



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**“Cambios en la morfología y fisiología de plantas de *Cyperus  
laxus* y el papel de sus metabolitos como mediadores  
metabólicos durante la remoción de hidrocarburos en sistemas  
de fitorremediación y cultivos *in vitro*”**

**T E S I S**

Que presenta

**Noemí Araceli Rivera Casado**

Para obtener el Grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE**

**BIOTECNOLOGÍA**

Director de la Tesis:

**Dr. Graciano Calva Calva**

**México D.F**

**diciembre, 2015**

## COMITÉ TUTORIAL

**Director de Tesis:**

Dr. Graciano Calva Calva.

CINVESTAV-DBB

**Asesora:**

Dra. Refugio Rodríguez Vázquez.

CINVESTAV-DBB

**Asesora:**

Dra. Ma. Del Carmen Montes Horcasitas

CINVESTAV-DBB

**Asesor:**

Dr. Fernando Esparza García

CINVESTAV-DBB

**Asesor:**

Dr. Armando Ariza Castolo

CINVESTAV-DQ

**Asesor:**

Dr. Ronald Ferrera Cerrato

COLPOS



---

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Ingeniería Metabólica del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional con el soporte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México) bajo la dirección del profesor investigador Dr. Graciano Calva Calva, y la asesoría de los profesores investigadores: Dra. Refugio Rodríguez Vázquez, Dra. María del Carmen Montes Horcasitas, Dr. Fernando José Esparza García, Dr. Armando Ariza Castolo y Dr. Ronald Ferrera Cerrato.

---

## DECLARATORIA

“Cambios en la morfología y fisiología de plantas de *Cyperus laxus* y el papel de sus metabolitos como mediadores metabólicos durante la remoción de hidrocarburos en sistemas de fitorremediación y cultivos *in vitro*”

---

Certifico que el contenido de esta tesis es el resultado de mi trabajo, excepto donde se dan las debidas referencias a otros autores, como parte complementaria de una sección del trabajo experimental. Esta tesis, no ha sido presentada previamente en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados de Instituto Politécnico Nacional, ni en alguna otra institución de enseñanza.

---

**M. en C. Noemí Araceli Rivera Casado**

## **DEDICATORIA**

### **A DIOS,**

Por la vida, la fortaleza, la gracia... por la oportunidad de servirle día a día con los frutos de este trabajo

### **A MI QUERIDO ESPOSO: CARLOS,**

Por su apoyo incondicional, su gran paciencia y cariño.. por sus palabras de aliento que llegaban cuando más lo necesitaba

### **A MIS TRES MOSQUETEROS: AARÓN, MATÍAS Y JOSÉ,**

Porque cada día con ustedes es una gran aventura... por ser mi fuente de alegría e inspiración.

### **A MIS PAPÁS: SERGÍO Y ARACELI**

Porque sin todo su apoyo y cariño no hubiera podido concluir esta etapa.

### **A MI HERMANO: ESTEBAN JOSUÉ,**

Por sus consejos oportunos y su enorme cariño.

## AGRADECIMIENTOS

Al **CINVESTAV**, por las facilidades otorgadas para la realización de mis estudios de Doctorado.

Al **CONACYT** por el apoyo económico recibido durante cuatro años.

Al **Dr. Graciano Calva Calva**, quien ha sido un excelente maestro y guía durante esta etapa de estudios, pero sobre todo por ser un gran ser humano y permitirme empatar perfectamente la vida personal con la académica, donde corroboré que ser mamá y dedicarse a la ciencia pueden llevarse de la mano.

A mis asesores: **Dra. Refugio Rodríguez Vázquez, Dra. María del Carmen Montes Horcasitas, Dr. Fernando Esparza García, Dr. Armando Ariza Castolo, Dr. Ronald Ferrera-Cerrato**, que con su buena disposición fueron acompañando el desarrollo de este trabajo y cuyos consejos lo nutrieron valiosamente.

A la **Dra. Josefina Pérez Vargas**, por las facilidades otorgadas durante la estancia en el TESE, su tiempo y apoyo.

Al **QBP Octavio Gómez Guzmán**, por su incondicional apoyo y consejos durante el desarrollo de este trabajo, pero sobre todo por siempre procurar un ambiente de cordialidad y amistad en el laboratorio, por la buena música pero sobre todo por su admirable espíritu de desprendimiento.

**A la M. en C. Elvira Rios** y a los **IQ Cirino Rojas y Gustavo**, por todo su apoyo en el análisis de ácidos grasos en Central Analítica, pero sobre todo por sus buenos consejos e interés por hacer las cosas lo mejor posible.

Al **Q Fernando Maldonado**, a la **IBQ Ma. Dolores Díaz** y a la **Dra. Martha Barajas** por su apoyo técnico y consejos en cuanto a materiales y equipo durante el desarrollo experimental de este trabajo.

Al **M. en C. Emmanuel Barrios e IBT Lorena Ramírez Reyes** del LaNSE-CINVESTAV, su buena disposición y oportunos consejos fueron fundamentales para el análisis de muestras por espectrometría de masas.

A nuestro técnico **Charlie**, por todo su esmero en mantener el laboratorio limpio y agradable, y por procurarnos siempre con esa galletita o ese cafecito.

A **Raquel** y **Sarahí**, que llegaron justo en el momento que más las necesité y que gracias a sus laboriosas manos, dedicación y entusiasmo se lograron obtener gran parte de los resultados de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio **Bere, Edgar, Juan Manuel, Tania y Cynthia**, gracias por hacer de estos años uno de los momentos más gratos de mi vida, por sus consejos tanto académicos y personales, por las palabras de aliento, pero sobre todo por su amistad.

