, SDS o polisorbato 20 (Tween 20) podrían tener un efecto protector, incrementando la eficiencia del proceso, incluso se podría generar una inmovilización reversible de la enzima con su propio precipitado, permitiendo su reactivación y reutilización (Kulys y Ivanec-Goranina, 2009; Feng y col., 2013; Thomas, 2013). Fatima y colaboradores (2007) obtuvieron un incremento de hasta el 790% en la actividad de peroxidasa de *Momordica charantia* con concentraciones de SDS entre 0,1 y 0,3 % p/v. Sin embargo, el mismo grupo de investigadores observó que con HRP, no se obtuvo incremento de actividad e incluso a concentraciones mayores a 0,3 % P/V se detectó inhibición de la misma. Por otra parte, Nazari y colaboradores, (2005b) indican que el SDS produce un efecto negativo sobre HRP, mediante inactivación de la enzima, lo cual ocurre independientemente de otros mecanismos, como son la inactivación por H_2O_2 o por los productos de la reacción.

Es importante considerar que, en general, los estudios de los efectos de solventes, detergentes o metales sobre las peroxidasas se efectúan realizando una pre-incubación y posterior determinación de actividad mediante técnicas espectrofotométricas. Estos procedimientos son diferentes a los utilizados en nuestro trabajo, ya que para observar los efectos en la remoción de fenol y 2,4-DCF, con los distintos compuestos, el contacto del aditivo con la enzima se generó directamente en el medio de reacción. De acuerdo a lo anterior, tanto el SDS como el DMF interferirían en la reacción de remoción de ambos compuestos fenólicos, disminuyendo la eficiencia de las peroxidasas de ECT Tab y N para removerlos.

5.2.2. Efecto de iones

Dentro de la estructura molecular de las peroxidasas se encuentran dos sitios de unión a Ca^{+2} , que son importantes en la estabilidad de la enzima. Los cationes bivalentes de algunos metales de transición, pueden interferir con estos sitios de unión, e incluso interactuar con las cargas negativas de la enzima, alterando su estructura, estabilidad y actividad.

De acuerdo a nuestros resultados, la presencia de iones de bicarbonato y Ni^{+2} interfieren en la reacción de remoción de compuestos fenólicos catalizada por las peroxidasas de nabo y tabaco durante la primer hora de tratamiento, disminuyendo su eficiencia. Sin embargo, al extender el tiempo de reacción a 24 h dichas eficiencias incrementaron, alcanzando, en general, a las obtenidas en los controles sin aditivos.

Se ha descrito que el catión Ni^{+2} en bajas concentraciones (menores a 5 mM) estabilizaría a HRP, evitaría la inactivación suicida de la enzima con H_2O_2 y produciría incremento en la actividad de dicha enzima. Sin embargo, el efecto cambiaría de acuerdo a la concentración del catión metálico, produciendo cambios reversibles en la estructura de las enzimas con concentraciones mayores a 5 mM, debido a la unión electrostática de los cationes a los sitios con carga negativa de la enzima y la repulsión que se genera por el exceso de cargas positivas (Mahomoudi y col., 2003; Nazari y col., 2005a).

El efecto del catión Cu^{+2} puede explicarse de forma similar al Ni^{+2} , sin embargo, solo se observó disminución de la eficiencia de remoción de fenol y 2,4-DCF al utilizar ECT N. Además, en las condiciones utilizadas en este trabajo se pudo observar que este catión produjo un incremento en la actividad peroxidasa post-remoción. Esto podría deberse a que el Cu^{+2} tiene un alto potencial de unión a peroxidasas, tanto en la parte proteica como en el grupo hemo y genera cambios estructurales aún en concentraciones muy bajas (0,37 mM) (Mahomoudi y col., 2003; Lan y col., 2007).

Los efectos de Ni^{+2} , Cu^{+2} al igual que el de otros cationes metálicos, entre ellos V^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2} o Cd^{+2} han sido estudiados por distintos grupos de investigación, observándose que en general, todos tienen potencial de unión a las peroxidasas y generarían dos tipos de efectos, uno positivo (estimulador/activador) y otro negativo, mediante inhibición (pudiendo actuar como inhibidores competitivos, no competitivos o mixtos) y/o desnaturalización

(Serra y col., 1992; Mahomoudi y col., 2003; Keyhani y col., 2003, Nazari y col., 2005a; Asgher y col., 2012). Por otra parte, los posibles efectos generados por estos cationes no solo dependen de la concentración, sino que también es muy importante el tiempo de incubación o de la exposición de la enzima (Keyhani y col., 2003).

Es sustancial considerar que estos aditivos pueden estar presentes en aguas contaminadas o efluentes industriales en concentraciones muy variables por lo que estos estudios deberían realizarse en función de las características del efluente o solución contaminada que contenga fenoles, entre otros compuestos. El agregado de algunos agentes protectores, así como la inmovilización enzimática, podrían evitar los efectos negativos de solventes, detergentes o iones sobre la eficiencia de las peroxidasas durante los procesos de remoción en medios con más de un tipo de contaminante.

5.3. Ensayos de remoción de 2,4-DCF y fenol con enzimas inmovilizadas

La inmovilización de las peroxidasas de los ECT se efectuó mediante el empleo de dos soportes, la resina de intercambio catiónico carboximetil sephadex (CMS) y la encapsulación en alginato de calcio. De acuerdo a los resultados, con el primero de los soportes, se inmovilizó efectivamente un 28-29% de las peroxidasas de ECT Tab y N, las cuales corresponderían a la fracción de peroxidasas catiónicas presentes en ambos ECT. Por su parte, mediante la encapsulación en alginato de calcio se inmovilizó el total de las enzimas contenidas en los ECT, pudiendo incorporarse el aditivo PEG-3350 a las mismas.

Las peroxidasas inmovilizadas mantuvieron su actividad catalítica. Sin embargo, al determinar los parámetros cinéticos $K_{m_{ap}}$ y $V_{max_{ap}}$, utilizando guayacol como sustrato, se observaron diferencias entre los valores obtenidos con las enzimas libres o inmovilizadas con CMS. Los $K_{m_{ap}}$ de las peroxidasas inmovilizadas fueron mayores a los obtenidos con las enzimas libres, indicando una disminución en la afinidad de las enzimas por el sustrato. Por su parte, se registró una disminución en el valor de $V_{max_{ap}}$. Estas variaciones en los parámetros cinéticos de las peroxidasas luego de la inmovilización coinciden con lo observado por distintos autores. Por ejemplo, Fernandes y colaboradores (2004) observaron una disminución de los parámetros $K_{m_{ap}}$ y

$V_{max_{ap}}$ de HRP inmovilizada en polianilina con respecto a la enzima libre. El mismo efecto fue observado por Asgher y colaboradores (2012) al inmovilizar una lignina peroxidasa en una matriz de xerogel. Por su parte, Bayramoğlu y colaboradores (2011), inmovilizaron covalentemente una cloroperoxidasa en membranas de un polímero hidrofílico, registrando mayores $K_{m_{ap}}$ y menores $V_{max_{ap}}$ en relación a la enzima libre.

Las peroxidases de ECT Tab y N inmovilizadas en CMS y alginato de calcio fueron utilizadas para la remoción de 2,4-DCF (25 mg/l) y fenol (10 mg/l).

La mayor parte de la remoción de 2,4-DCF ocurrió durante la primera hora de reacción. Las enzimas inmovilizadas en CMS alcanzaron las eficiencias más elevadas en corto tiempo, con un incremento del 15% de eficiencia respecto a las enzimas libres. Sin embargo, luego de 24 h de incubación los dos sistemas de inmovilización utilizados alcanzaron similares eficiencias, que fueron superiores a las de las enzimas libres. La presencia de PEG en el interior de las cápsulas no produjo efectos en la remoción de 2,4-DCF.

Debido que para obtener elevadas eficiencias de remoción de fenol se necesitan periodos de incubación más prolongados se realizó la experiencia determinando dichas eficiencias luego de 24 y 48 h de reacción. Se encontró mayor eficiencia de remoción con enzimas inmovilizadas en CMS, para ambos tiempos estudiados. Las enzimas inmovilizadas en alginato de calcio con PEG-3350 también removieron eficientemente al contaminante, principalmente luego de 48 h.

Un efecto similar ha sido observado por Akhtar y Husain (2006) con una peroxidasa de *Momordica charantia* inmovilizada en una resina (Sephadex-G 50). En dicho estudio, se obtuvo una eficiencia de remoción de 2,4-DCF (1mM) de 58% comparada con el 44% obtenida por la peroxidasa no inmovilizada, lo que se repitió con fenol y otros compuestos fenólicos. Otros autores han utilizado resinas para inmovilizar peroxidases de tomate, nabo o rábano blanco, obteniendo eficiencias entre 50 y 90% para la remoción de distintos colorantes (Husain y Ulber, 2011).

Si bien la aplicación de enzimas inmovilizadas en cápsulas de alginato de calcio es un proceso más lento para la eliminación del contaminante, tendría como ventajas la posibilidad de recuperar y reutilizar fácilmente las cápsulas

además de ofrecer la oportunidad de inmovilizar las enzimas, en conjunto, con agentes protectores, con la finalidad de aumentar su vida media y la eficiencia del sistema (Trivedi y col., 2006; Quintanilla-Guerrero y col. 2008; Matto y Husain, 2009a; 2009b; Alemzadeh y Nejati, 2009). El incremento en la eficiencia de remoción de fenol observado mediante el agregado de PEG a los ECT N inmovilizados en alginato de calcio concuerda con resultados de Quintanilla-Guerrero, y colaboradores (2008), que utilizaron peroxidasas de tubérculos de nabo inmovilizadas en el mismo soporte.

Asimismo, Alemzadeh y Nejati (2009) obtuvieron elevadas eficiencias de remoción de fenol, luego de 3 horas de reacción con HRP inmovilizada en alginato de calcio. Sin embargo, la eficiencia de la enzima inmovilizada fue menor a la misma en estado libre. Por otra parte, Trivedi y colaboradores (2006) utilizando un sistema de recirculación en columnas, rellenas con cápsulas de alginato de calcio conteniendo SBP, lograron la remoción de una solución 1 mM (94,11 mg/l) de fenol con una eficiencia del 54%, mientras que otros autores han logrado eficiencias entre 90 y 99% de remoción de fenol y otros compuestos fenólicos utilizando alginato de calcio como soporte para HRP y peroxidasas de nabo (Husain y Ulber, 2011).

El oscurecimiento de las cápsulas de alginato durante la remoción de ambos compuestos fenólicos podría deberse a la presencia de productos de reacción adsorbidos o contenidos en el interior de la misma. Este resultado es de particular interés, debido a que se podría lograr la eliminación conjunta del contaminante y de los polímeros formados durante su oxidación.

En resumen, las elevadas eficiencias de remoción obtenidas con peroxidasas de ECT de raíces transformadas de tabaco y nabo inmovilizadas sobre resinas de intercambio catiónico o en cápsulas de alginato de calcio (hasta 90%) indicarían que dichas enzimas mantendrían sus características estructurales y propiedades catalíticas, siendo la inmovilización una estrategia adecuada para optimizar el proceso.

5.4. Evaluación de la toxicidad de soluciones de 2,4-DCF, fenol y post-remoción

Numerosos antecedentes bibliográficos demuestran que es necesario utilizar ensayos de toxicidad que involucren diferentes organismos, en lo

posible que correspondan a distintos niveles tróficos, para obtener resultados complementarios que permitan una mejor estimación del impacto ambiental. En este sentido, en el presente trabajo se evaluó la toxicidad de los contaminantes y sus correspondientes soluciones tratadas con ECT de raíces transformadas de tabaco y nabo mediante el uso de anfibios (*R. arenarum*), roedores (ratones Balb-C) y plantas (*L. sativa*).

5.4.1. Toxicidad de 2,4-DCF y fenol

Nuestros resultados muestran que los efectos tóxicos del 2,4-DCF variaron notablemente de acuerdo al organismo en estudio. Mientras que la solución conteniendo 25 mg/l de 2,4-DCF produjo efectos subletales en la germinación de semillas de *L. sativa*, esta misma concentración causó un 100% de mortalidad en larvas de *R. arenarum* en E 25 registrándose una CL₅₀ de 5,4 mg/l. Además, la ingestión de soluciones conteniendo 25 mg/l de 2,4-DCF produjo un incremento en la cantidad de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea de murinos. Esto indicaría la ocurrencia de efectos clastogénicos sobre dichas células producidos por 2,4-DCF al ser incorporado al metabolismo del animal. Este resultado es consistente con los obtenidos en estudios previos de nuestro laboratorio, en los cuales, utilizando el test de *Allium cepa*, se ha demostrado que soluciones conteniendo 25 mg/l de este compuesto generan, una intensa necrosis en las raíces, produciendo, a menores concentraciones, un incremento en el índice de aberraciones cromosómicas en las células mitóticas de meristemas radicales (Angelini, 2010).

Por su parte, los efectos ecotoxicológicos del fenol son variables y no solo dependen de la concentración sino del organismo evaluado. En este trabajo, se han observado efectos teratogénicos sobre embriones de *R. arenarum* en estadios tempranos de desarrollo expuestos a soluciones conteniendo 1 y 10 mg/l de fenol. Estos resultados indican la posibilidad de que ocurran efectos citotóxicos y genotóxicos a muy bajas concentraciones de este contaminante, y están de acuerdo con lo descrito para otros organismos eucariotas, en donde se ha reportado que soluciones de 10 mg/l de fenol causan una leve disminución del índice mitótico acompañado de un incremento de aberraciones cromosómicas en células de meristema radical de *A. cepa* (Gonzalez y col., 2012). Sin embargo, dicha concentración del compuesto no generó efectos

tóxicos según el test de toxicidad aguda con *L. sativa*, o con larvas *R. arenarum* en E 25, *Vibrio fischeri* y *Selenastrum capricornutum* (Chen y Lin, 2006; Paisio y col., 2009; Maglione, 2010; Saylor y col., 2013).

En general, la toxicidad del 2,4-DCF es mayor a la reportada para el fenol, mediante el empleo de diferentes ensayos biológicos. Las CE o CL₅₀ de 2,4-DCF se encuentran en un rango de 2 a 51 mg/l (Saylor y col., 2013; Talano y col., 2012; Angelini y col., 2014), mientras que las de fenol se encuentran entre 20 a 318,4 mg/l, habiéndose reportado efectos tóxicos sobre distintos organismos en concentraciones desde 0,04 mg/l (Paisio y col., 2009; 2010; González y col. 2012; Paisio, 2013 y citas contenidas en este trabajo; Saylor y col., 2013). Este análisis permite comprender la importancia de una correcta selección del test de toxicidad a aplicar, considerando no solamente la composición química de las soluciones a evaluar sino también la sensibilidad de los organismos involucrados en cada uno de los distintos ensayos.

