

OXIDACIÓN BIOCATALÍTICA DE CONTAMINANTES AROMÁTICOS POR LA PEROXIDASA PROVENIENTE DE LA SOYA

Bio-catalytic oxidation of aromatic pollutants caused by peroxidase deriving from soybean

María Ixel Hernández Hernández¹, Cynthia Romero Guido², Eduardo Torres Ramírez³

¹ Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Biología, México.

²⁻³ Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Instituto de Ciencias, México.

Email: ¹maria.hernandezhernandez@viep.com.mx, ²cynthia.romerogui@correo.buap.mx, ³eduardo.torres@correo.buap.mx

(Recibido 20 de mayo de 2022 y aceptado 20 de junio de 2022)

Resumen

El presente artículo describe el desempeño biocatalítico de la enzima peroxidasa de la soya para oxidar contaminantes acuosos del tipo aromáticos como plaguicidas organofosforados, hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs), y flavonoides provenientes de residuos agroindustriales. Los ensayos se realizaron en muestras modelo y también en muestras simuladas de efluentes contaminados. El análisis se hizo por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y por espectrofotometría UV-vis. Las conversiones alcanzadas fueron para los plaguicidas terbufos (14%) y dimetoato (30% de conversión); para los HPAs como azuleno (32%), 9-metil antraceno (22%); antraceno y pireno (29% cada uno), y carbazol (18%); y los flavonoides como ácido ferúlico (99%), quercetina (98%), rutina (50%) y naringina (10%). Se estudió el efecto del cambio de pH y de temperatura en la actividad de la enzima, siendo activa desde un pH de 3 hasta 6, y desde los 25 °C hasta los 80 °C. Lo anterior permite concluir que la peroxidasa de soya es un buen candidato para estudios más completos para su posible aplicación en la descontaminación de efluentes que contienen contaminantes aromáticos.

Palabras clave: biocatálisis, contaminantes aromáticos, peroxidasa de soya.

Abstract

This paper describes the biocatalytic performance of soybean peroxidase enzyme to oxidize aqueous aromatic pollutants such as organophosphorus pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), and flavonoids from agro-industrial wastes. The conversions were achieved for the pesticides terbufos (14%) and dimethoate (30% conversion); for HPAs such as azulene (32%), 9-methyl anthracene (22%); anthracene, pyrene (29% each), and carbazole (18%); and for flavonoids such as ferulic acid (99%), quercetin (98%), rutin (50%) and naringin (10%). The tests were carried out on model samples and on simulated samples of contaminated effluents. In addition, the effect of pH and temperature on the enzyme activity was studied, being active from pH 3 to 6, and from 25 °C to 80 °C. The above concludes that soybean peroxidase is a good candidate for more comprehensive studies for possible application in effluents treatment containing aromatic pollutants.

Key words: biocatalysis, aromatic pollutants, soybean peroxidase.

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación por productos orgánicos aromáticos es cada vez mayor debido a la producción continua y el uso frecuente de compuestos en la industria química, la agricultura, los alimentos, así como en el uso de combustibles derivados del petróleo [1, 2]. Los productos químicos que son fácilmente biodegradables presentan un bajo impacto ambiental comparado con aquellos que son recalcitrantes o de difícil degradación como los plaguicidas, colorantes, hidrocarburos policíclicos y heterocíclicos derivados de la combustión incompleta de combustibles fósiles. La presencia de los contaminantes aromáticos en agua, suelo y aire trae consigo un impacto en la salud de los ecosistemas, incluida la salud humana [3]. Se sabe que algunos contaminantes aromáticos son mutagénicos, carcinógenos, disruptores endocrinos, etc. [4, 5].

Para su eliminación, se han desarrollado e implementado tecnologías fisicoquímicas y biológicas con resultados variados [6, 7]. Sin duda, la implementación de tecnologías sustentables es lo más deseable, pues permiten minimizar el impacto ambiental de su propia implementación. Una de estas tecnologías en desarrollo es la biocatálisis ambiental, que implica la detección, la cuantificación y el tratamiento de contaminantes orgánicos mediante enzimas [8].