## ABSTRACT

The use of metabolic mediators in bioremediation systems can improve the removal of polyaromatic hydrocarbons up to 90%. *Cyperus laxus* has considered as potential phytoremediation species because of its phenolic compounds, oxidative enzymes, conjugated molecules hydrocarbon-phenol and cellular lipid composition. In order to provide an overview of morphological and metabolism changes in plant tissue during phytoremediation of polyaromatic hydrocarbon (PAH), cultivated plants in greenhouse phytoremediation systems of soils from aged spill impacted sites containing from 16 to 340 g/Kg total hydrocarbon (THC) and *C. laxus* seeds germinated in MS medium with 0-280 mM of phenanthrene (FNN) were used. The results showed that hydrocarbons (HC) affect the lipid composition of *C. laxus* at fatty acids level improving the content of odd-chain and uncommon unsaturated fatty acids, suggesting that this specie adjusts the cover lipid composition on its vegetative organs, mainly in roots, in response to the HC presence and uptake during the phytoremediation process. The phenolic profile suggest that *C. laxus* produce antioxidative-molecules as quercetin (QTN) able to bond with specific PAH in plant tissue. These results suggest chemical interactions between plant metabolites and PAH probably mediated by enzymatic activity. In this way, plant phenolic compounds with high power antioxidant might act as metabolic mediators (M) in HC oxidation using either enzyme-mediator-HC (EMX) or mediator-HC (MX) system. Preliminary results suggest that QTN acts as mediator *in vitro* enzymatic PAH oxidation using peroxidase (POX) and phenanthrene (FNN) as enzyme and HPA model respectively. Interestingly, the results showed that FNN removal rate adjusted at peroxide concentration ( $H_2O_2$ ) which is necessary to POX activation, however POX was also able to promote the formation of the conjugate QTN-FNN by itself. This interaction can be involved in the global mechanism for the removal of these kind of recalcitrant compounds in phytoremediation systems, but *in vitro* systems the formation of the complex EMX seems not to be essential in removal process.

## RESUMEN

El uso de mediadores metabólicos ha demostrado tener eficiencia de hasta el 90% en los procesos de biorremediación de hidrocarburos (HC). *Cyperus laxus* es una planta potencialmente fitorremediadora debido a su capacidad de síntesis de compuestos fenólicos, enzimas oxidativas, formación de conjugados HC-fenol y modificaciones en la composición lipídica de las células vegetales. Mediante ensayos en cultivos en invernadero e *in vitro* este trabajo proporciona información sobre cambios en el metabolismo y morfología de esta planta durante un proceso de fitorremediación de hidrocarburos poliaromáticos (HPA). Para ello, semillas de *C. laxus* se germinaron tanto en macetas con suelo contaminado con cargas de 16 000 a 325 000 ppm de hidrocarburos totales de petróleo, así como en medio de cultivo sintético en presencia de 0-280 mM de fenantreno (FNN). La presencia de HC produjo cambios en la composición lipídica de *C. laxus* promoviendo el aumento del contenido de ácidos grasos insaturados y de cadena larga poco comunes, sugiriendo cambios estructurales a nivel de membrana y pared celular que pudieran favorecer la adquisición del HC por el tejido. Por otro lado, el perfil de fenoles en los órganos de esta planta reveló la formación de conjugados HPA-fenoles vegetales, principalmente con la quercetina (QTN), identificada como el flavonoide mayoritario en el tejido vegetal, lo que confirmó que existe interacción química y/o enzimática entre HPA y metabolitos vegetales. De esta manera, compuestos vegetales con alto poder antioxidante pudieran fungir como mediadores metabólicos (M) en los procesos de oxidación de HC recalcitrantes mediante la formación del complejo enzima-mediador-HC (EMX) o mediador-HC (MX). Los resultados preliminares en reacciones *in vitro* sugirieron que la participación de la enzima peroxidasa (POX) en el complejo EMX no es indispensable para el proceso de remoción y que la velocidad de transformación del FNN está regulada por la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fundamental para la activación de la peroxidasa.

# ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS.....	XIV
<b>1 INTRODUCCION .....</b>	<b>1</b>
<b>2 ANTECEDENTES.....</b>	<b>4</b>
2.1 SISTEMA ENZIMA-MEDIADOR-SUSTRATO EN PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN.....	4
2.2 CATABOLISMO DE PAH POR SISTEMAS VEGETALES Y PROTEÍNAS DE PARED CELULAR VEGETAL EN EL CATABOLISMO DE HPA.....	9
2.3 FENILPROPANOIDES, SÍNTESIS Y POTENCIAL COMO MEDIADORES NATURALES EN EL CATABOLISMO DE HPA .....	12
2.4 COMPUESTOS FENÓLICOS EN LIGNINA Y SUBERINA DE LAS CYPERACEAS .....	15
2.5 EFECTO DE LA CONTAMINACIÓN POR HIDROCARBUROS SOBRE EL METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS EN PLANTAS .....	15
2.6 FITORREMEDIACIÓN CON CYPERUS LAXUS .....	16
2.7 BIORREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS POLIAROMÁTICOS EN SUELOS.....	16
2.7.1 Principales rutas de biodegradación de fenantreno .....	17
<b>3 ANTECEDENTES DIRECTOS .....</b>	<b>19</b>
3.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS SITIOS DE ESTUDIO.....	19
3.2 VEGETACIÓN EN LOS SITIOS AFECTADOS POR LAS ACTIVIDADES PETROLERAS .....	20
3.2.1 <i>Cyperus</i> spp.....	23
3.2.2 <i>Metabolitos secundarios de Cyperaceas y distribución de fenilpropanoides y actividad enzimática oxidativa en C. laxus crecido en suelos con diferente carga de hidrocarburos.....</i>	24
3.2.3 <i>La especie Cyperus laxus.....</i>	27
<b>4 JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>29</b>
<b>5 HIPÓTESIS .....</b>	<b>30</b>
<b>6 OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
<b>7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>32</b>

<b>8</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
8.1	SUSTANCIAS .....	33
8.2	MATERIAL VEGETAL Y SUELOS .....	33
8.3	GENERACIÓN PLANTAS EN CULTIVOS IN VITRO .....	33
8.4	EXTRACCIÓN PRIMARIA DE METABOLITOS .....	34
8.5	EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS DE MATERIA VEGETAL CRECIDA EN INVERNADERO .....	34
8.5.1	<i>Extracción del material lipídico.....</i>	<i>34</i>
8.5.2	<i>Extracción de ácidos grasos.....</i>	<i>35</i>
8.6	EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS .....	35
8.7	EXTRACCIÓN DE HIDROCARBUROS POLIAROMÁTICOS .....	36
8.8	EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA A PARTIR DE TEJIDO VEGETAL .....	36
8.9	OXIDACIÓN IN VITRO DE FENANTRENO POR PEROXIDASA DE RÁBANO PARA ESTUDIAR LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO EMX.....	37
8.9.1	<i>Extracción, identificación y cuantificación parcial de los productos de oxidación enzimática de FNN.....</i>	<i>37</i>
8.10	ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	37
<b>9</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
9.1	ESTUDIOS CON CULTIVO EN INVERNADERO .....	38
9.1.1	<i>Efecto de los hidrocarburos sobre la morfología y propagación de las plantas de Cyperus laxus en los sistemas de fitorremediación.....</i>	<i>38</i>
9.1.2	<i>Efecto de los hidrocarburos sobre el perfil de compuestos fenólicos .....</i>	<i>40</i>
9.1.3	<i>Perfil y contenido de ácidos grasos en plantas de Cyperus laxus usadas para fitorremediación en invernadero .....</i>	<i>50</i>
9.2	INVESTIGACIONES CON CULTIVOS IN VITRO DE CYPERUS LAXUS .....	58
9.2.1	<i>Establecimiento y propagación de plantas de Cyperus laxus in vitro .....</i>	<i>58</i>