5.4.2. Toxicidad del peróxido de hidrógeno

Este compuesto está relacionado a la respuesta natural al estrés de las células de organismos aeróbicos. Forma parte de las especies reactivas del oxígeno (EROs), las cuales son producidas constantemente en los organismos vivos durante su normal metabolismo, regulando fisiológicamente diversas funciones celulares. Sin embargo, ante la presencia de contaminantes o exceso de EROs se genera un estrés oxidativo, el cual modifica la homeostasis redox y causa daños celulares e induce a la apoptosis. Esto ocurre porque, si bien las células poseen un sistema antioxidante, el cual se activa como respuesta a la presencia de EROs, muchas veces no es suficiente para contrarrestar la presencia de excesos de estos compuestos. Debido a esto, numerosos organismos son susceptibles a la presencia de H₂O₂ en el medio ambiente. Estos mecanismos han sido descritos en plantas (Gill y Tuteja, 2010).

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la solución conteniendo 0,5 mM de H₂O₂ no produjo efectos tóxicos agudos sobre larvas de *R. arenarum* en E 25 o sobre la germinación y desarrollo de *L. sativa*. Sin embargo, esta solución generó efectos tóxicos y teratogénicos en embriones de *R. arenarum* expuestos a la misma desde los primeros estadios embrionarios, produciendo un 5% de mortalidad y un 25% de anomalías en el desarrollo.

Este dato es de particular importancia, dado que este compuesto está presente en los medios de remoción de los compuestos fenólicos (2,4-DCF y fenol) y, aunque es utilizado durante la reacción, puede quedar un remanente de H_2O_2 en las soluciones PR. En general, en las soluciones PR de 2,4-DCF el H_2O_2 residual es muy bajo (concentraciones entre 1 y 2 mM), sin embargo, las soluciones PR de fenol pueden presentar concentraciones mayores de este compuesto, ya que la concentración inicial del mismo en el medio de remoción es de 1 mM. Por lo tanto, la presencia de H_2O_2 residual en las soluciones PR podría contribuir a incrementar la toxicidad de las mismas.

Al respecto, se ha descrito que los organismos de vida acuática, tales como los embriones y larvas de los anfibios, son altamente sensibles al estrés oxidativo. En los mismos, la transmisión de señales en el sistema nervioso central, así como la unión del ligando a los receptores de membrana, el acoplamiento de receptores a proteínas y enzimas efectoras pueden verse muy afectados por el estrés oxidativo (Stokert y Herkovits, 2003; Mussi y Calcaterra, 2010).

Además, se conoce que el H_2O_2 es tóxico para las algas marinas (CL_{50} 0,025 mM), para *Daphnia magna* (CE_{50} 0,22 mM), para el salmón Coho (CL_{50} 0,29 mM) para bacterias (CE_{50} 0,88 mM) y larvas en E 25 de *R. arenarum* (CL_{50} 0,98 mM) (Meinertz y col., 2008; Maglione, 2010 y citas contenidas en este trabajo; Paisio y col., 2010). Como se puede observar, la toxicidad del H_2O_2 es variable, dependiendo de la concentración y el organismo de prueba, como también fue observado en este trabajo, de ahí la importancia de su determinación para cada sistema experimental.

5.4.3. Toxicidad de las soluciones post-remoción de 2,4-DCF

Una vez conocida la toxicidad de los compuestos utilizados para la remoción, como así también la de los propios contaminantes, fue necesario evaluar la toxicidad de las soluciones PR obtenidas luego del tratamiento con las peroxidasas de los ECT, tanto libres como inmovilizados. Así, teniendo en cuenta que como consecuencia de las reacciones de remoción se forma una mezcla compleja de intermediarios solubles y que existen dificultades para su identificación, resultó de gran interés realizar diferentes test de toxicidad para confirmar o no el efecto “detoxificante”.

Los resultados obtenidos mediante el test de toxicidad aguda de *R. arenarum* demostraron que luego de la remoción de 2,4-DCF con peroxidasas de raíces transformadas de tabaco y nabo se registraría una elevada toxicidad, que afectaría la sobrevivencia de renacuajos en E 25.

Como estrategia biotecnológica viable para reducir la toxicidad se realizó la inmovilización de los ECT en cápsulas de alginato de calcio y en la resina CMS. La inmovilización en cápsulas alginato de calcio permitió disminuir la toxicidad con respecto a la obtenida con los ECT libres, lo que podría atribuirse a la adsorción de los sustratos y productos de la reacción sobre la matriz de alginato. Sin embargo, no se registró el mismo efecto con los ECT inmovilizados en CMS, por lo que se puede estimar que el/los producto/s tóxico/s permanecerían soluble en estas soluciones.

La toxicidad observada de las soluciones PR podría deberse a los productos formados en la reacción de remoción, o a efectos sinérgicos entre los remanentes de los sustratos y los productos de reacción. Esto ha sido descrito por otros autores, que indican que los efectos de mezclas de compuestos pueden afectar de diferentes formas a las larvas de *R. arenarum*. Por ejemplo, se ha reportado que mezclas de metales y metaloides o de agroquímicos incrementan sinérgicamente la toxicidad para estas larvas en relación a la toxicidad de cada noxa por separado (Brodeur y col., 2009; 2014). También, se ha descrito que presencia de Cu o éster butílico incrementan la toxicidad del herbicida 2,4-D (Perez Coll y Herkovits, 2006). En general, estos efectos tóxicos sobre distintos organismos pueden depender de la naturaleza química y de los mecanismos de acción de los compuestos presentes en una mezcla (Lydy y col., 2004).

Los resultados obtenidos mediante el test de toxicidad utilizando ratones brindaron una interesante información sobre los efectos del consumo de 2,4-DCF y las soluciones PR en estos animales. Los volúmenes de solución de 2,4-DCF o PR consumidos por los ratones sometidos al tratamiento fueron menores a los volúmenes de agua consumidos por los ratones controles. El menor consumo de 2,4-DCF coincide con lo observado con otros autores que administraron soluciones de 2,4-DCF por vía oral a ratones CD1 (Borzelleca y col., 1985) o que incorporaron este compuesto en el alimento de ratas Wistar-Hannover (Aoyama y col., 2005). Esto podría ser atribuido a una menor

palatabilidad por parte de los ratones, o bien al propio efecto tóxico que llevó a que dichos animales consumieran menores volúmenes de las soluciones.

Además de la reducción de los volúmenes de ingesta de 2,4-DCF se observaron signos de toxicidad hepática en los ratones, ya que se detectaron alteraciones en el funcionalismo de las células hepáticas, que podrían ser indicativas de daño hepato-celular. En general, en los ratones machos se observó mayor efecto del contaminante sobre las células hepáticas que en hembras, detectándose mayores niveles séricos de glutámico pirúvico transaminasa (GPT). De esta manera, el consumo diario de soluciones conteniendo 4 mg/l de 2,4-DCF en ratones hembras fue suficiente para incrementar un 52% los niveles de GPT en el suero murino, mientras que en machos, se registraron incrementos de hasta un 145% en dicha actividad enzimática.

Cuando se administró a los ratones las soluciones PR obtenidas con ECT N, se observaron incrementos en los niveles de GPT del 52% en hembras y de 113% en machos, comparados con los controles (ingesta de agua). Por su parte, en ratones hembras y machos tratados con la solución obtenida con ECT Tab, se observó un incremento de alrededor del 54% de los niveles de GPT. Los efectos hepatotóxicos observados en este estudio fueron mayores en ratones machos que en hembras, posiblemente debido a que los primeros consumieron mayores volúmenes de las soluciones evaluadas, y por lo tanto los efectos generados por los componentes de las soluciones (2,4-DCF, o la mezcla obtenida en las soluciones PR) fueron mayores que en los ratones hembras.

Por otra parte se realizaron estudios histopatológicos de las muestras de hígado de los animales, los cuales no mostraron alteraciones que evidencien efectos citotóxicos en ninguno de los animales correspondientes a cada tratamiento, aunque no se puede descartar que esto ocurra ante una exposición crónica, es decir, si se prolongara el experimento en el tiempo. Estos resultados tienen un particular interés ya que el hígado, en los mamíferos, cumple un rol preponderante en los procesos de detoxificación de xenobióticos, sin embargo, varios de estos compuestos pueden producir alteraciones anatómo-fisiológicas.

En las condiciones de trabajo utilizadas en nuestros experimentos, no se observaron alteraciones relevantes en el funcionalismo renal luego del tratamiento con 2,4-DCF o las soluciones PR, ya que los niveles de urea y creatinina en suero no presentaron diferencias estadísticamente significativas con sus respectivos controles. Esto indicaría que el metabolismo hepático sería efectivo y los productos de dicho metabolismo, que se eliminan por orina, no serían tóxicos.

En los ratones también se evaluó la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos, ya que éste es un índice muy sensible de daño cromosómico y fue utilizado para estudiar la genotoxicidad de las soluciones de interés.

Luego de la remoción de 25 mg/l de 2,4-DCF con ECT N no se registró disminución de la toxicidad, observándose un incremento del número de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea del fémur de estos ratones comparados con los obtenidos en ratones del control, lo que indicaría la presencia de efectos clastogénicos. La solución PR obtenida con ECT Tab presentó menor genotoxicidad que las soluciones de 2,4-DCF (25 mg/l), observándose menor cantidad de micronúcleos en los eritrocitos.

Por el contrario, se detectó una disminución de la genotoxicidad de las soluciones de 2,4-DCF tratadas con ECT Tab, lo cual coincide con resultados obtenidos mediante el ensayo de *A. cepa*, en donde se pudo observar una disminución significativa de la toxicidad macroscópica (signos de necrosis tisular) y citotoxicidad presentando también menores efectos genotóxicos (Angelini, 2010).

Al igual que lo observado con PR N, otros autores han demostrado efectos genotóxicos sobre eritrocitos murinos luego de administrar efluentes conteniendo compuestos fenólicos a los animales, por vía oral (Zhu y col., 2013). Estos efectos han sido relacionados a la formación de radicales libres y quinonas, a partir de los compuestos fenólicos, y a la inducción de EROs en las células sanguíneas, lo que causa estrés oxidativo y toxicidad. Se ha reportado que los radicales libres juegan un rol crítico en la inducción del daño genético. Actuarían reaccionando con los lípidos de las membranas, produciendo peroxidación lipídica y causarían daños al ADN mediante la oxidación de las bases nitrogenadas y por unión covalente de los peróxidos lipídicos con el ADN

(Mattagajasing y col., 2008; Zhu y col., 2013). En este sentido, la presencia de remanentes de los compuestos fenólicos y de H_2O_2 podrían generar un estrés oxidativo adicional al producido por los productos de remoción (que de acuerdo al mecanismo de acción de las peroxidasas incluyen la formación de radicales libres), y de esta forma tendrían un rol importante en la toxicidad registrada en nuestro trabajo con las soluciones PR. Además, se ha descrito que estos radicales pueden causar también alteraciones en el tejido hepático (lo cual es coincidente con nuestros resultados) y en el sistema nervioso de los animales (Li y col., 2004; Dai y col., 2005).

La toxicidad de las soluciones PR fue evaluada también mediante la aplicación del test de *L. sativa*, utilizando un modelo vegetal. Las semillas de *L. sativa* germinadas en presencia de soluciones PR obtenidas con ambos ECT mostraron una disminución de los efectos tóxicos con respecto a la solución de 2,4-DCF inicial (sin tratar). Sin embargo, en ambos casos las plántulas presentaron radículas de menor longitud comparadas con las radículas de aquellas plántulas crecidas en agua. Los efectos subletales de las soluciones PR obtenidos con ECT N fueron más importantes que con ECT Tab.

De acuerdo a resultados de estudios previos, soluciones de H_2O_2 (0,5 mM) no causan efectos en el desarrollo de las plantulas de *L. sativa* (Maglione, 2010; Angelini y col., 2014). Los efectos de este compuesto empiezan a ser evidentes a concentraciones de 1 y 5 mM, en donde producen efectos inhibitorios sobre radículas e hipocótilos (Angelini y col., 2011). En el caso de 2,4-DCF, la CMNE fue de 10 mg/l (Angelini y col., 2011), por lo tanto, soluciones de concentraciones menores a la misma tampoco producen efectos subletales sobre el desarrollo de las plántulas. Debido a esto, no se puede atribuir la toxicidad de las soluciones PR a los remanentes de los sustratos por separado (ya que la concentración de este compuesto fue alrededor de 4 mg/l), pero podría estar ocurriendo un efecto sinérgico entre los mismos, que podría incluir también a los productos de oxidación de 2,4-DCF.

5.4.4. Evaluación de toxicidad de las soluciones post-remoción de fenol

La toxicidad de las soluciones PR de fenol fue evaluada mediante el test de teratogénesis en embriones. Este test sub-crónico de corta duración (96 h) utiliza a los embriones de *R. arenarum* durante los primeros estadios de

desarrollo, comenzando la exposición desde blastómeros, permitiendo observar alteraciones en el desarrollo de los mismos. Mediante el empleo de este test se pudieron observar efectos tóxicos de las soluciones de fenol (1 y 10 mg/l), H₂O₂ (0,5 mM) y soluciones PR obtenidas con los ECT libres e inmovilizados en alginato de calcio y CMS.

En general, se registró en los tratamientos una baja mortalidad, variando la misma alrededor del 6 % para las soluciones de H₂O₂, fenol (1 mg/l) y PR, superando el 11 % cuando los embriones se desarrollaron en la solución conteniendo 10 mg/l de fenol.

Al analizar los porcentajes de anomalías presentadas por los embriones desarrollados en las soluciones de fenol y H₂O₂ se observaron efectos teratogénicos, presentando 16 y 25% de larvas malformadas respectivamente. Las soluciones PR produjeron entre 17 y 30% de malformaciones, valores que resultaron comparables a los obtenidos con los sustratos puros.