La oxidación catalizada por enzimas se realiza a altas velocidades, en condiciones suaves de reacción, no genera lodos residuales, no requiere reactivos tóxicos, produce compuestos con reducida toxicidad y alta biodegradabilidad. Una candidata interesante es la peroxidasa de soya, la cual es una enzima que utiliza peróxido de hidrógeno para catalizar la oxidación de numerosos sustratos aromáticos, convirtiéndolos a sus derivados cetónicos o hidroxilados [9].

Dada su disponibilidad comercial y su capacidad probada para oxidar compuestos fenólicos, la peroxidasa de soya se propone como una enzima potencial para su desarrollo y eventual aplicación en tratamiento ambiental. Por

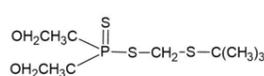
lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad oxidativa de la peroxidasa de soya para transformar algunos plaguicidas organofosforados, HPAs y flavonoides, contaminantes de la industria agrícola, del petróleo y de alimentos respectivamente.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

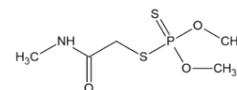
La peroxidasa de soya, con actividad catalítica estándar de 25-100 unidades / mg de proteína, así como los compuestos aromáticos descritos en la Figura 1, fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI). Los disolventes orgánicos como acetonitrilo e isopropanol grado HPLC, el peróxido de hidrógeno, asimismo las sales fosfato de sodio monobásico y dibásico grados reactivo analítico fueron obtenidos de JT Baker.

Los ensayos de oxidación se realizaron en una mezcla de reacción (1 mL) que contenía 100 μ M del compuesto aromático a ensayar con 10% de acetonitrilo (para favorecer la solvatación de compuesto), en amortiguador de fosfatos 60 mM a un pH 6.1, con 250 nM de peroxidasa de soya y se inició la reacción adicionando 260 μ M de peróxido de hidrógeno. La reacción se detuvo con la adición de 1 mL de disolvente ACN (Acetonitrilo) después de 10 minutos. El control consistió en el mismo medio de reacción en ausencia de la enzima.

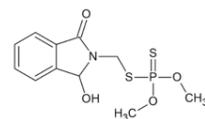
Plaguicidas



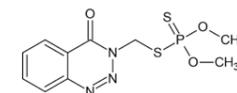
Terbufos



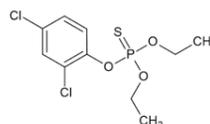
Dimetoato



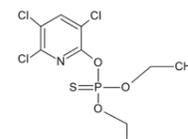
Fosmet



Azinfos-metil

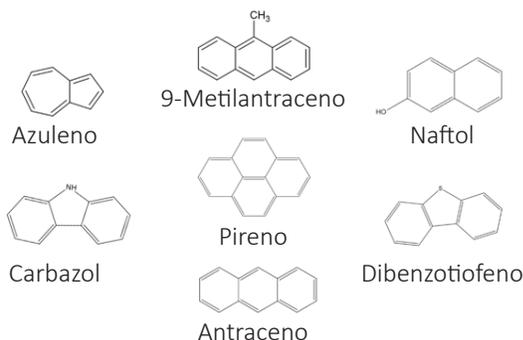


Diclofentión



Clorpirifos

Hidrocarburos aromáticos policíclicos



Flavonoides

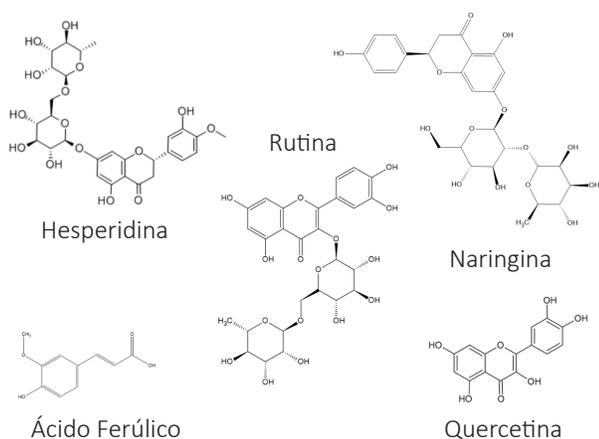


Figura 1. Estructuras químicas de los compuestos químicos ensayados.