9.2.2	<i>Efecto del FNN sobre el Perfil de compuestos fenólicos en plantas de Cyperus laxus: Formación de conjugados flavonoides-FNN</i> .....	61
9.2.3	<i>Efecto del FNN sobre el desarrollo de plantas de C. laxus crecidas in vitro. Transporte y catabolismo de FNN</i> .....	70
9.2.4	<i>Efecto del fenantreno sobre el perfil y contenido de ácidos grasos en órganos de C. laxus cultivados in vitro</i> .....	75
9.2.5	<i>Efecto del fenantreno sobre la morfología de plantas de C. laxus cultivadas in vitro</i> .....	82
9.2.6	<i>Efecto del fenantreno sobre el contenido de otros lípidos en plantas de C. laxus cultivadas in vitro</i> .....	84
9.2.7	<i>Estudio del sistema enzima-mediador-HPA (EMX)</i> .....	86
9.3	EFFECTO DE LA PRESENCIA DE HIDROCARBUROS SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA OXIDATIVA DE PLANTAS DE C. LAXUS DE LOS SISTEMAS DE FITORREMEDIACIÓN CONTRA LAS CULTIVADAS IN VITRO CON FENANTRENO .....	88
9.3.1	<i>Oxidación de QTN por acción de la peroxidasa como preludeo para la investigación Enzima-Mediador-Hidrocarburo</i> .....	90
9.4	REACCIONES IN VITRO ENZIMA-MEDIADOR-HIDROCARBURO PARA LA OXIDACIÓN DE FENANTRENO.....	93
9.4.1	<i>Efecto de la concentración de peróxido sobre las reacciones in vitro Enzima-Mediador-Hidrocarburo para la oxidación de fenantreno</i> .....	95
<b>10</b>	<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	<b>100</b>
10.1	PROPUESTA DE FITORREMEDIACIÓN DE FNN POR C. LAXUS .....	108
<b>11</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>112</b>
<b>12</b>	<b>RECOMENDACIONES PARA INVESTIGACIONES FUTURAS</b> .....	<b>115</b>
<b>13</b>	<b>PRESENTACIONES EN CONGRESOS</b> .....	<b>116</b>
<b>14</b>	<b>DIFUSIÓN</b> .....	<b>118</b>
<b>15</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>119</b>

<b>ANEXO 1. PERFIL DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE C. LAXUS CULTIVADOS EN SUELOS CONTAMINADOS CON CARGAS DE 16 000 A 325000 PPM DE HTP .....</b>	<b>127</b>
<b>ANEXO 2. ARCHIVO FOTOGRÁFICO DEL SISTEMA DE FITORREMEDIACIÓN DE HTP POR C. LAXUS. CULTIVO EN INVERNADERO.....</b>	<b>128</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de algunos de mediadores comúnmente utilizados durante procesos de oxidación.....	5
Figura 2. Mecanismo de oxidación de un sistema Lacasa – Mediador – Sustrato .....	5
Figura 3. Mecanismos de oxidación.....	7
Figura 4. Radicales libres formados durante la oxidación de fenilpropanoides.....	8
Figura 5. Productos derivados de la oxidación de pentaclorofenol por la actividad de peroxidasas.....	9
Figura 6. Reacciones enzimáticas responsables de la destoxificación de xenobióticos en plantas .....	10
Figura 7. Relaciones biosintéticas de fenilpropanoides.....	13
Figura 8. Estructura y grupos funcionales del grupo de flavonoles.....	14
Figura 9. Ruta de degradación de fenantreno por la bacteria <i>Pseudomonas sp</i> , cianobacteria y el hongo ligninolítico <i>Phanerochaete chrysosporium</i> .....	18
Figura 10. Localización del área de estudio, en el estado de Tabasco México .....	20
Figura 11. Vegetación acuática y subacuática aledaña a la zona de estudio .....	21
Figura 12. <i>Cyperus esculentus</i> , <i>Cyperus laxus</i> y <i>Ludwigia Peploides</i> crecidos en condiciones de invernadero .....	24
Figura 13. Metabolitos de extractos metanólicos de <i>Cyperu srotundus</i> . .....	25
Figura 14. Perfil de hidrocarburos poliaromáticos y compuestos fenólicos en <i>C. laxus</i> ....	26
Figura 15. <i>Cyperus laxus</i> crecidos en suelo contaminado con hidrocarburo y suelo libre de hidrocarburo .....	27
Figura 16. <i>Cyperus laxus</i> población I, <i>Cyperus laxus</i> población II . Órganos principales de <i>Cyperus laxus</i> .....	28
Figura 17. Principales características morfológicas de <i>Cyperus laxus</i> . .....	39
Figura 18. Principales órganos de reserva subterráneos de plantas. ....	40
Figura 19. <i>Cyperus laxus</i> crecido en macetas con suelos con hidrocarburos totales del petróleo .....	40