Las soluciones PR obtenidas con ECT libres presentaron mayor toxicidad que las soluciones obtenidas con enzimas inmovilizadas, siendo estas diferencias significativas para ECT Tab-Alg y ECT N-CMS. Considerando que las eficiencias de remoción de fenol (10 mg/l) por las enzimas de los ECT libres fue de 50-54% es necesario considerar que estas soluciones contenían aproximadamente 5 mg/l del contaminante y presentaron concentraciones no determinadas de H₂O₂. Por su parte, la eficiencia de remoción registrada con los ECT inmovilizados en alginato de calcio o CMS fue de 66-68 %, lo que significa que el remanente de fenol en estas soluciones sería de aproximadamente 3 mg/l. La menor toxicidad registrada en los PR obtenidos con las enzimas inmovilizadas podría deberse también a la adsorción de los sustratos remanentes y/o productos de remoción sobre los soportes de inmovilización. Dicho efecto ha sido observado con diferentes soportes enzimáticos, como quitosano, vidrio poroso, que no solo adsorben productos de reacción sino a los sustratos de la misma (Wagner y Nicell, 2002).

Los tipos de anomalías observadas en las distintas soluciones fueron diferentes, por lo que podrían depender de la composición de cada solución. En general, las principales malformaciones observadas en todos los tratamientos fueron curvatura del eje axial, subdesarrollo de cola y edema, presentándose

en menor proporción la aparición de vesículas, forma irregular o detención del crecimiento.

Particularmente, los embriones desarrollados en presencia fenol presentaron principalmente curvatura del eje axial y subdesarrollo de aleta caudal, y en menor porcentaje edema e inhibición del desarrollo. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Paisio y colaboradores (2009) con soluciones de fenol entre 25 y 150 mg/l, las cuales generaron principalmente curvatura del eje axial y vesículas o extensiones persistentes en los embriones, entre otras anomalías.

Por su parte, la solución de H₂O₂ indujo principalmente edema, subdesarrollo de la aleta caudal y flexión del eje axial. Estas anomalías fueron observadas también en los embriones expuestos a las soluciones PR obtenidas con los ECT Tab y N libres y podrían estar relacionadas a un remanente de H₂O₂ en el medio. En el caso de las soluciones PR obtenidas con los ECT inmovilizados, las malformaciones generadas sobre los embriones podrían deberse tanto a la presencia de ambos sustratos, o a los productos de remoción en las soluciones.

Estos tipos de malformaciones han sido observados también con algunos plaguicidas organoclorados, y se relacionan a la generación de estrés oxidativo, que altera el desarrollo de las larvas. Por ejemplo, la exposición de larvas a clorpirifos desde la fertilización en concentraciones cercanos a la CL₅₀ (16 mg/l) induce la aparición de gemas y protuberancias en la superficie de las mismas, mientras que los metilazinfos, en concentraciones entre 0,5 y 16 mg/l, generan principalmente desbalances hídricos, con hidropesía y alteraciones de la aleta caudal (Lascano y col., 2009). El plaguicida Diazinon (en concentraciones entre 9 y 18 mg/l) induce curvatura axial, con bordes irregulares (incluyendo vesículas), disminución de tamaño, edemas y microcefalia entre otras anomalías observados en los embriones de *R. arenarum* (Aronzon y col., 2014a).

La disminución del tamaño de los embriones registradas para las soluciones de fenol (10 mg/l) y PR es considerado un efecto subletal no específico, que ha sido reportado anteriormente para otros compuestos, entre ellos metales, diazinon, bisfenol, nanofibras de polianilina (Yslas y col., 2012; Aronzon y col., 2014a; 2014b; Wolkowicz y col., 2014). Esta disminución del

tamaño ha sido relacionada a alteraciones neurológicas en las larvas en E 25, que causarían disminución en los movimientos y falta de alimentación. Sin embargo, los embriones de *R. arenarum* comienzan alimentarse luego del E 21 (boca abierta), estadio que alcanzan las larvas al final del estudio de teratogénesis, por lo que la disminución en la alimentación no sería causante del menor tamaño observado. Diversos autores señalan que la disminución del tamaño de los embriones es uno de los parámetros de mayor sensibilidad en la detección de contaminantes ambientales (Aronzon, y col. 2014b y citas contenidas este trabajo).

Otros grupos de investigación coinciden en encontrar elevada toxicidad de los productos de oxidación de compuestos fenólicos mediante el empleo de enzimas oxidorreductasas para la remoción de estos contaminantes. Por ejemplo, Wagner y Nicell, (2002), han reportado la formación de productos tóxicos, luego de la remoción de fenol, 2-CF, 4-CF, 2,4-DCF y 2-MF con HRP. La toxicidad de estos productos (detectada mediante el empleo del test Microtox), se incrementó durante las primeras horas de reacción, decreciendo luego de 24 h. El agregado adicional de H_2O_2 al medio aceleró la detoxificación, que ocurrió fundamentalmente por procesos fisicoquímicos espontáneos, ya que la mayoría de las peroxidasas se inactivan pasados los 15 minutos de la reacción. También se ha reportado la formación de productos tóxicos luego de la remoción de fenol con una tirosinasa fúngica, aunque la toxicidad de los mismos fue menor a la del compuesto inicial y con tendencia a disminuir luego de 24 h post-tratamiento (Ikehata y Nicell, 2000). En contraste, mediante el empleo de la lacasa de *Trametes pubescens* se ha observado que la disminución de la concentración del compuesto fenólico va acompañada de una disminución de la toxicidad de las soluciones (Gaitan y col., 2011). Estos antecedentes, como así también los resultados de nuestro trabajo de investigación, corroboran que la evaluación de un proceso de remoción debe ser complementada con estudios de toxicidad, ya que no siempre la desaparición del contaminante resulta en la disminución de la toxicidad de las soluciones. Además, estos estudios deben realizarse con varios sistemas biológicos diferentes, incluyendo especies acuáticas y terrestres, para tener un panorama completo del impacto de las sustancias sobre el ecosistema en el que se encuentre. Esto se debe a que la susceptibilidad o sensibilidad de los

métodos biológicos utilizados altera notablemente la percepción de la eficiencia de detoxificación de compuestos fenólicos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, las soluciones de 2,4-DCF (25 mg/l) presentan una elevada toxicidad en larvas de *R. arenarum* en E 25, generan efectos hepatotóxicos y genotoxicidad al ser consumidas por ratones Balb-C durante 7 días, y producen efectos subletales alterando la morfología de las plántulas de *L. sativa*. Dichos efectos pueden ser atenuados mediante la remoción con ECT de Tab o N libres o inmovilizados, variando el resultado de acuerdo al bioensayo utilizado. Por su parte, se confirmó que la toxicidad de fenol es mucho menor que la de 2,4-DCF. Sin embargo, las soluciones de fenol (10 mg/l) y las soluciones PR obtenidas con ambos ECT presentaron acción teratogénica en embriones de *R. arenarum*. En el caso de las soluciones PR se observaron efectos teratogénicos que pueden ser atribuidos a los remanentes de fenol o de H₂O₂, y/o un efecto sinérgico por la mezcla de los remanentes de sustratos y los productos de oxidación de las peroxidasas.

5.5. Estimación de la naturaleza química de los productos post-remoción

Como consecuencia de la reacción de compuestos fenólicos, con diferentes peroxidasas, se produce la formación de distintos intermediarios, que en general son radicales libres. Estos intermediarios pueden variar de acuerdo a la isoenzima de peroxidasa empleada en la reacción. Por lo tanto, a partir de cada ECT utilizado en la remoción se obtendría una compleja mezcla de intermediarios solubles. Se ha descrito que una gran proporción de los mismos, tienden a polimerizar espontáneamente, dando lugar a la formación de polímeros sólidos que generalmente precipitan en la solución (Dec y Bollag, 1994; Kummer y col., 1996; Dec y col., 2003).

En nuestros estudios, se observó la formación de un precipitado en las soluciones post-remoción de fenol y 2,4-DCF, lo que indicaría la formación de dichos polímeros, que pueden eliminarse mediante la filtración de la solución. Esto coincide con observaciones de otros autores, que indican que la reacción de oxidación de fenol por HRP genera polifenoles, los cuales pueden variar en cuanto a su estructura y masa molecular dependiendo del medio de reacción en el que ha ocurrido la reacción. Por ejemplo, cuando la reacción ocurre en presencia de solventes (DMF o dimetilsulfóxido) el polifenol obtenido es un

sólido de masa molecular de 35000 Da, mientras que si el solvente es metanol se obtiene un polímero soluble de 2800 Da, pudiendo confirmarse dichas estructuras mediante espectroscopia de infrarrojo o resonancia magnética nuclear (Kobayashi e Higashimura, 2003).

Mediante los estudios espectrofotométricos se detectaron cambios de densidad óptica durante el proceso de remoción. Los espectros de absorción iniciales mostraron el pico correspondiente a cada analito, 2,4-DCF (284 nm) y fenol (267 nm). Durante las reacciones, la mayor parte de los cambios observados ocurrieron en el rango UV (240 a 350 nm). En la remoción de ambos contaminantes, a medida que se incrementó el tiempo de incubación de las mezclas de reacción se observó un importante aumento de la densidad óptica a 252 nm, registrándose un pico en dicho valor cuando se utilizó 2,4-DCF. La aparición de ese pico coincide con lo observado por Laurenti y colaboradores (2003) utilizando HRP para la remoción de 2,4-DCF. De acuerdo a esto, al menos uno de los productos obtenidos en dichas reacciones presentaría menor conjugación que los compuestos iniciales.

En el caso de la remoción de 2,4-DCF se registró además, un incremento de la densidad óptica a 301 nm, sin observarse la aparición de un pico en el periodo estudiado. Con fenol se observó la aparición de un pico a 398 nm que incrementó durante la primera hora de reacción, disminuyendo luego de 24-48 h. Estos cambios de densidad óptica indicarían la aparición de productos de mayor conjugación que el compuesto inicial, que en el caso de fenol podría tratarse de la formación de un polímero que precipita y por lo tanto no es detectado en estudios espectrofotométricos a mayores tiempos de reacción.

El hecho de no encontrar una disminución de los picos correspondientes a fenol y 2,4-DCF en 1, 24 o 48 h de reacción indicaría la posibilidad de que el anillo fenólico se mantenga intacto durante las oxidaciones enzimáticas. Cabe suponer que se estarían produciendo diferentes radicales libres, de acuerdo a las características catalíticas de los grupos de isoformas presentes en los ECT, que posteriormente polimerizarían. Aunque se ha descrito que algunas especies vegetales como rye grass o *Helianthus annuus* tendrían sistemas enzimáticos capaces de producir la apertura del anillo aromático de fenol dando lugar a su mineralización (Ugrekheldze y col., 1999; Chrikishvili y col., 2005; Jha y col., 2013). Este mecanismo generalmente no ocurre en la mayoría de

las plantas y es más frecuente encontrarlo en bacterias (Hirvonen y col., 2000). Por otra parte, se han propuesto mecanismos de degradación de 2,6- y 2,4-DCF con peroxidasa de rábano picante que incluyen la deshalogenación y formación de ácido clorhídrico (HCl) (Wagner y Nicell, 2002; Laurenti y col., 2002; 2003). En este contexto, en estudios de nuestro laboratorio, durante la reacción de remoción de 2,4-DCF con la utilización de raíces transformadas de tabaco y de nabo, se registró una disminución del pH, acompañada por un incremento en la concentración de cloruros, debido a la formación de HCl, luego de la reacción. Estos antecedentes indicarían que el mecanismo de acción de las peroxidasas presentes en dichas raíces podría incluir el proceso de deshalogenación (Angelini y col., 2010; Talano y col., 2010).

Los resultados obtenidos en el análisis mediante técnicas electroquímicas muestran que se produjo una reducción en la concentración de fenol o 2,4-DCF luego de la reacción de remoción de los mismos utilizando peroxidasas de ECT N y Tab, confirmando aquellos resultados obtenidos mediante técnicas colorimétricas. La disminución de la señal del voltamperograma de 2,4-DCF fue acompañada por la aparición de cuplas de óxido-reducción entre 0,1 y 0,2 V con ambos ECT, que corresponderían a los productos obtenidos en una hora de reacción.

Las respuestas voltamperométricas registradas demuestran la existencia de un mecanismo de reacción electroquímica complejo, con pérdida de actividad catalítica del electrodo, la cual se evidencia en una fuerte disminución de la señal registrada a medida que transcurren los ciclos. Esto se ha observado con otros compuestos polifenólicos (por ejemplo resveratrol), y concuerda con resultados de otros autores, que han descripto que en la electrooxidación de fenol y 2,4-DCF se produce la electropolimerización en la superficie del electrodo. Estos polímeros muestran una baja tasa de oxidación, baja permeabilidad y una fuerte adhesión al electrodo lo que disminuye la intensidad de la señal registrada (Gattrell y Kirk, 1990; 1993, Ureta-Zañartu y col., 2002; Granero y col., 2009).

En el caso de la oxidación electroquímica de 2,4-DCF apareció una única cupla de óxido-reducción en el primer escaneo, que correspondería a la oxidación del grupo oxhidrilo de dicha molécula con formación de una quinona (Ramírez y col., 2010). En sucesivos escaneos se detectó también la aparición

de cuplas de óxido-reducción de baja intensidad, la cual disminuyó a medida que se incrementó el número de ciclos. Otros autores también han identificado picos similares durante la oxidación electroquímica de fenol, usando entre ellos electrodos de carbono vítreo (Enache y Oliveira-Brent, 2011). De acuerdo a estos antecedentes, los picos anódicos detectados corresponderían a dos productos de oxidación de fenol: *o*-quinona que se reduce a *o*-fenol (catecol) y *p*-quinona que se reduce a *p*-fenol (hidroquinona) mientras que los picos catódicos corresponderían a la reversibilidad de dichos productos durante el barrido (Boudene y col., 1996, Enache y Oliveira-Brent, 2011).

El mismo comportamiento fue encontrado al analizar moléculas más complejas, por ejemplo ocratoxinas, las cuales presentan un grupo funcional oxhidrilo que mediante oxidación electroquímica genera una quinona. Dicha cupla de óxido reducción se refleja en picos anódicos y catódicos característicos (Ramírez y col, 2010).