Se utilizó un HPLC marca Perkin-Elmer equipado con un detector UV 785 A, y una bomba binaria serie 200; se usó una columna fase reversa C18 (Spheri-5 RP-18), con tamaño de partícula de 5 micras, de 100 mm de largo x 4.6 mm de ancho. El progreso de la reacción se monitoreó por cambios en el área del pico de elución del compuesto, eluyendo con una fase isocrática de 80% acetonitrilo, 20% agua, a 1 mL/min. La conversión se determinó por el cambio de área de los picos de HPLC de cada compuesto (antes y después de la reacción).

Para el caso de los flavonoides, la reacción se monitoreó por espectrofotometría en el rango de 200 a 600 nm en un espectrofotómetro UV-Vis marca Varían modelo Cary

50. De igual manera, la conversión se determinó por el cambio de absorbancia de las bandas de transición antes y después de la reacción.

Para conocer el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad catalítica de la peroxidasa de soya se calculó la actividad catalítica de la enzima en la oxidación del ácido ferúlico como el cambio de absorbancia por unidad de tiempo, a 320 nm (DAbS/min), en un intervalo de pH de 3 a 9, y en el rango de temperatura de 25-80 °C, en las condiciones de reacción descritas anteriormente.

Finalmente, el ensayo de oxidación utilizado como muestra de reacción un efluente de la industria alimenticia se llevó a cabo de la siguiente manera: 20 mL de una muestra proveniente de una industria de nixtamalización del maíz, con altos contenidos de ácido ferúlico y otros ácidos fenólicos, se sometieron a oxidación enzimática con la aplicación de 250 nmoles de peroxidasa y 1 mmol de H₂O₂. No realizó un ajuste de pH, ni de fuerza iónica. La reacción se llevó cabo a temperatura ambiente bajo agitación constante. Se monitoreó la oxidación espectrofotométricamente en el rango de 200-800 nm.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La peroxidasa de soya logró oxidar 11 de los 18 compuestos ensayados. Entre ellos, dos plaguicidas organofosforados, 5 HPAs y 4 flavonoides, a diferentes conversiones bajo condiciones idénticas de reacción (Tabla 1). Los plaguicidas organofosforados representan una clase de compuestos recalcitrantes, de alta toxicidad, por lo que su oxidación es deseable siempre y cuando esa oxidación lleve a compuestos más biodegradables o menos tóxicos.

En un reporte previo, otra peroxidasa, la cloroperoxidasa del hongo *Caldaromyces fumago*, catalizó la oxidación de este tipo de plaguicidas; sin embargo, los productos identificados fueron compuestos oxones, en donde el azufre fue sustituido por un oxígeno, esta sustitución hace más reactivo y tóxico al producto que el compuesto parental [10].

Por otro lado, la oxidación de HAPs por peroxidases está más documentado; los productos de reacción son compuestos cetónicos, lo cuales son más biodegradables y miles de veces menos tóxicos, por lo que la oxidación con la peroxidasa de soya resulta de interés al catalizar la reacción rápidamente (10 minutos de reacción) y en condiciones suaves de reacción (pH neutro, temperatura ambiente). Sin embargo, es necesario optimizar las condiciones de reacción para lograr una mayor conversión.

Por otra parte, los flavonoides son compuestos antioxidantes benéficos para la salud humana que terminan siendo contaminantes debido a la alta descarga de desechos de alimentos a las corrientes de agua. Por ejemplo, los efluentes de la industria del maíz tienen una demanda química de oxígeno mayor a los 15 000 mg O₂/L, lo que lo hace altamente contaminante, aunque un porcentaje de esa demanda está generada por proteínas, vitaminas, antioxidantes, etc. [11].