Figura 20. Perfil de compuestos fenólicos en raíz, cormo y hoja de <i>C. laxus</i> pl crecidos en el sistema de fitorremediación en invernadero en las UE1. ....	41
Figura 21. Perfil de compuestos fenólicos y flavonoides en los extractos de raíz, Cormo y hoja de plantas de <i>C. laxus</i> crecidos en UE2. ....	45
Figura 22. Cromatogramas de los compuestos fenólicos y flavonoides obtenidos en los sistemas de fitorremediación en el 2008 y en el 2014 .....	48
Figura 23. Muestra del extracto metanólico de bulbo crecido en el suelo S205. ....	49
Figura 24. Perfil de ácidos grasos de los extractos lipídicos de hoja, parte aérea o follaje (Leaf) de plantas de <i>C.laxus</i> , cultivadas en suelo de sitios no contaminados del estado de Tabasco, presuntamente libre de hidrocarburos (SL), en comparación con el follaje de plantas usadas en sistemas de fitorremediación de suelo contaminados proveniente del sitio del pozo 205 (S205) con carga de hasta 340 g de HTP/Kg suelo.....	52
Figura 25. Contenido de ácidos grasos C12-C24:0 en raíz, cormo y hoja de <i>C. laxus</i> crecidos en sistemas de fitorremediación con suelos contaminados .....	54
Figura 26. .Micrografía 40x de semillas de <i>C.laxus</i> desinfestadas y puestas en placa con medio sintético MS.....	59
Figura 27. Germinación y crecimiento de plántulas de <i>Cyperus laxus</i> pl en medio MS. En placa y en frasco .....	59
Figura 28. Eficiencia de germinación de semillas de <i>C. laxus</i> .....	60
Figura 29. Plantas de <i>C. laxus</i> crecidas <i>in vitro</i> en medio MS.....	60
Figura 30. Perfil de compuestos fenólicos de <i>C. laxus</i> crecidas <i>in vitro</i> en medio MS adicionado con 0-50 g FNN/L. ....	62
Figura 31.Cromatogramas de masas de extractos metanólicos de raíz-cormo y hoja de plantas de <i>C. laxus</i> de 21 días de edad crecidas <i>in vitro</i> en medio MS. ....	65
Figura 32. Cromatogramas de masas de extractos metanólicos de raíz-cormo de plantas de <i>C. laxus</i> de 21 días de edad crecidas <i>in vitro</i> en medio MS suplementado con 0.1 mM de antraceno /con 0.1 mM de fenantreno .....	66
Figura 33. Fragmentación del pico 341 m/z observado en el cromatograma de masas de extractos metanólicos de raíz de plantas de <i>C. laxus</i> de 21 días de edad crecidas <i>in vitro</i>	

en medio MS suplementado con 0.1 mM de fenantreno o con 0.1 mM de antraceno . .....	67
Figura 34. Cromatogramas a 230nm del extracto clorofórmico de la hoja de <i>C. laxus</i> crecida <i>in vitro</i> en medio sintético MS + 0.5mM de FNN .....	68
Figura 35. Presunto metabolito de oxidación de fenantreno: Espectro de adsorción.....	69
Figura 36. Sistema <i>in vitro</i> de <i>Cyperus laxus pl</i> cultivado en medio MS con fenantreno....	71
Figura 37. Cambios fisiológicos de <i>Arabidopsis thaliana</i> germinada en medio MS y crecida en 0.5mM y 0.25 mM de FNN. ....	71
Figura 38. Moléculas derivadas de la transformación de fenantreno identificadas en el extracto lipídico de tejido de <i>C. laxus pl</i> después de 21 días de tratamiento con 168 mM de FNN.....	74
Figura 39. Contenido de ácidos grasos C12-C24:0 en raíz, cormo y hoja de <i>C. laxus</i> crecidos en sistemas de fitorremediación <i>in vitro</i> en medio sintético .....	76
Figura 40. Evidencia de los cambios fisiológicos de <i>C. laxus</i> germinada y crecida <i>in vitro</i> en presencia de FNN.....	83
Figura 41. Evidencia de la presencia de pelos radicales en el tejido de raíz de <i>C. laxus</i> en las plantas control y su ausencia de los sistemas con tratamiento con FNN.....	83
Figura 42. Cambios en el contenido de fitoesteroles en los tejidos de <i>C. laxus</i> bajo la presencia de FNN.....	85
Figura 43. SDS PAGE 15%; 60 min; 200 V; 8µg/pozo de muestra; 0.58µg/pozo de POX, LAC comercial, BSA .....	89
Figura 44. Ensayos cualitativos de la actividad enzimática utilizando ABTS como sustrato. .....	90
Figura 45. Algunos productos de la oxidación de QTN por POX.....	91
Figura 46. Gráficas isocromáticas de los cromatogramas y análisis espectral UV de los productos de oxidación de QTN por peroxidasa de rábano .....	92
Figura 47. Fenantreno residual en la mezcla de reacción utilizando QTN como mediador natural y 10 µM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en presencia y en ausencia de POX .....	94

Figura 48. Metabolitos derivados de la oxidación de FNN bajo la interacción EMXH y MXH a 30 minutos de reacción. ....	99
Figura 49. Propuesta sobre las estrategias que pudiera estar llevando a cabo <i>C. laxus</i> durante el proceso de remoción de hidrocarburos. ....	111

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del fenantreno .....	17
Tabla 2. Características fisicoquímicas de los suelos en estudio .....	21
Tabla 3. Cambio dinámico de las poblaciones vegetales en los sitios de estudio .....	22
Tabla 4. Clasificación botánica de <i>Cyperus</i> .....	24
Tabla 5. Compuestos fenólicos detectados en raíz, (R), Cormo (B) y hoja (L) de plantas de <i>C. laxus</i> crecidos en UE1 .....	42
Tabla 6. Compuestos fenólicos detectados en raíz, (R),Cormo (B) y hoja (L) de plantas de <i>C. laxus</i> crecidos en UE2 .....	46
Tabla 7. Relación entre ácidos grasos saturados/insaturados y contenido total de ácidos grasos C12-C24 en los órganos de <i>Cyperus laxus</i> cultivados en sistemas de fitorremediación .....	53
Tabla 8. Concentración de FNN ( $\mu\text{g}$ FNN/g FW) en los órganos de plantas de <i>C. laxus</i> de un año, así como el % de remoción del FNN del medio, después de 21 de días de la adición de diferentes concentraciones de FNN (g/L) a un medio sintético (MS) en cultivos <i>in vitro</i> . .....	72
Tabla 9. Comparación del % de ácidos grasos en los tejido de los órganos de reserva de <i>C. laxus</i> y <i>C. esculentus</i> , cormo y rizoma respectivamente. ....	78
Tabla 10. Contenido de ácidos graso y relación saturados/insaturados en órganos de <i>Cyperus laxus</i> crecidos en fenantreno .....	81
Tabla 11. Cantidad de proteína ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ PF) de raíz-cormo de <i>C. laxus</i> germinados en diversas concentraciones de FNN (mM) .....	87
Tabla 12. Cantidad de proteína ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ PF) de hoja de <i>C. laxus</i> germinados en diversas concentraciones de FNN (mM) .....	87
Tabla 13. Concentración de QTN durante la cinética de transformación de FNN bajo un sistema EMX utilizando HRP .....	95
Tabla 14. Velocidad de desaparición del FNN en función de la concentración de $\text{H}_2\text{O}_2$ (0-720min de reacción) .....	96
Tabla 15. Constantes cinéticas para los tratamientos EMXH y EMXH .....	96

## ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenztiazolin-6-sulfónico)
ACNFTY	Acenaftileno
AG	Ácido graso
ANT	Antraceno
BaA	Benzo(a)antraceno
CAF	Ácido caféico
CG	Cromatografía de Gases
CIN	Ácido cinámico
ConOH	Alcohol coniferílico
COU	Ácido coumárico
CRY	Crisina
DMBA	Ácido dimetoxibenzóico
EMX	Complejo Enzima-Mediador-Xenobiótico
EPC	Epicatequina
FAME	Fatty Acid Methyl Ester (ácidos grasos metilesterificados)
FER	Ácido ferúlico
FL	Fluoreno
FLT	Fluoranteno
FNN	Fenantreno
FNN	Fenantreno
HPA	Hidrocarburos poliaromáticos
HPLC/UV	High Performance Liquid Chromatography/Ultra Violet
HRP	Peroxidasa de rábano
HTP	Hidrocarburos Totales del petróleo
i123P	Indeno-1,2,3-perileno
LAC	Lacas
LUT	luteína
MS	Espectrometría de masas
MS	Medio Murashige –Skoog
NAF	Naftaleno
PF	Peso fresco
pHBA	Ácido p-hidroxibenzóico
pHCN	Ácidos p-hidroxicinámicos
POX	Peroxidasa
PS	Peso seco
PTC	Ácido protocatecólico
QTN	Quercetina
QTRN	Quercetrina
RUT	Rutina
S163	Suelo con carga de 16 000 ppm de HTP

S205	Suelo con carga de 325 000 ppm de HTP
SL	Suelo no contaminado
SSR	Suelo con carga de 141 000 ppm de HTP
UE1	Unidad experimental 1. Sistema de fitorremediación en invernadero (2001-2010)
UE2	Unidad experimental 2. Sistema de fitorremediación en invernadero (2010-2011)
V	Ácido vainillínico
VITX	Vitexina
VN	Vainillín amina

# 1 INTRODUCCION

Las actividades antropogénicas y los cambios hidrológicos naturales han ocasionado la contaminación por petróleo crudo de grandes extensiones de tierra en el estado de Tabasco, México (Palma-Cruz *et al.*, 2004). Estudios previos revelaron que en los suelos de esos sitios prevalece la presencia de hidrocarburos poliaromáticos (HPA), compuestos recalcitrantes, tóxicos y carcinogénicos debido a su bajo nivel de biodisponibilidad y biodegradabilidad (Palma-Cruz *et al.*, 2004; Semple *et al.*, 2004). Aunque para la recuperación de sitios similares contaminados con hidrocarburos se han reportado diversas tecnologías, una de las estrategias más recientes es la oxidación de los hidrocarburos mediante la participación de diversos compuestos orgánicos denominados mediadores (M). Estos suelen ser moléculas pequeñas capaces de acarrear electrones que después de haber sido oxidadas por agentes oxidantes naturales o por enzimas (E) son liberadas al medio ambiente para oxidar al xenobiótico (X) (Baiocco *et al.*, 2003). De esta manera, el mecanismo de formación del complejo enzima-mediador-xenobiótico (EMX) o mediador-xenobiótico (MX) estará supeditado a los potenciales de óxido reducción de cada una de las fases de la reacción. Por lo anterior, en el grupo de investigación se propuso el uso de mediadores metabólicos detectados en plantas como una alternativa eficiente, barata y compatible con el medio ambiente durante la oxidación de HPA. Ejemplo de estos mediadores pudieran considerarse las moléculas semi-oxidadas de fenilpropanoides o flavonoides que por sus características químicas pueden formar radicales libres inestables, los cuales se ha reportado que tienden a oxidar a otras moléculas para neutralizar sus cargas electrónicas radicales (Rivera-Casado *et al.*, 2014; Torres-Duarte *et al.*, 2009; Veitch, 2004).

De ello, el estudio sobre el perfil de compuestos fenólicos de una planta pionera crecida en sitios contaminados con hasta 325 000 ppm de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) en Tabasco (*Cyperus laxus*), evidenció que durante el proceso de fitorremediación a nivel invernadero, la composición y cantidad de compuestos fenólicos se modificó produciendo un incremento en la cantidad de flavonoides,

principalmente quercetina (QTN). También se observó la presencia de moléculas conjugadas HPA-fenoles en los tejidos de los órganos principales de esta planta, sugiriendo interacciones químicas y/o enzimáticas entre el xenobiótico y los metabolitos vegetales. Adicionalmente, se demostró que la presencia de hidrocarburo en el suelo afecta drásticamente la composición lipídica de los órganos de *C. laxus*, promoviendo la síntesis de moléculas de ácidos grasos mayores a C20 e insaturadas, sugiriendo que la remoción de HPA en un sistema de fitorremediación también depende de los cambios en la composición de lípidos en la célula. Finalmente, también se reportó un incremento en las actividades enzimáticas oxidativas de peroxidasa, fenoloxidasa y catecol oxidasa en el tejido de *C. laxus*, principalmente en raíz y cormo. Estos resultados fueron complementados con estudios de fitorremediación *in vitro* utilizando fenantreno (FNN) como HPA modelo, donde se observó que este hidrocarburo se transporta sistémicamente en la planta sufriendo modificaciones en los diferentes órganos, siendo en la raíz donde se observó su mayor acumulación y presencia de productos de transformación que únicamente habían sido reportados para hongos. De igual forma, los estudios *in vitro* permitieron establecer que el metabolismo vegetal es capaz de transformar HPA independientemente de la presencia de otros sistemas vivos en su rizósfera como hongos o bacterias, además de demostrar que su umbral de toxicidad es alto por lo que es capaz de soportar hasta 100 veces la concentración de FNN reportada para *Arabidopsis* y otras plantas fitorremediadoras.