Al comparar los voltamperogramas cíclicos realizados entre -0,2 V y 0,5 V durante la reacción de remoción de 2,4-DCF con ECT Tab y ECT N se pudieron observar diferencias que sugerirían que los intermediarios formados durante la primer hora de reacción serían diferentes para ambos ECT. Mientras que con ECT Tab se obtuvo una única cupla principal, con ECT N se observaron varios picos entre 0,2 y 0,4 V que podrían corresponder a distintos productos que se formarían durante los primeros minutos de la reacción y tienden a disminuir de intensidad luego de una hora de reacción.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la oxidación de 2,4-DCF catalizada por estas peroxidases ocurre rápidamente, produciendo más de un producto intermediario, entre ellos quinonas. Estos productos variarían con el tiempo y continuarían reaccionando hasta aproximadamente 48 h de incubación. Los productos de oxidación dependerían de las peroxidases utilizadas, ya que las respuestas voltamperométricas observadas para la remoción de 2,4-DCF con ECT N y Tab fueron diferentes durante la primera hora de reacción.

Por su parte, la oxidación de fenol por peroxidases ocurrió más lentamente, pudiendo observarse en los voltamperogramas cíclicos una disminución de la señal correspondiente al mismo, pero sin registrarse picos correspondientes a sus productos al realizar los barridos -0,2 V y 1,2 V. Sin

embargo, al efectuar los voltamperogramas cíclicos de la reacción de remoción de fenol entre -0,2 V y 0,7 V se pudieron observar los picos correspondientes a una cupla de óxido-reducción entre 0,4 y 0,5 V para ambos ECT que incrementaron su intensidad durante el periodo estudiado.

Análogamente, otros grupos de investigación, han descrito que, en la oxidación de fenol y 2,4-DCF mediante electrooxidación o reacción de Fenton, se formarían hidro y benzoquinonas (Boudene y col., 1996; Ureta-Zañartu y col., 2002; Lu y col., 2006; Poerschmann y col., 2009; Saylor y col., 2013). Por su parte, la reacción de oxidación de clorofenoles por oxidasas y peroxidasas fúngicas produce dímeros como fue observado utilizando lignina peroxidasa del hongo *Phanerochaete chrysosporium*, donde el producto sería una 2-cloro-6-(2,4-dimetoxi)-*p*-benzoquinona (Minard y col., 1981; Grey y col., 1998; Hirvonen y col., 2000). En el caso de HRP se han realizado varios estudios que revelan la formación de diferentes dímeros durante la oxidación de 2,4-DCF, producto de unión de diferentes radicales libres formados en las primeras etapas de la reacción, entre ellos la 2-cloro-6-(2,4-diclorofenoxy)-1,4-benzoquinona (Hammel y Tardone, 1998; Wagner y Nicell, 2002; Laurenti y col., 2003). Esto sugiere que, durante la remoción de fenol y 2,4-DCF por los ECT de nabo y tabaco, se producen quinonas, entre otros posibles radicales libres en los medios de reacción. La formación de estas quinonas, puede ser una de las razones que permitan explicar la toxicidad observada a través del uso de los diferentes test que se aplicaron para evaluar las soluciones post-remoción obtenidas en este trabajo.

En síntesis, si bien, entre los productos de oxidación de compuestos fenólicos obtenidos en reacciones catalizadas por peroxidasas, se forman polímeros que precipitan, existe una proporción de los mismos que permanecen solubles en la solución post-tratamiento y que generalmente poseen elevada toxicidad, tal como se demostró en este trabajo de tesis. Se ha descrito que las condiciones de reacción, entre ellas el pH, temperatura, concentración de sustratos y de enzima, agregado de aditivos como PEG, quitosano, o la inmovilización de las enzimas, tendrían influencia sobre la cantidad y tipo de productos formados durante la remoción de compuestos fenólicos y la toxicidad de los mismos (O'Brien 1991; Aitken y col., 1994; Ikehata y Nicell, 2000; Hirvonen y col., 2000; Rodríguez y col., 2004; Saylor y

col., 2013). Además, la presencia de aditivos podría afectar la solubilidad de estos productos, ya que mientras se ha descrito que PEG solubiliza los productos de oxidación, la presencia de quitosano permitiría la polimerización y precipitación de las quinonas del medio (Ikehata y Nicell, 2000; Wagner y Nicell, 2002).

Sin embargo, estos compuestos podrían ser sólo productos intermedios de la reacción y posiblemente disminuyan su concentración al incrementar el tiempo de incubación de los medios de reacción durante periodos mayores al estudiado. De acuerdo a nuestros resultados, la reacción de remoción de ambos compuestos fenólicos puede continuar incluso hasta las 48 h, siendo estos tiempos mayores cuando se utiliza fenol como sustrato. Considerando que los niveles de la actividad peroxidasa en los medios de reacción disminuye considerablemente luego de las 24 h, la reacción continuaría principalmente mediante mecanismos físico-químicos (espontáneos) y no enzimáticos, tal como fue observado por otros autores con HRP (Wagner y Nicell, 2002). En este contexto, se ha descrito que luego de la catálisis enzimática, las quinonas formadas se condensarían, lo cual podría contribuir a disminuir la toxicidad de las soluciones post-remoción. Esto concuerda con resultados obtenidos por Saylor y colaboradores (2013) donde, considerando solamente mecanismos físico-químicos espontáneos, observaron una pérdida del 92% de la toxicidad de las benzoquinonas en un periodo de 18 días. Por lo tanto, se podría sugerir que, a partir de cada ECT utilizado en la reacción de remoción se obtendría una compleja mezcla de intermedios solubles y productos de condensación de estos intermedios.



CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

En esta tesis se demostró que los extractos crudos totales (ECT) de raíces transformadas de nabo y tabaco presentan un gran potencial para la remoción de 2,4-DCF en sólo 1h de reacción mientras que para fenol se necesitan 24 h y la eficiencia es menor. La presencia de polietilenglicol en el medio de reacción incrementa la eficiencia de remoción de los dos contaminantes, siendo este efecto más importante para fenol. Este aditivo contrarresta la pérdida de actividad enzimática registrada durante la remoción, protegiendo efectivamente a las peroxidasas de ambos ETC durante el proceso, principalmente a las peroxidasas de tabaco. El agregado de solventes, como dimetilformamida o detergentes como el dodecil sulfato sódico afectan la remoción de fenol y 2,4-DCF pero sin producir inactivación de las enzimas. Los iones de bicarbonato y níquel disminuyen la eficiencia de remoción de compuestos fenólicos durante la primera hora de reacción y la presencia del catión Cu^{+2} produce una disminución de la misma al utilizar ECT N.

La inmovilización de las peroxidasas de tabaco y nabo en cápsulas de alginato de calcio y en la resina de intercambio iónico CMS favorece la remoción de soluciones de 2,4-DCF (25 mg/l) y de fenol (10 mg/l). La presencia de PEG en el interior de las cápsulas de alginato no modifica la remoción de 2,4-DCF, pero incrementa las eficiencias de remoción de fenol con ambos ECT.

Por otra parte, la utilización de bioensayos de toxicidad reveló que las soluciones de 2,4-DCF (25 mg/l) presentan una elevada toxicidad. Las soluciones PR obtenidas con ambos ECT mostraron una disminución de los efectos tóxicos con respecto a la solución de 2,4-DCF inicial en semillas de *L. sativa*. En el caso de administración oral en ratones, el 2,4-DCF en concentraciones de 4 y 25 mg/l y las soluciones PR con ambos ECT, produjeron toxicidad hepática, sin generar daños histopatológicos en dicho órgano ni alteraciones del funcionalismo renal. Estas soluciones mostraron actividad clastogénica en eritrocitos de médula ósea de ratones Balb C. Sin embargo se observó una disminución de la genotoxicidad en relación a la solución inicial, con las soluciones PR Tab. La inmovilización de peroxidasas

en cápsulas alginato de calcio permitió disminuir aún más la toxicidad de las soluciones PR de 2,4-DCF.

Respecto a las soluciones de fenol (1 y 10 mg/l), el análisis de teratogenicidad indicó que este compuesto genera malformaciones en el desarrollo de los embriones expuestos desde estadios tempranos. Las soluciones PR Tab y PR N produjeron un elevado porcentaje de diferentes anomalías, indicando que resultarían altamente tóxicas para estas larvas. Los tipos de anomalías observadas indican que éstas dependerían de la composición de cada solución. La inmovilización en CMS permitió disminuir la toxicidad con respecto a la obtenida con los ECT libres.

Durante la remoción de ambos contaminantes por los ECT de nabo y tabaco se obtuvieron productos intermedios, generados por las peroxidasas de los extractos analizados, que continuarían reaccionando mediante mecanismos físico-químicos espontáneos hasta 48 h luego de la incubación. Entre estos intermedios se encontrarían quinonas, las cuales serían responsables de la toxicidad observada en las soluciones post-remoción, a través del uso de los diferentes test aplicados.

Por lo tanto, la aplicación de peroxidasas de raíces transformadas de nabo y tabaco, tanto libres como inmovilizadas, produjeron elevadas eficiencias de remoción de soluciones de 2,4-DCF y fenol, sin embargo, los resultados no siempre se correlacionaron con disminución de la toxicidad de las soluciones en estudio.



Bibliografía

7. Bibliografía

- **Abdel Migid H. M., Azab Y. A., Ibrahim W. M.** Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **66**: 57-64 (2007).
- **Aggelis G., Iconomou D., Christou M., Bokas D., Kotzailias S., Christou G., Tsagou V., Papanikolaou S.** Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Research.* **37**: 3897-3904 (2003).
- **Agostini E., Coniglio M. S., Milrad S. R., Tigier H. A., Giulietti A. M.** Phytoremediation of 2,4-dichlorophenol by *Brassica napus* hairy root cultures. *Biotechnol. Applied Biochem.* **37**: 139-144 (2003).
- **Agostini E., M. de Forchetti S. R., Tigier H. A.** Production of peroxidases by hairy root cultures of *Brassica napus*. *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* **47**: 177-182 (1997).
- **Agostini E., Talano M. A., González P. S., Wevar Oller A., Medina M. I.** Phytoremediation of phenolic compounds: recent advances and perspectives. En *Handbook of Phytoremediation*. Nova Science Publishers, Inc. (Ed. Goluvud, I. A. pp.) USA. Chapter I: 1-50 (2011).
- **Ahmaruzzaman M.** Adsorption of phenolic compounds on low-cost adsorbents: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.* **143**: 48-67 (2008).
- **Ahuja S. K., Ferreira G. M., Moreira A.R.** Utilization of enzymes for environmental applications. *Crit. Rev. In Biotech.* **24**: 125-154 (2004).
- **Aitken I. J., Massey I. J., Chen T., Heck P. E.** Characterization of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants. *Water Res.* **28**: 1879-1883 (1994).
- **Akamatsu K., Maruyama K., Chen W., Nakao A., Nakao S.** Drastic difference in porous structure of calcium alginate microspheres prepared with fresh or hydrolyzed sodium alginate. *J. Colloid Interface Sci.* **363**: 707-710 (2011).
- **Akhtar S., Husain Q.** Potential applications of immobilized bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase in the removal of phenols from polluted water. *Chemosphere* **65**: 1228-1235 (2006).
- **Al Momani, F.** Biodegradability enhancement of 2,4-dichlorophenol aqueous solution by means of photo-Fenton reaction. *Environ. Eng. Sci.* **23**: 722-733 (2006).

- **Alcalde M., Ferrer F., Plou F. J., Ballesteros A.** Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. *Trends Biotechnol.* **24** (6): 281-287 (2006).
- **Alcaraz M. R., Fabiano S. N., Cámara M. S.** Determinación de contenido fenólico total en agua superficial de distintos puntos de la provincia de Santa Fe - Argentina - haciendo uso de un biosensor enzimático mediante calibración multivariada por cuadrados parciales mínimos, PLS. En *Séptimo Congreso de Medio Ambiente* (2012).
- **Alemzadeh I., Nejati S.** Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase. *J. Hazard. Mater.* **166** (2-3): 1082-1086 (2009).
- **Angelini V., Agostini E., Medina M. I., González P. S.** Use of hairy roots extracts for 2,4-DCP removal and toxicity evaluation by *Lactuca sativa* test. *Env. Sci. Pollut.* **21**: 2531–2539 (2014).
- **Angelini V., Orejas, J. Medina M., Agostini E.** Scale up of 2,4-dichlorophenol removal from aqueous solutions using *Brassica napus* hairy roots. *J. Hazard. Mater.* **185**: 269–274 (2011).
- **Angelini V.A.** Caracterización de peroxidasas de cultivos de raíces transformadas y su implicancia en fitorremediación. Tesis de Magíster en Biotecnología. UNRC. (2010).
- **Antonopoulos V. T., Rob A., Ball A. S., Wilson M. T.** Dechlorination of chlorophenols using extracellular peroxidase produced by *Streptomyces albus* ATCC 3005. *Enz. Microbial Technol.* **29**: 62-69 (2001).
- **Aoyama H., Hojo H., Takahashi K.L., Shimizu N., Araki M., Harigae M., Tanaka N., Shirasaka N., Kuwahara M., Nakashima N., Yamamoto E., Saka M., Teramoto S.** A two generation reproductive toxicity study of 2,4-Dichlorophenol in rats. *J. of Toxicol. Sci.* **30**: 59-78 (2005).
- **Aronzon C. M., Marino D. J. G., Ronco A. E., Pérez Coll C. S.** Differential toxicity and uptake of Diazinon on embryo-larval development of *Rhinella arenarum*. *Chemosphere* **100**: 50–56 (2014a).
- **Aronzon M. C, Babay A. P., Pérez-Coll C. S.** Developmental toxicity and risk assessment of nonylphenol to the South American toad, *Rhinella arenarum*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **38** (2): 634-642 (2014b).
- **Asgher M., Iqbal H. M. N., Irshad M.** Characterization of purified and xerogel immobilized novel lignin peroxidase produced from *Trametes versicolor* IBL-04 using solid state medium of corncobs. *BMC Biotechnol.* **12**: 46 (2012).