La oxidación de flavonoides con peroxidases produce de manera general dímeros o trímeros, o incluso polímeros, con actividades biológicas interesantes, potencialmente útiles como productos biotecnológicos [12]. De esta manera, la oxidación de efluentes conteniendo flavonoides puede ser vista como un proceso de tratamiento, pero también un proceso de recuperación de productos de interés comercial, esto ayudaría a incrementar la sustentabilidad de un proceso enzimático [13].

Una característica importante de los efluentes contaminados es su variabilidad en pH y temperatura, por lo que las tecnologías de tratamiento propuestas deberán ser suficientemente robustas y no disminuir su desempeño con la variación de estos parámetros [14]. Por lo anterior, se determinó el perfil de actividad catalítica de la peroxidasa a diferentes valores de pH y temperatura; se usó al ácido ferúlico como compuesto modelo para este estudio debido a su facilidad de manejo y de análisis por espectrofotometría UV-vis.

Tabla 1. Porcentaje de remoción en los compuestos ensayados.

Compuesto	Porcentaje de remoción (%)
Terbufos	14.23
Dimetoato	30.26
Azuleno	31.89
9-Metil-Antraceno	21.96
Pireno	29.45
Naftol	29.50
Dibenzotiofeno	18.84
Ácido ferulico	99.00
Quercetina	98.00
Rutina	50.00
Narangina	10.00

La Figura 2 muestra el efecto del cambio de pH en la actividad catalítica de la peroxidasa; al igual que otras enzimas, el perfil muestra una campana; el máximo de actividad para esta enzima sucedió a pH 4.5 un valor relativamente ácido; sin embargo, la enzima es activa desde un pH 3.5 hasta un valor neutro de 6. Lo anterior significa una ventaja operativa, ya que la enzima podría mantenerse activa si el pH del efluente se cambiará en ese intervalo.

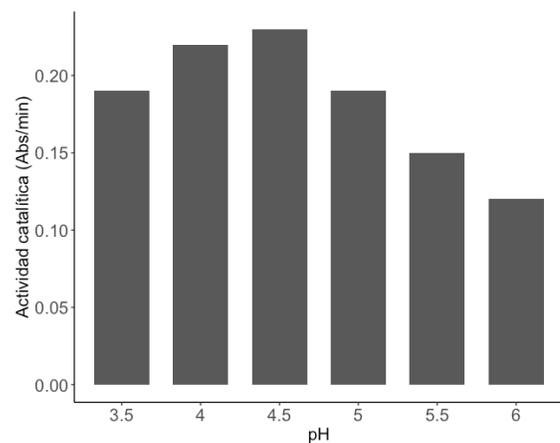


Figura 2. Actividad de la peroxidasa de soya en reacciones con diferente pH.

Por otro lado, el comportamiento a los cambios de temperatura mostró un resultado inesperado; en lugar

de la típica campana de comportamiento de actividad, la peroxidasa de soya incrementó su actividad al incrementarse la temperatura, hasta 80 °C; por cuestiones técnicas del manejo de muestra, no se pudo realizar el ensayo a temperaturas mayores. Ambos perfiles muestran que la peroxidasa de soya puede ser aplicable en efluentes con variaciones de los valores de pH y temperatura. Aunque una temperatura de 80 °C es excesiva, puede ser atractiva su aplicación en otras áreas como la de la síntesis de químicos finos [15].