Lo anterior fue la base para sugerir que el complejo EMX pudiera estar involucrado en los procesos de fitorremoción de hidrocarburos y que éste pudiera verse favorecido por los cambios en la composición lipídica de las células vegetales. Aunque el mecanismo de remoción de HPA depende de la capacidad metabólica de cada especie vegetal, no se tiene suficiente información acerca de la interacción entre los compuestos estructurales de la planta y los compuestos xenobióticos durante el proceso de fitorremoción. Por lo que el objetivo de este trabajo, fue evidenciar la presencia de moléculas antioxidantes del tipo flavonoide que pudieran estar participando en la formación de complejos EMX para promover la remoción de hidrocarburo a partir del suelo contaminado. Para ello se analizó el perfil de

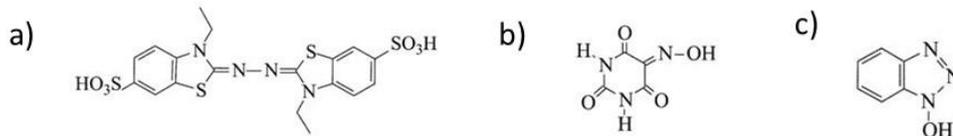
compuestos fenólicos de los órganos de *C. laxus* y se evaluó el cambios en la composición lipídica de los órganos de la planta. Al final se planteó la estrategia metabólica de *Cyperus laxus* para efectuar la fitorremediación de HPA.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Sistema Enzima-Mediador-Sustrato en procesos de biorremediación

Durante el estudio de los mecanismos de oxidación de compuestos xenobióticos como hidrocarburos poliaromáticos (HPA), pesticidas y colorantes industriales, se ha observado que estos procesos se ven favorecidos por la presencia de diversos compuestos fenólicos de origen natural o sintético, denominados mediadores, los cuales inicialmente fueron definidos como moléculas pequeñas capaces de acarrear electrones, que después de haber sido oxidadas por una enzima, se liberan del sitio activo para oxidar, mediante reacciones no enzimáticas, a sustratos orgánicos que por su tamaño y estructura no puede localizarse en el sitio catalítico de la enzima (Baiocco *et al.*, 2003). Sin embargo, debido al auge y la importancia de estos mediadores en diversos procesos de oxidación y para la obtención de productos de alto valor comercial, se pueden definir como moléculas capaces de acarrear electrones que después de haber sido oxidadas enzimáticamente o no, tienen la capacidad de formar radicales libres, cuya inestabilidad química promueve la oxidación de las moléculas blanco o de ellas mismas.

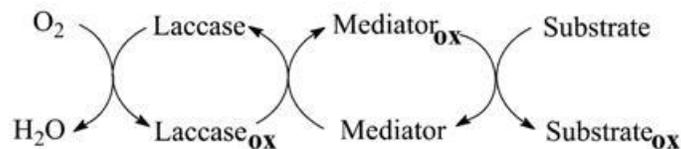
De entre los compuestos que se han descrito como posibles mediadores (Figura 1), los utilizados con mayor frecuencia en la oxidación de xenobióticos son los mediadores sintéticos: (ABTS) y 1-hidroxibenzotriazol (HBT). Los cuales pueden ser oxidados por enzimas tales como lacasas formando radicales como el  $\text{HBT}^-$ , iones como el catión  $\text{ABTS}^+$  y el dicatión  $\text{ABTS}^{++}$  de acuerdo al mecanismo propuesto en la Figura 2. En un estudio se reporta que la oxidación de un hidrocarburo poliaromático (HPA) de elevado peso molecular, se lleva a cabo por el sistema lacasa-mediador vía  $\text{ABTS}^{++}$  y  $\text{HBT}^-$  mediante una oxidación sin contacto directo del sustrato y la enzima; sin embargo, el uso de mediadores sintéticos tienen como desventaja el costo y su toxicidad (Johannes & Majcherczyk, 2000; Torres-Duarte *et al.*, 2009).



**Figura 1.** Estructura de algunos de mediadores comúnmente utilizados durante procesos de oxidación. a) ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolín)6-sulfónico). b) VLA (ácido violúrico). c) HBT (1-hidroxibenzotriazol). (Baiocco *et al.*, 2003).

Para que un mediador redox sea eficaz durante la oxidación de xenobióticos debe tener tres propiedades (Longoria *et al.*, 2008):

- i) Ser capaz de oxidarse por liberación de un electrón directamente a la enzima y generar un radical libre
- ii) El radical generado debe ser lo suficientemente estable para difundir y reaccionar con el compuesto blanco
- iii) Éste último debe tener un potencial redox apropiado que favorezca la reacción espontánea



**Figura 2.** Mecanismo de oxidación de un sistema Lacasa – Mediador – Sustrato (Baiocco & Barreca *et al.*, 2003)

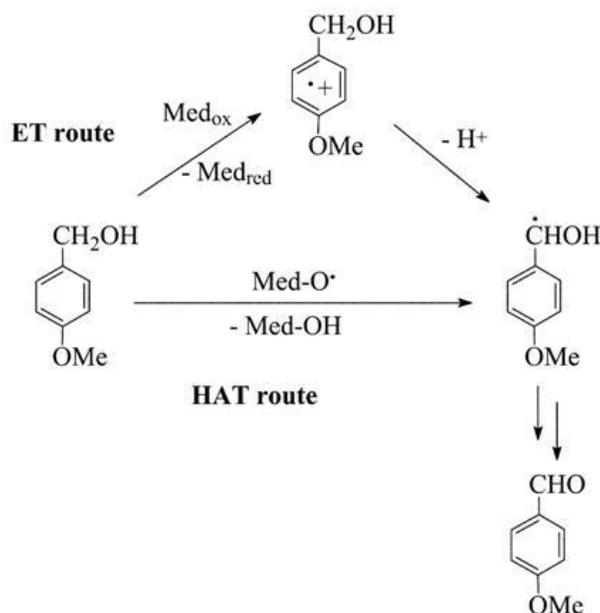
Por lo anterior, se propone que los mediadores naturales pueden ser una alternativa más eficiente, barata y compatible con el medio ambiente durante los procesos de transformación oxidativa de xenobióticos. Este tipo de mediadores se han obtenido de extractos vegetales y de hongos, tal como sugieren Torres-Duarte *et al.*, (2009), quienes reportan el uso de siringaldehído y acetosiringona como mediadores naturales altamente efectivos en los procesos de remoción de colorantes. Sus eficiencias son atribuidas al carácter fenólico, por estar *o*-dimetoxi-sustituidos y por

sus bajos potenciales de oxidación, lo que los hace excelentes sustratos para la lacasa (Torres-Duarte *et al.*, 2009).