- **Ashraf H., Husain Q.** Use of DEAE cellulose adsorbed and crosslinked white radish (*Raphanus sativus*) peroxidase for the removal of α -naphthol in batch and continuous process. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **64**: 27–31 (2010).
- **Ateeq B., Farah M. A.** Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. *Mutat. Res.* **514** (1-2): 105–113 (2002).
- **Atlas R., Bartha R.** Ecología microbiana y microbiología ambiental. 4° Ed. Addison Wesley, Madrid (2001).
- **ATSDR** - Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. Clorofenoles. Junio de 1999. http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts107.pdf.
- **Bais H. P.; Weir T. L.; Perry L. G; Gilroy S.; Vivanco J. M.** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **57**: 233-266 (2006).
- **Bakalovic N., Passardi F., Ioannidis V., Penel C., Falquet L., Dunand C.** PeroxiBase: A class III plant peroxidase database. *Phytochemistry* **67**: 534-539 (2006).
- **Bandyopadhyay M., Jha S., Tepfer D.** Changes in morphological phenotypes and withanolide composition of Ri-transformed roots of *Withania somnifera*. *Plant Cell Rep.* **26**: 599–609 (2007).
- **Bard, A.** "Encyclopedia of Electrochemistry" Stratmann, J., Schäfer, M. H. J. (eds.) Wiley-VCH (2001).
- **Barrena R., Casals E., Colón J., Font X., Sanchez A., Puentes V.** Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles, *Chemosphere* **75**: 850-857 (2009).
- **Barrientos P.; Ferrari L; Folabella, A.; Fuchs J; Meijide F; Pérez-Coll C. S; Planes E.; Ruiz L.; Ronco A.; Agullo M. A.** Evaluación de la calidad ambiental y de suelos. Ensayo de emergencia en plántulas de *Lactuca sativa* (L.). Norma IRAM 29117. Subcomité de Ecotoxicología y Bioensayos. 2007-08-16/2008-03-21: 1 – 23. Biológica; *Rec. Nat. Renov.- Conservación y preservación* (2008)
- **Bayramoğlu G., Altintas B., Yilmaz M., Arica M. Y.** Immobilization of chloroperoxidase onto highly hydrophilic polyethylene chains via bio-conjugation: catalytic properties and stabilities. *Biores. Technol.* **102**: 475–482 (2011).

- **Bhagyarakshmi N.** Red Bead hairy roots cultures. En: Red Beed Biotechnology. Food and Pharmaceutical Applications. Ed. Bhagyarakshmi Neelwarne. Springer Science & Business Media. New York. USA. 199-249 (2012).
- **Bhattacharya S. S., Karmakar S., Banerjee R.** Optimization of laccase mediated biodegradation of 2,4-dichlorophenol using genetic algorithm. *Water Res.* **43** (14): 3503-3510 (2009).
- **Bódalo A., Gómez J.L., Gómez E., Bastida J., Máximo M.F.** Removal of 4-chlorophenol by soybean peroxidase and hydrogen peroxide in a discontinuous tank reactor. *Chemosphere* **63**: 626-632 (2006).
- **Bohórquez-Echeverry P., Campos-Pinilla C.** Evaluación de *Lactuca sativa* y *Selenastrum capricornutum* como indicadores de toxicidad en aguas. *Universitas Scientiarum. Revista de la Facultad de Ciencias.* **12** (2): 83-98 (2007).
- **Bolivar J. M., Wilson L., Ferrarotti S. A., Fernandez-Lafuente R., Guisan J., Mateo C.** Evaluation of different immobilization strategies to prepare an industrial biocatalyst of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Enz. Microb. Technol.* **40**: 540-546 (2007).
- **Borzelleca J. F., Hayes J. R., Condie L. W., Egle J. L.** Acute and subchronic toxicity of 2,4-diclorophenol in CD-1 mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* **5** (3): 478-486 (1985).
- **Boudenne J. L., Cerclier O., Galéa J., Van Der Vlist E.** Electrochemical oxidation of aqueous phenol at a carbon black slurry electrode. *Appl. Catal. A Gen.* **143**: 185-202 (1996).
- **Brandão Y., Teodosio J., Dias, F., Eustáquio W., Benachour M.** Treatment of phenolic effluents by a thermochemical oxidation process (DiCTT) and modelling by artificial neural networks. *Fuel* **110**: 185-195 (2013).
- **Bratkovskaja I., Vidziunaite R., Kulys J.** Oxidation of phenolics compounds by peroxidase in the presence of soluble polymers. *Biochemistry* **69** (9): 985-992 (2004).
- **Bravo J. J., Giraldo S.A., Centeno A. y Páez Mozo E.** Catalizadores para purificación de aguas industriales que contengan compuestos resistentes a la biodegradacion. *3° Taller Iberoamericano de la red temática, Cartagena de Indias 21-22*: 259-264 (1998).
- **Brodeur J. C., Poliserpi M. B., D Andrea M. F., Sánchez M.** Synergy between glyphosate- and cypermethrin-based pesticides during acute exposures in

tadpoles of the common South American Toad *Rhinella arenarum*. *Chemosphere* **112**: 70-76 (2014).

- **Brodeur J. L., Asorey C. M., Sztrum A, Herkovits J.** Acute and subchronic toxicity of arsenite and zinc to tadpoles of *Rhinella arenarum* both alone and in combination. *J. Toxicol. Environ. Health Part A*. **72** (14): 884-890 (2009).
- **Buchanan I. D., Nicell J. A.** Model development for horseradish peroxidase catalysed removal of aqueous phenol. *Biotechnol. Bioeng.* **54** (3): 251-261 (1997).
- **Burton S. G.** Oxidizing enzymes as biocatalysts. *Trends Biotechnol.* **21**: 543-549 (2003).
- **Busca G., Berardinelli S., Resini C., Arrighi L.** Technologies for removal of phenol from fluid streams: a short review of recent developments. *J. Hazard. Mater.* **160**: 265-288 (2008).
- **Cao I.** Immobilized enzymes: science or art? *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**: 217-226 (2005).
- **Casanova E., Trillas M. I., Moysset L., Vainstein A.** Influence of *rol* genes in floriculture. *Biotechnol. Advan.* **23** (1): 3-39 (2005).
- **Castañé P., Rovedatti M., Topalián M., Salibián A.** Spatial and temporal trends of physicochemical parameters in the water of the Reconquista River (Buenos Aires, Argentina). *Environ. Monit. Assess.* **117**: 135-144 (2006).
- **Charles J., Sancey B., Morin-Crini N., Badot P. M., Degiorgi F., Trunfio G., Crini G.** Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **74** (7): 2057-2064 (2011).
- **Chen C., Lin J.** Toxicity of chlorophenols to *Pseudokirchneriella subcapitata* under air-tight test environment. *Chemosphere* **62**: 503-509 (2006).
- **Cheng H., Scott K., Christensen P. A.** Electrochemical hydrodehalogenation of 2,4-dichlorophenol in paraffin oil and comparison with aqueous systems. *J. Electroanal. Chem.* **566**: 131-138 (2004).
- **Chirikishvili D. I., Lomidze E. P., Mithaishvili T.I.** Phenol conjugation with peptides and final transformations of conjugates in english ryegrass seedlings. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **41** (6): 569-599 (2005).
- **Coniglio M. S., Busto V. D., González P. S., Medina M. I., Milrad S., Agostiñi E.** Application of *Brassica napus* hairy root cultures for phenol removal from aqueous solutions. *Chemosphere* **72**: 1035-1042 (2008).

- **Crisante, A.** Factores de riesgo ambientales presentes en los pobladores de Monte Buey. Trabajo final. Escuela de Enfermería. UNC. (2011).
- **Dai G, Cui L, Song L, Gong N, Chen J, Zhao R., Wang S., Chang H. C., Wang X.** Terephthalic acid occupational exposure and its effect on organ functions in fiber workers. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **20** (1): 209–214 (2005).
- **Dalal S., Gupta M. N.** Treatment of phenolic wastewater by horseradish peroxidase immobilized by bioaffinity layering. *Chemosphere* **67**: 741-747 (2007).
- **de Forchetti S. M., Tigier H. A.** Indole-3-Acetic acid oxidase and syringaldazine oxidase activities of peroxidase isozymes in soybean root nodules. *Plant Physiol.* **79**: 327-330 (1990).
- **De Nicola E., Meriç S., Gallo M., Iaccarino M., Della Rocca C., Lofrano G., Russo T., Pagano G.** Vegetable and sintetic tannins induce hormesis/toxicity in sea urchin early development and in algal growth. *Environ. Pollut.* **146**: 46-54 (2007).
- **Dec J., Bollag J. M.** Dehalogenation of chlorinated phenols during oxidative coupling. *Environm. Science Technol.* **28**: 484-490 (1994).
- **Dec J., Haider, K., Bollag J.** Release of substituents from phenolic compounds during oxidative coupling reactions. *Chemosphere* **52**: 549–556 (2003).
- **Deva A. N., Aru C., Arthanareeswaran G., Sivashanmugam P.** Extraction of peroxidase from waste *Brassica oleracea* used for the treatment of aqueous phenol in synthetic waste water. *J. Environ. Chem. Eng.* **2**: 1148–1154 (2014).
- **Díaz-Báez M. C., Bustos Lopez M. C., Espinosa Ramirez A. J.** Métodos estadísticos para ej análisis de resultados de pruebas de toxicidad. En: Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos. 1er Ed. Editorial Unibiblos. UNC. Bogotá. Colombia. 89-100 (2004).
- **Díaz López G., García Cambero J. P., Castaño Calvo A.** Germination of *Lactuca sativa* seeds as pre-screening in toxicology studies in higher plants. *Toxicol. Lett.* **180**: S32–S246 (2008).
- **Djokic L. Narancic T., Biocanin M., Saljnikov E., Casey, E., Vasiljevic, B., Nikodinovic-Runic, J.** Phenol removal from four different natural soil types by *Bacillus* sp. PS11. *Appl. Soil Ecol.* **70**: 1–8 (2013).
- **Doty S. L.** Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New Phytol.* **179** (2): 318-333 (2008).
- **Dunford H.B.** Oxidations of iron (II) / (III) by hydrogen peroxide: from aquo to enzyme. *Coord. Chem. Rev.* **233-234**: 311-318 (2002).

- Durán N., Esposito E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidases-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl. Catal. B.* **28**: 83-99 (2000).
- Durán N., Rosa M., D'Annibale A., Gianfreda L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enz. Microb. Technol.* **31**: 907-931 (2002).
- Eapen S., Singh S. y D'Souza S.F. Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. *Biotechnol. Advan.* **25**: 442-451 (2007).
- Efroymsen R. A., Peterson M. J., Giffen N. R., Ryon M., Smith J. G., Hargrove W. W., Roy W. K., Welsh C. J., Druckenbrod D. L, Puarles H. D. Investigating habitat value to inform contaminant remediation options: case study. *J. Environ. Manag.* **88**: 1452-1470 (2008).
- Enache, T. A., Oliveira-Brett, A. M. Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways. *J. Electroanal. Chem.* **655**: 9-16 (2011).
- Entezari M., Mostafai M., Sarafraz-yazdi A. A combination of ultrasound and a bio-catalyst: removal of 2-chlorophenol from aqueous solution. *Ultrason. Sonochem.* **13**: 37-41 (2006).
- Ertürk M., Saçan M. Assessment and modeling of the novel toxicity data set of phenols to *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **90**: 61-68 (2013).
- Fajardo Ochoa R., Osuna-Castro J. A., VillaVelázquez-Mendoza C., Escalante-Minikata P., Ibarra-Junquera V. Inmovilización de células y enzimas. *Rev. Científica de la Univ. Autónoma Coahuila. México.* **3**: 42-56 (2011).
- Fatima A., Husain Q., Khan R. H. A peroxidase from bitter melon (*Momordica charantia*) with enhanced stability against organic solvent and detergent: a comparison with horseradish peroxidase. *J. Mol. Catal. B: Enz.* **47**: 66-71 (2007).
- Feng W., Taylor K. E., Biswas N., Bewtra J. K. Soybean peroxidase trapped in product precipitate during phenol polymerization retains activity and may be recycled. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **88**: 1429-1435 (2013).
- Fernandes K. F., Lima C. S., Lopes, F. M., Collins, C. H. Properties of horseradish peroxidase immobilised onto polyaniline. *Process Biochem.* **39**: 957-962 (2004).
- Ferrari A., Lascano C., Pechen de D'Angelo A. M., Venturino A. Effects of azinphos methyl and carbaryl on *Rhinella arenarum* larvae esterases and

- antioxidant enzymes. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **153**: 34–39 (2011).
- **Flocco C. G., Balbo A. L., Carranza M. P., Giulietti A. M.** Removal of phenol by alfalfa plants (*Medicago sativa* L.) grown in hydroponics and its effect on some physiological parameters. *Acta Biotechnol.* **22**: 43–54 (2002).
 - **Franco de Diana D., Fernández V., Torres E.** Evaluación de la actividad genotóxica de efluentes de curtiembres del dpto. Central de la región oriental. Paraguay. *Rev. Cienc. y Tecnol. Dir. Investig. - UNA* **2**: 37–48 (1996).
 - **Gaitan I. J., Medina S. C., González J. C., Rodríguez A., Espejo A. J., Osma J. F., Sarria V., Alméciga-Díaz C. J., Sánchez O. F.** Evaluation of toxicity and degradation of a chlorophenol mixture by the laccase produced by *Trametes pubescens*. *Bioresour. Technol.* **102**: 3632–3635 (2011).
 - **Gallego A., Gemini V., Rossi S.** Detoxification of 2, 4, 6-trichlorophenol by an indigenous bacterial community. *Int. Biodet. Biodegrad.* **63**: 1073–1078 (2009).
 - **Gana J., Ordóñez R., Zampini C.** Industrial effluents and surface waters genotoxicity and mutagenicity evaluation of a river of Tucuman, Argentina. *J. Hazard. Mater.* **155**: 403–406 (2008).
 - **Gattrell M., Kirk D. W.** A study of electrode passivation during aqueous phenol electrolysis. *J. Electrochem. Soc.* **40** (4): 903–911 (1993).
 - **Gattrell M., Kirk D. W.** The electrochemical oxidation of aqueous phenol at a glassy carbon electrode. *Can. J. Chem. Eng.* **68** (6): 997–1003 (1990).
 - **Georgiev M. I., Agostini E., Ludwig-Müller J., Xu J.** Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource. *Trends Biotechnol.* **30**: 528–537 (2012).
 - **Georgiev M. I.; Pavlov A. I.; Bley T.** Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**(6): 1175–1185 (2007).
 - **Ghiourelitis M., Nicell J. A.** Assessment of soluble products of peroxidase-catalyzed polymerization of aqueous phenol. *Enz. Microb. Technol.* **25**: 185–193 (1999).
 - **Gianfreda L., Rao M. A.** Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enz. Microb. Technol.* **35**: 339–354 (2004).
 - **Gill S. S., Tuteja N.** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology Biochem.* **48**: 909–930 (2010)