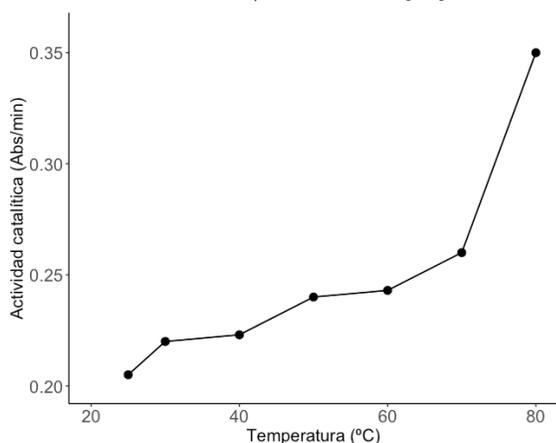


Figura 3. Efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica de la peroxidasa de soya

Como un ensayo preliminar para la aplicación de la enzima peroxidasa de soya en el tratamiento de efluentes de la industria alimenticia, se llevó a cabo la metodología de oxidación de una muestra proveniente de la industria de la nixtamalización del maíz. Los espectros de absorción electrónica antes y después de la oxidación con la peroxidasa de soya presentados en la Figura 4 muestran claramente que la enzima tiene la capacidad de oxidar a los compuestos aromáticos presentes. Este efluente es rico en ácido ferúlico y otros ácidos fenólicos, y la banda de transición observada es muy similar a la del ácido ferúlico puro. Al ser oxidada la muestra por la peroxidasa, el espectro de absorción cambia, mostrando una menor absorbancia. La medición de los ácidos fenólicos totales, antes y después de la reacción, indica que se oxidó el 50% de los fenoles presentes.

4. CONCLUSIONES

La peroxidasa de soya se presenta como una enzima con capacidad de reconocer y catalizar la oxidación de un conjunto de compuestos aromáticos contaminantes, detectados frecuentemente en los compartimentos ambientales.

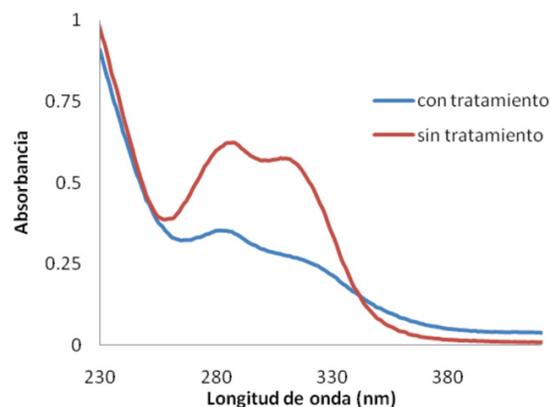


Figura 4. Espectros de absorción electrónica de las muestras tomadas de una industria alimenticia antes (Rojo) y después (Azul) de la oxidación con la peroxidasa de soya

La oxidación ocurrió en tiempos cortos, y en condiciones suaves de pH y temperatura. La enzima presentó adaptabilidad a los cambios de pH y temperatura dos parámetros importantes de operación en las plantas de tratamiento de aguas residuales, aunque su mejor desempeño fue a un pH cercano al neutro. Respecto a la temperatura, la mejor actividad biocatalítica se presentó a altas temperaturas, pero operacionalmente no es recomendable incrementar este valor para el tratamiento de aguas residuales.

Por lo tanto, es necesario aun profundizar en los estudios para mejorar el desempeño de la peroxidasa como biocatalizador, por un lado, optimizando las condiciones de reacción; y por otro, entendiendo mejor el efecto de las condiciones de reacción no controlables. Además, es imprescindible desarrollar procedimientos de inmovilización de la enzima en materiales sólidos que permitan su reciclabilidad, y con ello, abaratar el costo que

representa el consumo del biocatalizador. Finalmente, también es necesario identificar la naturaleza de los productos de reacción, y determinar su biodegradabilidad y toxicidad, para conocer el posible impacto ambiental de la tecnología.