De igual forma se ha probado la capacidad de algunos otros fenoles derivados de la lignina, tales como la vainillina y ácidos *p*-hidroxicinámicos (pHCN) en la remoción de colorantes industriales, oxidación de HPA y remoción de lignina y lípidos recalcitrantes de la pulpa del papel. Los ácidos *p*-hidroxicinámicos se encuentran ampliamente distribuidos en pastos como productos de la extracción de lignina o formando puentes entre la lignina y los carbohidratos, siendo los más abundantes en suelo: el ácido cinámico (Cin), coumárico (Cou), caféico (Caf) y el ácido ferúlico (Fer). Cuando se utilizan sistemas oxidativos lacasa-pHCN, se generan una variedad de productos de oxidación dependiendo de los sustituyentes aromáticos y las condiciones de reacción. Por ejemplo, durante la oxidación del sistema benzo[a]pireno (BaP)-lacasa se observó que solo el 10% del BaP fue oxidado, mientras que en presencia del Fer y ácido protocatecoico (APC) se promovió la remoción del xenobiótico en un 50 y 90% respectivamente; en comparación con el 80% obtenido con ABTS. Esta diferencia se atribuye a que el potencial redox de APC es de 0.8V mientras que para el Fer es de 0.6V (Camareno *et al.*, 2008).

Estos estudios demuestran que es posible utilizar diversas estructuras fenólicas derivadas del metabolismo vegetal para llevar a cabo la remoción de HPA y que resultan ser más eficientes que los mediadores sintéticos utilizados comúnmente en la oxidación de xenobióticos.

Dadas estas observaciones, se han reportado dos mecanismos generales de oxidación (Figura 3): el de *transferencia de electrón* (TE), donde el mediador sustrae un electrón del sustrato debido a la diferencia de potencial redox; y el de formación de un *radical libre del sustrato por sustracción de un hidrógeno H* (HAT), donde la enzima oxida al mediador a un radical libre que extrae un átomo de hidrógeno a partir del sustrato. La energía requerida para liberar un electrón de la molécula está relacionado con la ionización en la ruta TE, mientras la energía de disociación del enlace O-H determina el mecanismo de extracción de hidrógeno en la ruta HAT (Baiocco *et al.*, 2003; Torres-Duarte *et al.*, 2009).



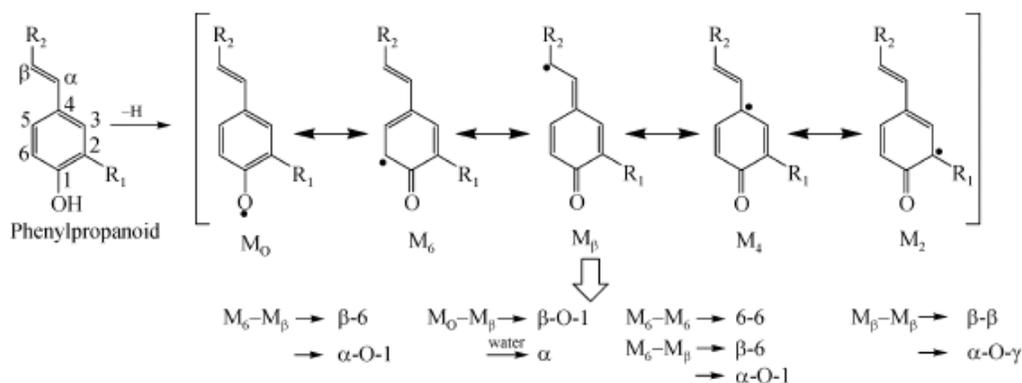
**Figura 3.** Mecanismos de oxidación (Baiocco & Barreca *et al.*, 2003)

De ello, se ha propuesto que la oxidación de pesticidas mediados por siringaldehído se lleva a cabo bajo la ruta TE. Este mediador natural, también se ha utilizado como modelo para compuestos húmicos sugiriendo la posible unión entre las sustancias húmicas del suelo y el pesticida, por lo que se propone que cuando los xenobióticos se unen a las sustancias húmicas, éstos pueden ser mineralizados más fácilmente por bacterias del suelo (Torres-Duarte *et al.*, 2009).

De la misma manera, del análisis de los diferentes productos de reacción derivados de los sistemas lacasa-CIN, lacasa-HBT y lacasa-ABTS durante la oxidación de HPA, se sugiere que los radicales fenoxi del ácido *p*-hidroxicinámico llevan a cabo un mecanismo de oxidación por la transferencia de un átomo de hidrógeno, similar que el descrito por los radicales nitroxil de HBT y diferente del mecanismo de transferencia de electrón llevado a cabo por los radicales ABTS<sup>•+</sup>. Los diferentes mecanismos de oxidación dirigidos por diversos mediadores sintéticos y naturales han sido elucidados recientemente para el caso de las enzimas ligninolíticas: lacasas y peroxidasas que están directamente involucradas en la degradación de diversos compuestos xenobióticos. Las cuales llevan a cabo la oxidación del

sustrato por un mecanismo que involucra radicales libres y muestra baja especificidad por el sustrato (Longoria *et al.*, 2008).

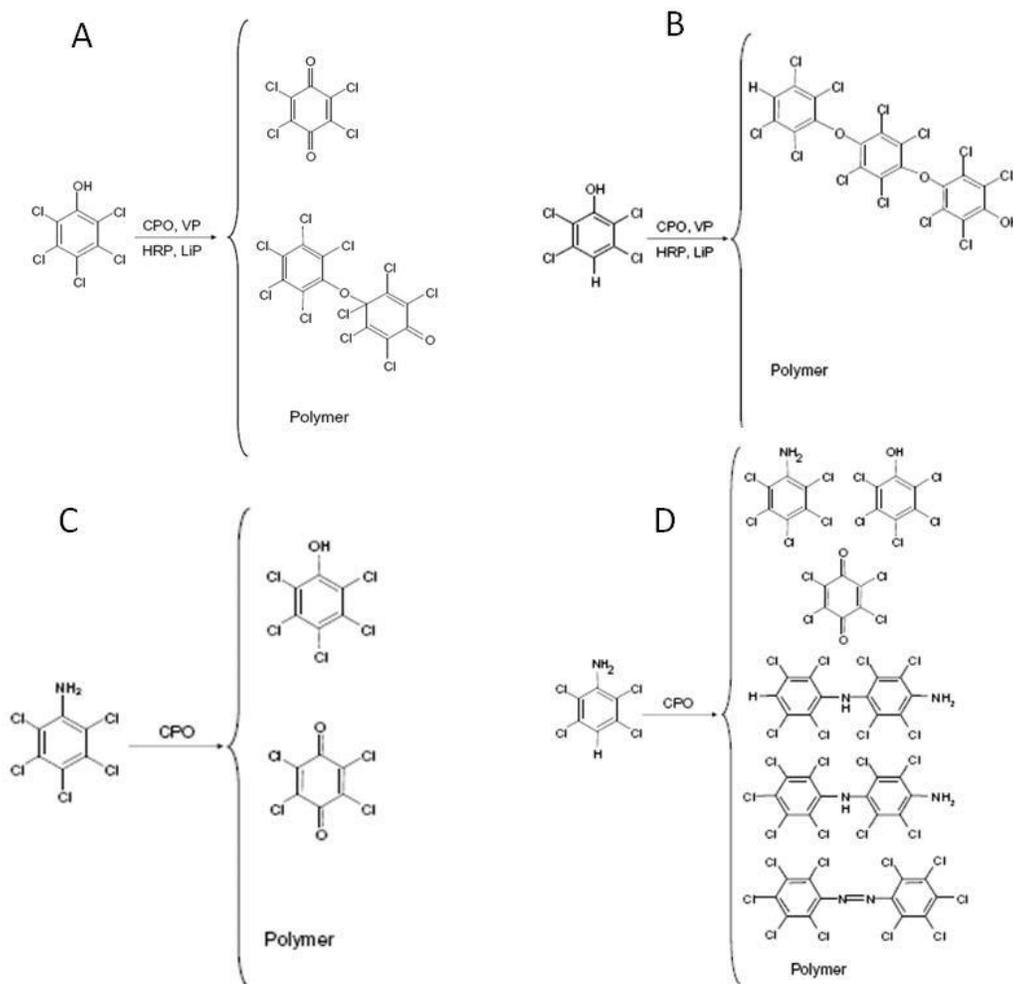
Ahora bien, un estudio de la oxidación de fenilpropanoides por lacasas demostró que se pueden formar cinco tipos de radicales:  $M_0$ ,  $M_6$ ,  $M_\beta$ ,  $M_4$  y  $M_2$  (Figura 4). Aunque teóricamente existen diez formas diferentes de unión entre estos radicales, los estudios demuestran que los principales son entre  $M_6$ - $M_\beta$ ,  $M_0$ - $M_\beta$  y  $M_\beta$ - $M_\beta$  (Wan *et al.*, 2007; YunYan *et al.*, 2007).