- **Gómez J. L., Bódalo A., Gómez E., Bastida J., Hidalgo A. M., Gómez M.** A covered particle deactivation model and an expanded Dunford mechanism for the kinetic analysis of the immobilized SBP/phenol/hydrogen peroxide system. *Chem. Engineering Journal* **138**: 460-473 (2008).
- **Gomez J. L., Bodalo A., Gomez E., Bastida J., Hidalgo A.M., Gomez M.** Immobilization of peroxidases on glass beads: an improved alternative for phenol removal. *Enz. Microb. Technol.* **39**: 1016-1022 (2006).
- **Gómez J. L., Bódalo A., Gómez E., Hidalgo A. M., Gómez M., Murcia M. D.** Experimental behaviour and design model of a fluidized bed reactor with immobilized peroxidase for phenol removal. *Chem. Eng. J.* **127** (1-3): 47-57 (2007)
- **Gómez M., Matafonova G., Gómez J. L., Batoev V., Christofi N.** Comparison of alternative treatments for 4-chlorophenol removal from aqueous solutions: Use of free and immobilized soybean peroxidase and KrCl excilamp. *J. Hazard. Mater.* **169** (1-3): 46-51 (2009).
- **González P. S., Capozucca C. E., Tigier H. A., Milrad S. R., Agostini E.** Phytoremediation of phenol from wastewater, by peroxidases of tomato hairy root cultures. *Enz. Microb. Technol.* **39**: 647-653 (2006).
- **González P., Maglione G. Giordana M., Paisio C. E., Talano M. A., Agostini, E.** Evaluation of phenol detoxification by *Brassica napus* hairy roots, using *Allium cepa* test. *Env. Sci. Poll. Res.* **19**: 482-491 (2012).
- **González P.S., Agostini E., Milrad S. R.** Comparison of the removal of 2,4-dichlorophenol and phenol from polluted water, by peroxidases from tomato hairy roots, and protective effect of polyethylene glycol. *Chemosphere* **70**: 982-989 (2008).
- **Granero A. M., Fernández H., Agostini E., Zón M. A.** An amperometric biosensor based on peroxidases from *Brassica napus* for the determination of the total polyphenolic content in wine and tea samples. *Talanta* **83**: 249-255 (2010).
- **Greene J. C.;Bartels C. L.;Warren-Hicks W. J.;Parkhurst B. R.;Linder G. L.** Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites. EPA 600/3-88-029 (NTIS / PB88-235510/AS).
- **Greulich K., Pflumacher S.** Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. *Aquat Toxicol.* **65**: 329-336 (2003).
- **Grey R., Höfer C., Schlosser D.** Degradation of 2-chlorophenol and formation of 2-chloro-1,4-benzoquinone by mycelia and cell-free crude culture liquids of

- trametes versicolor in relation to extracelullar laccase activity. *J. Basic Microbiol.* **38**: 371-382 (1998).
- **Grisolia C. K., Barata de Olivera A. B., Bonfim H., Klautau-guimarães M. D. N.** Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. *Genet. Mol. Biol.* **338**: 334–338 (2005).
 - **Gujarathi N. P.; Haney B. J.; Park H. J.; Wickramasinghe S. R.; Linden J. C.** Hairy roots of *Helianthus annuus*: a model system to study phytoremediation of tetracycline and oxytetracycline. *Biotechnol. Prog.* **21**: 775-780 (2005).
 - **Gustavson K. E., Sonsthagen S. A., Crunkilton R. A., Harkin J. M.** Groundwater toxicity assessment using bioassay, chemical, and toxicity identification evaluation analysis. *Environ. Toxicol.* **15**: 421-430 (2000).
 - **Hamid M., Khalil-ur-Rehman** Potential applications of peroxidases. *Food Chem.* **115**: 1177-1186 (2009).
 - **Hammel K.E, Tardone P.J.** Oxidative 4-dechlorination of polychlorated phenols is catalized by extracellular fungal lignin peroxidase. *Biochemistry* **27**: 6563-6568 (1988).
 - **Handayani N., Loos K., Wahyuningrum D., Zulfikar M. A.** Immobilization of *Mucor miehei* lipase onto macroporous aminated polyethersulfone membrane for enzymatic reactions. *Membranes* **2**: 198-213 (2012).
 - **Harris D. C.** Análisis químico cuantitativo. 6ta Ed. Editorial Reverte. California, USA. (2007)
 - **Harvey P. J. Campanella B. F., Castro P. M. L., Harms, H., Lichtfouse, E., Schaeffner A. R., Smrcek S., Werck-reichhart D.** Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **9** (1): 29-47 (2001).
 - **He J., Zhao C., Lercher J.** Impact of solvent for individual steps of phenol hydrodeoxygenation with Pd/C and HZSM-5 as catalysts. *J. Catal.* **309**: 362-375 (2014).
 - **Herkovits J., Pérez-Coll C. S.** Acclimation to low level exposure of cooper in *Bufo arenarum* embryos: linkage of effects to tissue residues. *Int. J. Environ. Res. Pub. Health* **4**: 166-172 (2007).
 - **Herkovits J., Perez-Coll C., Herkovits F. D.** Ecotoxicological studies of environmental samples from Buenos Aires area using a standardized amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX). *Environ. Pollut.* **116**: 177-183 (2002).

- **Herkovits J., Pérez-Coll C.S.** Bioensayos para test de toxicidad con embriones de anfibios ("ANFITOX"). *Ingeniería Sanitaria y Ambiental* **42**: 24-30 (1999).
- **Hernández-Ruiz J., Arnao M. B., Hiner A. N., García-Cánovas F., Acosta M.** Catalase-like activity of horseradish peroxidase: relationship to enzyme inactivation by H₂O₂. *Biochem J.* **354** (1): 107-114 (2001)
- **Hirose J., Nasu M., Yokoi H.** Reaction of substituted phenols with thermostable laccase bound to *Bacillus subtilis* spores. *Biotechnol. Lett.* **25**: 1609-12 (2003).
- **Hirvonen A., Trapido M., Hentunen J., Tarhanen J.** Formation of hydroxylated and dimeric intermediates during oxidation of chlorinated phenols in aqueous solutions. *Chemosphere* **41**: 1211-1218 (2000).
- **Hoshina M., Marin-Morales M.** Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **72**: 2090-2095 (2009).
- **Husain Q., Husain M., Kulshrestha, Y.** Remediation and treatment of organopollutants mediated by peroxidases: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **29** (2): 94-119 (2009).
- **Husain, Q., Ulber, R.** Immobilized peroxidase as a valuable tool in the remediation of aromatic pollutants and xenobiotic compounds: A Review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **41**: 770-804 (2011).
- **Iamarino G., Rao, M. A., Gianfreda L.** Dephenolization and detoxification of olive-mill wastewater (OMW) by purified biotic and abiotic oxidative catalysts. *Chemosphere* **74**: 216-223 (2009).
- **Ibáñez S. G., Sosa Alderete L. G., Medina M. I., Agostini E.** Phytoremediation of phenol using *Vicia sativa* L. plants and its antioxidative response. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **19**:1555-1562 (2012).
- **Ikehata K., Nicell J.** Color and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols. *Biotechnol. Prog.* **16**: 533-540 (2000).
- **Itoh K., Fujita M., Kumano K., Suyama K, Yamamoto H.** Phenolics acids affect transformations of chlorophenols by a *Coriolus versicolor* laccase. *Soil Biol. Biochem.* **32**: 85-91 (2000).
- **Iurascu B., Siminiceanu I., Vione D., Vicente M. A., Gil A.** Phenol degradation in water through a heterogeneous photo-Fenton process catalyzed by Fe-treated Iaponite. *Water Res.* **43**: 1313-1322 (2009).

- **Jha P., Jobby R., Kudale S., Modi, N., Dhaneshwar A., Desai N.** Biodegradation of phenol using hairy roots of *Helianthus annuus* L. *Int. Biodet. Biodegr.* **77**: 106-113 (2013).
- **Jiang Y., Tang W., Gao J., Zhou L., He Y.** Immobilization of horseradish peroxidase in phospholipid-templated titania and its applications in phenolic compounds and dye removal. *Enz. Microb. Technol.* **55**: 1-6 (2014).
- **Joner E. J. Hirmann D., Szolar O. H. J., Todorovic D., Leyval C., Loibner A. P.** Priming effects on PAH degradation and ecotoxicity during a phytoremediation experiment. *Environ. Pollut.* **128**: 429-435 (2004).
- **Júnior H. M., Silva J.D., Arenzon A., Portela C.S., Ferreira I.C., Henriques J.A.** Evaluation of genotoxicity and toxicity of water and sediment samples from a Brazilian stream influenced by tannery industries. *Chemosphere* **67**: 1211-1217 (2007).
- **Kalogeris E., Sanakis Y., Mamma D., Chiristakopoulos P., Kekos D., Stamatis H.** Properties of catechol 1,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* immobilized in calcium alginate hidrogels. *Enz. Microb. Technol.* **39**: 1113-1121 (2006).
- **Karam J., Nicell J. A.** Potential applications of enzymes waste treatment. *Chem. Technol. Biotechnol.* **69**: 141-147 (1997).
- **Karci A.** Degradation of chlorophenols and alkylphenol ethoxylates, two representative textile chemicals, in water by advanced oxidation processes: The state of the art on transformation products and toxicity. *Chemosphere* **99**: 1–18 (2014).
- **Kargi F., Eker, S.** Kinetics of 2,4-dichlorophenol degradation by *Pseudomonas putida* CP1 in batch culture. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **55**: 25-28 (2005).
- **Kauffmann C., Petersen, B. R., Bjerrum, M. J.** Enzymatic removal of phenols from aqueous solutions by *Coprinus cinereus* peroxidase and hydrogen peroxide. *J. Biotechnol.* **73**: 71-4 (1999).
- **Keri, R. A., Ho, S. M., Hunt, P. A., Knudsen, K. E., Soto, A. M., Prins, G. S.** An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A. *Reprod. Toxicol.* **24**: 240-252 (2007).
- **Keyhani J., Keyhani E., Einollahi N., Minai-Tehrani D., Zarchipour S.** Heterogeneous inhibition of horseradish peroxidase activity by cadmium. *Biochim. Biophys. Acta* **1621**: 140-148 (2003).
- **Kim E. Y., Chae H. J., Chu K. H.** Enzymatic oxidation of aqueous pentachlorophenol. *J. Environ. Sci.* **19**: 1032-1036 (2007).

- **Klibanov A. M., Alberti B. N., Morris E. D., Felshin L. M.** Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from waste waters. *J. App. Biochem.* **2**: 414-421 (1980).
- **Ko C., Chen S.** Enhanced removal of three phenols by laccase polymerization with MF / UF membranes. *Biores. Techn.* **99**: 2293-2298 (2008).
- **Kobayashi S., Higashimura H.** Oxidative polymerization of phenols revisited. *Prog. Polym. Sci.* **28**: 1015-1048 (2003).
- **Koh S., McCullar M. V., Focht D. D.** Biodegradation of 2,4-dichlorophenol through a distal meta - fission pathway. *App. Environ. Microb.* **63**: 2054-2057 (1997).
- **Kukavica B. M., Veljovic-Jovanovic S., Menckhoff L., Lüthje S.** Cell wall-bound cationic and cationic class III isoperoxidases of pea root: biochemical characterization and function in root growth. *J. Exp. Bot.* **63**: 695-709 (2012).
- **Kulshrestha Y., Husain Q.** Bioaffinity-based an inexpensive and high yield procedure for the immobilization of turnip (*Brassica rapa*) peroxidase. *Biomol. Eng.* **23** (6): 291-297 (2006b).
- **Kulshrestha Y., Husain Q.** Direct immobilization of peroxidase on DEAE cellulose from ammonium sulphate fractionated proteins of bitter melon (*Momordica charantia*). *Enz. Microb. Technol.* **38** (3-4): 470-477 (2006a).
- **Kulys J., Ivanec-Goranina R.** Peroxidase catalyzed phenolic compounds oxidation in presence of surfactant Dynol 604: a kinetic investigation. *Enz. Microb. Technol.* **44**: 368-372 (2009).
- **Kummer U., Valeur K. R., Baier G., Wegmann K., Olsen L. F.** Oscillations in the peroxidase-oxidase reaction: a comparison of different peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta* **1289**: 397-403 (1996).
- **Kurniawati S., Nicell J. A.** Efficacy of mediators for enhancing the laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol. *Enz. Microbial. Technol.* **41**: 353-361 (2007).
- **Kvesitadze G., Khatisashvili G., Sadunishvili T., Ramsden J. J.** Biochemical mechanisms of detoxification in higher plants. Basis of phytoremediation. Ed. Springer - Verlag Berlin Heidelberg. Georgia. 167-204 (2006).
- **Lan J., Guo D., Yuan X.** Influence of Cu (II) on the interaction between sulfite and horseradish peroxidase *in vitro*. *Spectrochim. Acta, Part A* **67**: 536-539 (2007).
- **Lascano C. I., Sotomayor V., Ferrari A., Venturino A.** Alteraciones del desarrollo embrionario, poliaminas y estrés oxidativo inducidos por plaguicidas

- organofosforados en *Rhinella arenarum*. *Acta Toxicológica Argentina* **17** (1): 8-19 (2009).
- **Laurenti E., Ghibaudi E., Ardisson S., Ferrari R. P.** Oxidation of 2,4-dichlorophenol catalyzed by horseradish peroxidase: Characterization of the reaction mechanism by UV-visible spectroscopy and mass spectrometry. *J. Inorg. Biochem.* **95**: 171-176 (2003).
 - **Laurenti E., Ghibaudi E., Todaro G., Ferrari R. P.** Enzymatic degradation of 2,6-dichlorophenol by horseradish peroxidase: UV-visible and mass spectrophotometric characterization of the reaction products. *J. Inorg. Biochem.* **92** (1): 75-81 (2002)
 - **Lemme D. M., Marin Morales M. A.** *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutat. Res.* **682**: 71-81 (2009).
 - **Li G. K., Sang N., Zhao Y. C.** Micronuclei induced by municipal landfill leachate in mouse bone marrow cells in vivo. *Environm. Res.* **95** (1): 77-81 (2004).
 - **Liochev S. I., Fridovich I.** Bicarbonate-enhanced peroxidase activity of Cu, Zn SOD: is the distal oxidant bound or diffusible? *Arch. Biochem. Biophys.* **421**: 255-259 (2004).
 - **Liu, J. R. Dong H.-W., Tang X.-L., Sun X.-R., Han X.-H., Chen B.-Q., Sun C.-H., Yang B.-F.** Genotoxicity of water from the Songhua River, China, in 1994-1995 and 2002-2003: Potential risks for human health. *Environ. Pollut.* **157**: 357-364 (2009).
 - **López-Molina D., Hiner A. N. P., Tudela J., García-Cánovas F. Rodríguez-López J. N.** Enzymatic removal of phenols from aqueous solution by artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts. *Enz. Microb. Techn.* **33**: 738-742 (2003).
 - **Lu B., Iwuoha E.I., Smith M.R., O'Kennedy R.** Effects of acetonitrile on horseradish peroxidase (HRP)-anti HRP antibody interaction. *Biosens. Bioelectron.* **12** (7): 619-625 (1997).
 - **Lu Q., Yu J., Gao J.** Degradation of 2,4-dichlorophenol by using glow discharge electrolysis. *J. Hazard. Mater.* **136**: 526-531 (2006).
 - **Ludwig-Müller J., Georgiev M., Bley T.** Metabolite and hormonal status of hairy root cultures of Devil's claw (*Harpagophytum procumbens*) in flasks and in a bubble column bioreactor. *Process Biochem.* **43**: 15-23 (2008).
 - **Lydy M., Belden J., Wheelock C., Hammock B., Denton D.** Challenges in regulating pesticide mixtures. *Ecol. Soc.* **9**: 1-15 (2004).