REFERENCIAS

- [1] H. I. Abdel-Shafy, M.S.M. Mansou, "A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation", *Egyptian Journal of Petroleum*, vol 25, num. 1, pp. 107-123, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>
- [2] W.W.Anku, M.A. Mamo, and P.P. Govender, "Phenolic Compounds in Water: Sources, Reactivity, Toxicity and Treatment Methods", In *Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications*. M. Soto-Hernandez, M. Palma-Tenango, and M. d. R. Garcia-Mateos, Ed. IntechOpen, 2017.
- [3] L. Wang, A.G. Asimakopoulos, K. Kannan, "Accumulation of 19 environmental phenolic and xenobiotic heterocyclic aromatic compounds in human adipose tissue". *Environmental International*, vol. 78, pp. 45-50, 2015. DOI: 10.1016/j.envint.2015.02.015
- [4] J. Michałowicz, W. Duda, "Phenols – Sources and Toxicity", *Polish Journal of Environmental Studies*, vol. 16, num. 3, pp. 347-362, 2007. Disponible en: http://www.pjoes.com/pdf-87995-21854?filename=Phenols%20_%20Sources%20and.pdf
- [5] Y. Guo, K. Wu, X. Huo, and X. Xu, "Sources, Distribution, and Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons" *Journal of Environmental Health*, vol. 73 (9), pp. 22–25, mayo, 2011. Disponible en: <https://www.jstor.org/stable/26329217>
- [6] L.G.C Villegas, N. Mashhadi, M. Chen, I. "A Short Review of Techniques for Phenol Removal from Wastewater" *Current Pollution Repots*, vol. 2, pp. 157–167, Septiembre, 2016. <https://doi.org/10.1007/s40726-016-0035-3>
- [7] I.A. Saleh, N. Zouari, M.A. Al-Ghouti, "Removal of pesticides from water and wastewater: Chemical, physical and biological treatment approaches", *Environmental Technology & Innovation*, vol. 9, num. 101026, Agosto, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101026>
- [8] M. Alcalde, M. Ferrer, F.J. Plou, A. Ballesteros "Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes", *Trends in Biotechnology*, vol. 24, num. 6, pp. 281-287, Junio, 2006. DOI: 10.1016/j.tibtech.2006.04.002
- [9] S. Aaron, L.G. Cordova Villegas, W. Feng, K.E. Taylor, J.K. Bewtra, and N. Biswas, "Soybean peroxidase for industrial wastewater treatment: a mini review", *Journal of Environmental Engineering and Science*, vol. 9 (3), pp. 181-186, Septiembre, 2014. <https://doi.org/10.1680/jees.13.00013>
- [10] J. Hernandez, N.R. Robledo, L. Velasco, R. Quintero, M.A. Pickard, R. Vazquez-Duhalt, "Chloroperoxidase-Mediated Oxidation of Organophosphorus Pesticides", *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 61, (2), pp. 87-98, 1998. <https://doi.org/10.1006/pest.1998.2351>
- [11] J.L. García-Zamora, M. Sánchez-González, J.A. Lozano, J. Jáuregui, T. Zayas, V. Santacruz, F. Hernández, E. Torres, "Enzymatic treatment of wastewater from the corn tortilla industry using chitosan as an adsorbent reduces the chemical oxygen demand and ferulic acid content", *Process Biochemistry*, vol. 50, (1), pp. 125-133, Enero, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.012>
- [12] S. Nagarajan, R. Nagarajan, J. Kumar, A. Salemme, A.R. Togna, L. Saso, and F. Bruno, "Antioxidant Activity of Synthetic Polymers of Phenolic Compounds", *Polymers*, vol. 12 (8) 1646, Julio, 2020. <https://doi.org/10.3390/polym12081646>
- [13] L. F. Rojas, P. Zapata, L. Ruiz-Tirado, "Agro-industrial waste enzymes: Perspectives in circular economy", *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, vol. 34, (100585), Abril, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100585>
- [14] G. Bairán, G. Rebollar-Pérez, E. Chávez-Bravo, E. Torres, "Treatment Processes for Microbial

Resistance Mitigation: The Technological Contribution to Tackle the Problem of Antibiotic Resistance", *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 17, (8866), Noviembre, 2020. DOI: 10.3390/ijerph17238866

- [15] L. Casella, E. Monzani, S. Nicolis, "Potential Applications of Peroxidases in the Fine Chemical Industries", in *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*, E. Torres and M. Ayala, Ed. Springer, Berlin, Heidelberg, 2010.