- Lyte J. S., Lyte T. F. Use of plants for toxicity assessment of estuarine ecosystems. *Env. Toxicol. Chem.* **20**: 63-68 (2001).
- Ma H., Zhang X., Ma Q., Wang B. Electrochemical catalytic treatment of phenol wastewater. *J. Hazard. Mater.* **165**: 475-480 (2009).
- Maehly P., Chance M. The assay of catalase and peroxidase. En *Methods of Biochemical Analysis*. Gluck D. (ed.) Interscience Publishers, New York. USA. 357-424 (1954).
- Magdaleno A., Puig A., de Cabo L., Salinas C., Arreghini S., Korol S., Bevilacqua S., López L., Moretton, J. Water pollution in an urban argentine river. *Environ. Contam. Toxicol.* **67**: 408-415 (2001).
- Maglione G. A. Aplicación de bioensayos para la evaluación de la toxicidad de productos de remoción de fenol. Trabajo final de Licenciatura en Ciencias Biológicas. UNRC (2010).
- Mahomoudi A., Nazari K., Mohammadian N., Moosavi-Movahedi A.A. Effect of Mn^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , and Cu^{+2} on horseradish peroxidase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **104**: 81-94 (2003).
- Malomo, S. O. Adeoye R. I., Babatunde L., Saheed I. A., Iniaghe M. O., Olorunniji F. J. Suicide inactivation of horseradish peroxidase by excess hydrogen peroxide: The effects of reaction pH, buffer ion concentration, and redox mediation. *Biokemistry* **23**: 124-128 (2011).
- Manikandan R., Prabhu H. J., Sivashanmugam P. Biodegradation of 2,4-dichlorophenol using *Mycoplana dimorpha* extracts and evaluation of kinetic parameters. *African J. Biotechnol.* **7**: 2038-2048 (2008).
- Mañas Torres F., Peralta L., Raviolo J., García Ovando H., Weyers A., Ugnia L., Gonzalez Cid M., Larripa I., Gorla N. Evaluation of genotoxicity of the herbicide glyphosate quantitatively measured by the comet assay and micronucleus formation in treated mice. *Theoria* **15**: 53-60 (2006).
- Mao L., Luo S., Huang Q., Lu J. Horseradish peroxidase inactivation: heme destruction and influence of polyethylene glycol. *Sci. Rep.* **3**. Artículo 3126 <http://www.nature.com/srep/2013/131104/srep03126/pdf/srep03126.pdf> (2013).
- Mattagajasingh S. N., Misra B. R., Misra H. P., Carcinogenic chromium (VI)-induced protein oxidation and lipid eroxidation: implications in DNA-protein crosslinking. *J. App. Toxicol.* **28** (8): 987-997 (2008).
- Matto M., Husain Q. Calcium alginate-starch hybrid support for both surface immobilization and entrapment of bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase. *J. Molec. Catal. B: Enz.* **57**: 164-170 (2009a).

- **Matto M., Husain Q.** Decolorization of textile effluent by bitter gourd peroxidase immobilized on concanavalin A layered calcium alginate-starch beads. *J. Hazard. Mater.* **164**: 1540-6 (2009b).
- **Meinertz J J.R, Greseth S.L., Gaikowski M.P., Schmidt L.J.** Chronic toxicity of hydrogen peroxide to *Daphnia magna* in a continuous exposure, flow-through test system. *Sci Total Environ.* **392**: 225-232 (2008).
- **Migliore L; Cozzolino S., Fiori M.** Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. *Chemosphere* 52 (7): 1233-1244 (2003).
- **Miletić N., Nastasović A., Loos K.** Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: possibilities, advantages, applications. *Biores. Technol.* **115**: 126-135 (2012).
- **Minard R. D., Liu S. Y., Bollag M.** Oligomers and quinones from 2,4-dichlorophenol. *J. Agric. Food Chem.* **29**: 250-253 (1981).
- **Molina-Jasso D., Alvarez-González I., Madrigal-Bujaidar E.** Clastogenicity of beta-caryophyllene in mouse. *Biol. Pharm. Bull.* **32**: 520–522 (2009).
- **Murashige T., Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* **15**: 473-479 (1962).
- **Mussi M. A, Calcaterra N. B.** Paraquat-induced oxidative stress response during amphibian early embryonic development. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **151**: 240–247 (2010).
- **Nakamoto S., Machida N.** Phenol removal from aqueous solution by peroxidase-catalyzed reaction using additives. *Water Res.* **26**: 49-54 (1992).
- **Nazari K., Esmaeili N., Mahmoudi A., Rahimi H., Moosavi-Movahedi A. A.** Peroxidative phenol removal from a aqueous solutions using activated peroxidase biocatalyst. *Enz. Microb. Technol.* **41**: 226-233 (2007).
- **Nazari K., Mahmoudi A., Khodafarin R., Moosavi-Movahedi A. A., Mohebi A.** Stabilizing and suicide-peroxide protecting effect of Ni²⁺ on horseradish peroxidase. *J. Iranian Chem. Soc.* **2** (3): 232-237 (2005a).
- **Nazari K., Mahmoudi A., Shahrooz M., Khodafarin R., Moosavi-Movahedi A. A.** Suicide-peroxide inactivation of horseradish peroxidase in the presence of Sodium n-Dodecyl Sulphate: A study of the enzyme deactivation kinetics. *J. Enz. Inhib. Med.Chem.* **20** (3): 285-292 (2005b).
- **O'Brien P.J.** Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chem. Biol. Interact.* **80** (1): 1-41(1991).
- **OECD Mammalian erythrocyte micronucleus test.** Guideline for the testing of chemicals, TG 474 (2014).

- **Ohe T., Watanabe T., Wakabayashi K.** (2004). Mutagens in surface waters: a review. *Mutat. Res.* **567**: 109-149.
- **Olivieri, G. Marzocchella A., Salatino P., Giardina P., Cennamo G., Sannia G.** Olive mill wastewater remediation by means of *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. Eng. J.* **31**: 180-187 (2006).
- **OMS.** IPCS: Environmental Health Criteria 161: Phenol. Genova. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc161.htm> (1994).
- **Padilla K.R., Blanco L.M., Orozco S., Jáuregui F.** Degradación oxidativa del 2,4-diclorofenol por la vía sonoelectroquímica. *Ciencia UANL* **7** (1) 51-59 (2004).
- **Paisio C. E.** Biorremediación de compuestos fenólicos utilizando bacterias aisladas del medio ambiente. Trabajo final de Doctorado en Ciencias Biológicas (2013).
- **Paisio C. E., González P. S., Gerbaudo A., Bertuzzi M. L., Agostini E.** Toxicity of phenol solutions treated with rapeseed and tomato hairy roots. *Desalination* **263**: 23-28 (2010).
- **Paisio C., Agostini E., González P. S., Bertuzzi M. L.** Lethal and teratogenic effects of phenol on *Bufo arenarum* embryos. *J. Hazard. Mater.* **167**: 64-68 (2009).
- **Pandard P. Devillers J., Charissou A.-M., Poulsen V., Jourdain M.-J., Férard J.-F., Grand C., Bispo A.** Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Sci. Total Environ.* **363**: 114-125 (2006).
- **Passardi F., Theiler G., Zamocky M., Cosio C., Rouhier N., Teixeira F., Marguis-Pinheiro M., Ioannidis V., Penel C., Falquet L., Dunand C.** PeroxiBase: the peroxidase database. *Phytochemistry* **68**: 1605-1611 (2007).
- **Pérez-Coll C. S., Herkovits J.** Bioensayos para test de toxicidad con embriones de anfibios ("ANFITOX"). *Ingeniería Sanitaria y Ambiental* **42**: 24-30 (1999a).
- **Pérez-Coll C. S., Herkovits J.** Bioensayos para test de toxicidad con embriones de anfibios ("ANFITOX"). *Ingeniería Sanitaria y Ambiental* **43**: 50-55 (1999b).
- **Pérez-Coll C. S., Herkovits J.** Lethal and teratogenic effects of naringenin evaluated by means of an amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX). *Food Chem. Toxicol.* **42**: 305-312 (2004).

- **Perez-Coll C. S., Herkovits J.** Synergistic effects of copper and butyric ester of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (Esternon Ultra) on amphibian embryos. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **3**: 343–7 (2006).
- **Petroutsos D., Katapodis P., Samiotaki M., Panayotou G., Ketos, D.** Detoxification of 2,4-dichlorophenol by de marine microalga *Tetraselmis marina*. *Phytochemistry* **69**: 707-714 (2008).
- **Pilon-Smits E.** Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol* **56**: 15-39 (2005).
- **Poerschmann J., Trommler U., Górecki T., Kopinke F. D.** (2009) Formation of chlorinated biphenyls, diphenyl ethers and benzofurans as a result of Fenton-driven oxidation of 2-chlorophenol. *Chemosphere* **75** (6): 772-780
- **Polcaro A. M., Palmas S.** Electrochemical oxidation of chlorophenols. *Ind. Eng. Chem. Res.* **36**:1791-1798 (1997).
- **Pramparo L., Stüber F., Font J., Fortuny A., Fabregat A., Bengoa C.** Immobilisation of horseradish peroxidase on Eupergit® C for the enzymatic elimination of phenol. **177**: 990–1000 (2010).
- **Qayyum H., Maroof H., Yasha K.** Remediation and treatment of organopollutants mediated by peroxidases: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **29**: 94–119 (2009).
- **Quan X. Shi H., Wang J., Qian Y.** Biodegradation of 2,4- dichlorophenol in sequencing batch reactors augmented with immobilized mixed culture. *Chemosphere* **50**: 1069-1074 (2003).
- **Quintanilla-Guerrero F. Duarte-vázquez M. A., García-Almendarez B. E.** Polyethylene glycol improves phenol removal by immobilized turnip peroxidase. *Bioresour. Technol.* **99**: 8605–8611 (2008).
- **Ramírez E. A., Zón M. A., Ulloa P. A. J., Squella J. A., Vergara L. N., Fernández H.** Adsorption of ochratoxin A (OTA) anodic oxidation product on glassy carbon electrodes in highly acidic reaction media: Its thermodynamic and kinetics characterization. *Electrochem. Acta* **55** (3): 771-778 (2010).
- **Regalado C., Quintanilla F., Garcia-Almendarez B. E.** Immobilization of turnip peroxidase for phenolic compounds removal from a model aqueous system by oxidative polymerization. *IFT Annual Meeting, Las Vegas, Nevada.* S. 99A-8 (2004).
- **Riva S.** Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol.* **24**: 219–226 (2006).

- **Rodríguez C. E., Shinyashiki M., Froines J., Yu R. C., Fukuto J. M., Cho A. K.** An examination of quinone toxicity using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Toxicology* **201**: 185-196 (2004).
- **Rodríguez Couto S., Toca Herrera J. L.** Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnol. Adv.* **24**: 500–513 (2006).
- **Rojas-Melgarejo F.** Cinnamic carbohydrate esters show great versatility as supports for the immobilization of different enzymes. *Enz. Microb. Technol.* **38**: 748–755 (2006).
- **Rojas-Melgarejo F.** Inmovilización de enzimas en ésteres cinámicos de carbohidratos: nuevos soportes fotoentrecruzables. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas. Universidad de Murcia (2002).
- **Rovedatti M. G., Castañé P. M., Topalián M. L., Salbián A.** Monitoring of organochlorine and organophosphorus pesticides in the water of the Reconquista river (Buenos Aires, Argentina). *Wat. Res* **35** (14): 3457-3461 (2001).
- **Ryan D., Leukes W., Burton S.** Improving the bioremediation of phenolic wastewaters by *Trametes versicolor*. *Bioresour. Technol.* **98** (3): 579-587 (2007)
- **Saidman S., Rueda E. H., Ferreira M. L.** Activity of free peroxidases, hematin, magnetite-supported peroxidases and magnetite-supported hematin in the aniline elimination from water-UV-vis analysis. *Biochem. Eng. J.* **28**: 177-186 (2006).
- **Sampedro I., D_Annibale A., Ocampo J. A., Stazi S. R., García-Romera I.** Bioconversion of olive-mill dry residue by *Fusarium lateritium* and subsequent impact on its phytotoxicity. *Chemosphere* **60**, 1393-1400 (2005).
- **Santos de Araujo B., Dec J., Marc J., Pietsch M.** Uptake and transformation of phenol and chlorophenols by hairy root cultures of *Daucus carota*, *Ipomoea batatas* and *Solanum aviculare*. *Chemosphere* **63**: 642–651 (2006).
- **Santucci R., Laurenti E., Sinibaldi F., Ferrari R. P.** Effect of dimethyl sulfoxide on the structure and the functional properties of horseradish peroxidase as observed by spectroscopy and cyclic voltammetry. *Biochim. Biophys. Acta* **1596**: 225-233 (2002).
- **Saylor G.L., Chen L., Kupferle M.J.** Time varying toxicity of effluents from the electrochemical oxidation of phenol. *Proc. Environm. Sci.* **18**: 451-463 (2013)
- **Schmidt W.** The micronucleus test. *Mutat. Res.* **31**: 9-15 (1975).

- **Schummer C., Groff C., Al Chami J., Jaber F., Millet M.** Analysis of phenols and nitrophenols in rainwater collected simultaneously on an urban and rural site in east of France. *Sci. Total Environ.* **407**: 5637–5643 (2009).
- **Serra M.A., Sabbioni E., Pintar A., Casella L.** Vanadium effect on the activity of horseradish peroxidase, catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase *in vitro*. *J. Inorg. Biochem.* **46** (3): 161-174 (1992).
- **Sharma S., Shahzad A., Sahai A.** Hairy root culture: an efficient system for secondary metabolite production. En: Recent trends in biotechnology and therapeutic applications of medicinal plants. Eds: Mohd S., Anwar S., Abida M., Aastha S. Springer .Paises Bajos. 51-78 (2013).
- **Shi X.; Leng H., Hu Y., Liu Y., Duan H., Sun H., Chen Y.** Removal of 2,4-dichlorophenol in hydroponic solution by four *Salix matsudana* clones. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **86**: 125–131 (2012).
- **Shin-Ya Y., Aye H. N., Hong K.-J., Kajiuchi T.** Efficacy of amphiphile – modified laccase in enzymatic oxidation and removal of phenolic in aqueous solution. *Enz. Microb. Technol.* **36**: 147-152 (2005)
- **Sidrach L., Hiner A. N. P., Chazarra S., Tudela J., García-Cánovas F., Rodríguez-López J. N.** Effects of calcium on the thermal stability, stability in organic solvents and resistance to hydrogen peroxide of artichoke (*Cynara scolymus* L.) peroxidase: a potential method of enzyme control. *J. Molec. Catal. B: Enz.* **42**: 78-84 (2006).
- **Singh N., Singh J.** An enzymatic method for removal of phenol from industrial effluent. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **32** (2): 127-133 (2002)
- **Singh P., Prakash R., Shah K.** Effect of organic solvents on peroxidases from rice and horseradish: Prospects for enzyme based applications. *Talanta* **97**: 204–210 (2012).
- **Singh S, Chandraa R., Patel D.K., Reddy M.M.K., Rai V.** Investigation of the biotransformation of pentachlorophenol and pulp paper mill effluent decolorisation by the bacterial strains in a mixed culture. *Biores. Techn.* **99** (13): 5703-5709 (2008a).
- **Singh S., Melo J. S., Eapen S.** Potential of vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash) for phytoremediation of phenol. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **71** (3): 671-676 (2008b).
- **Singh S., Melo J. S., Eapen S., Souza S. F. D.** Phenol removal using *Brassica juncea* hairy roots: Role of inherent peroxidase and H₂O₂. *J. Biotechnol.* **123**: 43-49 (2006).

- **Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A.** Principios de analisis instrumental. 5ta Ed. Mc Graw-Hill Interamericana de España, S. A. U., Madrid, 2001.
- **Sosa Alderete L. G., Ibáñez S. G., Agostini E., Medina M. I.** Phytoremediation of phenol at pilot scale by tobacco hairy roots. *Int. J. Environ. Sci.* **3** (1): 398-407 (2012).
- **Sosa Alderete L. G., Talano M. A., Ibáñez S. G., Purro S., Agostini E., Milrad S. R., Medina M. I.** Establishment of transgenic tobacco hairy roots expressing basic peroxidases and its application for phenol removal. *J. Biotechnol.* **139**: 273- 279 (2009).
- **Srivastava V. C., Swamy M. M., Mall I. D., Prasad B., Mishra I. M.** Adsorptive removal of phenol by bagasse fly ash and activated carbon: Equilibrium, kinetics and thermodynamics. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **272**: 89-104 (2006).
- **Steevensz A. Madur S., Feng W., Taylor K. E., Bewtra J. K., Biswas N.** Crude soybean hull peroxidase treatment of phenol in synthetic and real wastewater: enzyme economy enhanced by Triton X-100. *Enz. Microb. Technol.* **55**: 65-71 (2014).
- **Stockert J. C. Herkovits J.** Photodynamic toxicity and its prevention by antioxidative agents in *Bufo arenarum* embryos. *Toxicology* **192**: 211-218 (2003)
- **Suresh B., Bais H., Raghavarao K. S. M. S., Ravishankar G. A., Ghildyal, N. P.** Comparative evaluation of bioreactor design using *Tagetes patula L.* hairy roots as a model system. *Process Biochem.* **40**: 1509-1515 (2005).
- **Suresh B., Rajasekaran T., Rao S. R., Raghavarao K. S. M. S. & Ravishankar, G. a.** Studies on osmolarity, conductivity and mass transfer for selection of a bioreactor for *Tagetes patula L.* hairy roots. *Process Biochem.* **36**: 987-993 (2001).
- **Suresh B., Ravishankar G. A.** Phytoremediation - A novel and promising approach for environmental clean-up. *Crit. Rev. Biochem.* **24** (2-3): 97-124 (2004).
- **Suza W., Harris R., Lorence A.** Hairy roots: from high-value metabolite production to phytoremediation. *Electron. J. Integr.* **3**: 57-65 (2008).
- **Talano M. A, Busso D., Paisio C.** Phytoremediation of 2,4-dichlorophenol using wild type and transgenic tobacco plants. *Env. Sci. Poll. Res.* **19**: 2202-2211 (2012a).

- **Talano M. A., Frontera S., González P., Medina M. I, Agostini E.** Removal of 2,4-dichlorophenol from aqueous solutions using tobacco hairy root cultures. *J. Hazard. Mater.* **176** (1-3): 784-791 (2010).
- **Talano M. A., Wevar Oller A. L., González P. S. Agostini E.** Hairy roots, their multiple applications and recent patents. *Recent Patents on Biotechnology* **6** (2): 115-133 (2012b)
- **Tesio A. Y., Granero A. M., Fernández H., Zón M. A.** Characterization of the surface redox process of adsorbed morin at glassy carbon electrodes. *Electrochem. Acta* **56** (5): 2321-2327 (2011).
- **Thimmaraju R., Bhagyalakshmi N., Vinod K., Venkatachalam L., Sreedhar R. V., Ravishankar G. A.** Peroxidase production from hairy root cultures of red beet (*Beta vulgaris*). *Biotechnology* **8** (2): 185-196 (2005).
- **Thomas M. A.** Study on the efficiency of Polysorbate 20 as additive for phenol removal from aqueous solutions catalyzed by horseradish peroxidase d iscovery. *Discovery Science* **5**: 4-6 (2013).
- **Tonegawa M., Dec J., Bollag J.** Use of additives to enhance the removal of phenols from water treated with horseradish and hydrogen peroxide. *J. Environ. Qual.* **32**: 1222-1227 (2003).
- **Torres-Rodríguez M. T.** Empleo de los ensayos con plantas en el control de contaminantes tóxicos ambientales. *Rev. Cubana Hig. Epidemiol.* **41**: 2-3 (2003).
- **Trivedi U., Bassi A., Zhu J.** Continuous enzymatic polymerization of phenol in a liquid–solid circulating fluidized bed. *Powder Technol.* **169**: 61–70 (2006).
- **Tsioulpas A., Dimou D., Iconomou D., Aggelis G.** Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresour. Technol.* **84**: 251–257 (2002).
- **Ugrekhelidze D., Kvesitadze G.; Arziani B., Mithaishvili T., Phiriashvili V.** Detoxification of phenol in annual plant seedlings. *Ecotoxicol. Environm. Safety* **42**: 119-124 (1999).
- **United States Environmental Protection Agency (US-EPA)** Ambient water quality criteria for 2,4-dichlorophenol. EPA 440- 5-80-042. (1980).
- **United States Environmental Protection Agency (US-EPA)** Ecological effects test guidelines. OPPTS 850.4200. Seed germination/root elongation toxicity test. EPA 712-C-96-154 (1996).

- **Ureta-Zañartu M. S., Bustos P., Berríos C., Diez M. C., Mora M. L., Gutiérrez C.** Electrooxidation of 2,4-dichlorophenol and other polychlorinated phenols at as glass carbón electrode. *Electrochem. Acta* **47**: 2399-2406 (2002).
- **Valcárce J. I.** Oxidación química de metanol y fenol sobre aplicacion de dióxido de plomo puro y dopado: aplicación al tratamiento electroquímico de aguas residuales. Tesis para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Químicas, Espec. Química Física. Universidad de Alicante. España. (1999).
- **Valerio M. E., Fernández García J., Peinado F. M.** Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa L.*). *Sci. Total Environ.* **378**: 63–66 (2007).
- **Varsavsky A.** Química verde y prevención de la contaminación (2002). <http://www.aqa.org.ar/iyq1.htm>
- **Vasileva N., Godjevargova T., Ivanova D., Gabrovska K.** Application of immobilized horseradish peroxidase onto modified acrylonitrile copolymer membrane in removing of phenol from water. *Int. J. Biol. Macromol.* **44**: 190–194 (2009).
- **Venturino A., Rosembaum E., Caballero de Castro A., Anguiano O. L., Gauna L., Fonovich de Schroeder T., Pechen de D'Angelo A. M.** Biomarkers of effects in toads and frogs. *Biomarkers* **8**: 167-218 (1999).
- **Vojinović V., Carvalho R., Lemos F.** Kinetics of soluble and immobilized horseradish peroxidase-mediated oxidation of phenolic compounds. *Biochem. Eng. J.* **35**: 126–135 (2007).
- **Wagner M., Nicell J. A.** Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Res.* **36**: 4041-4052 (2002).
- **Wahby I.** Aproximaciones biotecnológicas tendentes a la mejora del cáñamo (*Cannabis sativa L.*): Obtención y cultivo de raíces transformadas, transformación genética y regeneración *in vitro*. Tesis doctoral. Universidad de Granada. España. (2007).
- **Wang J., Frotsman L. M., Ward M. D.** Self-assembled thiol monolayers with carboxylic acid functionality: measuring pH-dependent phase transitions with the quartz crystal microbalance. *J. Phys.Chem.* **96**: 5224-5228 (1992).
- **Weschler C. J.** Changes in indoor pollutants since 1950s. *Atmospheric Enviroment.* **43**: 153-169 (2009).
- **Wevar Oller A. L., Agostini E., Talano M., Capozucca C., Milrad S. R., Tigier H. A., Medina M. I.** Overexpression of a basic peroxidase in transgenic tomato

- (*Lycopersicon esculentum* Mill. Cv. Pera) hairy roots increases phytoremediation of phenol. *Plant Sci.* **169**: 1102-1111 (2005).
- **Wolkowicz, I. R., Herkovits, J., Pérez Coll. S.** Stage-dependent toxicity of Bisphenol A on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) embryos and larvae. *Environm. Toxicol.* **29** (2):146-54 (2014).
 - **Wu Y., Bewtra J. K., Biswas N., Taylor K. E.** Removal of phenol derivates from aqueous solution by enzymatic reaction with additives. *Proceedings of the 48th Purdue industrial waste Conference, Lewis Publishers, Chelsea MI.* 421-431 (1993).
 - **Wu Y., Taylor K. E., Biswas N., Bewtra J. K.** A model for protective effect of additives on the activity of horseradish peroxidase in the removal of phenol. *Enz. Microb. Technol.* **22**: 315-322 (1998).
 - **Yang S., Wu R. S. S., Kong R. Y. C.** Physiological and cytological responses of the marine diatom *Skeletonema costatum* to 2,4-dichlorophenol. *Aquatic Toxicol.* **60** (1-2): 33-41 (2002).
 - **Yen G. C., Chen H. Y., Peng H. H.** Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. *Food Chem. Toxicol.* **39**: 1045-1053 (2001).
 - **Young B. J, Riera N. I., Beily M. E., Bres P.A., Crespo D. C., Ronco A. E.** Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **76**: 182-186 (2012).
 - **Yslas E. I. Ibarra L. E., Peralta D. O., Barbero C. A., Rivarola V. A., Bertuzzi M. L.** Polyaniline nanofibers: acute toxicity and teratogenic effect on *Rhinella arenarum* embryos. *Chemosphere* **87**: 1374-1380 (2012).
 - **Yu J., Taylor K. E., Zhou H., Bewtra J. K.** Phenol conversión and dimeric intermediates in horseradish peroxidase-catalized phenol removal from wáter. *Environ. Sci. Technol.* **28**: 2154-2160 (1994).
 - **Zhai R. Zhang B., Wan Y., Li C., Wang J., Liu, J.** Chitosan-halloysite hybrid-nanotubes: Horseradish peroxidase immobilization and applications in phenol removal. *Chem. Eng. J.* **214**: 304-309 (2013).
 - **Zhang G., Nicell J.** Treatment of aqueous pentachlorophenol by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Res.* **34**: 1629-1637 (2000).
 - **Zhang J., Xu Z., Chen H., Zong Y.** Removal of 2,4-dichlorophenol by chitosan-immobilized laccase from *Coriolus versicolor*. *Biochem. Eng. J.* **45**: 54-59 (2009).

- **Zhang J., Ye P., Chen S., Wang W.** Removal of pentachlorophenol by immobilized horseradish peroxidase. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **59**: 307–314 (2007).
- **Zhang L., Zhao W., Ma Z., Nie G., Cui Y.** Enzymatic polymerization of phenol catalyzed by horseradish peroxidase in aqueous micelle system. *Eur. Polym. J.* **48**: 580-585 (2012).
- **Zhong W., Wang D., Xu X.** Phenol removal efficiencies of sewage treatment processes and ecological risks associated with phenols in effluents. *J. Hazard. Mater.* **217-218**: 286-292 (2012).
- **Zhou T., Li Y., Wong F., Lu X.** Enhanced degradation of 2,4-dichlorophenol by ultrasound in a new Fenton like system (Fe/EDTA) at ambient circumstance. *Ultrason. Sonochem.* **15**: 782-790 (2008).
- **Zhu N., Li H., Li G., Sang N.** Coking wastewater increases micronucleus frequency in mouse *in vivo* via oxidative stress. *J. Environ. Sci.* **25**: 2123-2129 (2013).
- **Ziemys A., Kulys J.** Heme Peroxidase chloting and inhibition with poliphenolic substances revealed by molecular modelling. *Comput. Biol. Chem.* **29**: 83-90 (2005a).
- **Ziemys A., Kulys J.** Inhibition of the heme peroxidase during phenol derivates oxidation. Possible molecular cloaking of the active center. *Int. J. Molec. Sci.* **6**: 245-256 (2005b).