**Figura 4.** Radicales libres formados durante la oxidación de fenilpropanoides (Wan *et al.*, 2007).

Dado que la investigación en cuanto a estos procesos no se ha probado con enzimas vegetales, en el presente trabajo se enfocará al estudio de un mecanismo mediado por una enzima oxidativa derivada del metabolismo de plantas, así como por uno de los flavonoides con mayor presencia en los extractos de *Cyperus laxus*. Estas reacciones de oxidación podrían estar catalizadas principalmente por peroxidasas, dioxigenasas y lacasas, cuya actividad y participación se ha demostrado para la remoción de antraceno utilizando a *C. laxus* durante el proceso de fitorremediación en condiciones de invernadero (Rivera-Casado *et al.*, 2009). Dependiendo de la naturaleza química de los xenobióticos, los sistemas enzima-mediador son capaces de generar dímeros, trímeros o tetrámeros del compuesto (Figura 5), lo que podría reducir su biodisponibilidad y toxicidad favoreciendo los procesos de biorremoción (Longoria *et al.*, 2008). Esta información motivó la ejecución de estudios más detallados acerca de los metabolitos derivados de las

reacciones de oxidación y a proponer un mecanismo químico-enzimático de transformación de HPA por sistemas vegetales, tal como lo que se realizó en este trabajo, donde se propuso evaluar el potencial de metabolitos de *Cyperus* como mediadores en la remoción de PAH.

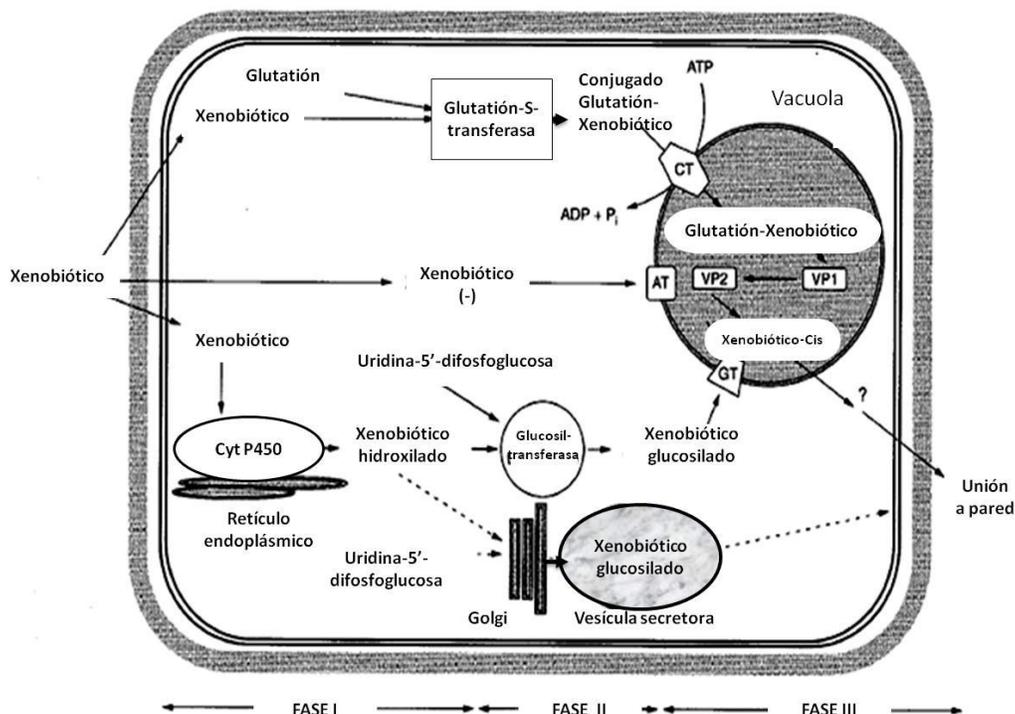


**Figura 5.** Productos derivados de la oxidación de pentaclorofenol (A), 2,3,5,6-tetraclorofenol (B) pentacloroanilina (C) y 2,3,5,6-tetrachloroanilina por la actividad de peroxidasas: CPO (cloroperoxidasa), HRP (peroxidasa de rábano), LiP (lignina peroxidasa) y VP (veratril peroxidasa)

## 2.2 Catabolismo de PAH por sistemas vegetales y proteínas de pared celular vegetal en el catabolismo de HPA

En primera instancia, la mayoría de las reacciones enfocadas a la remoción de HPA en plantas son oxidativas. En 1997, se propuso que estas reacciones se llevan a

través de dos procesos secuenciales clasificados en tres fases: transformación química (fase I y II) y compartimentalización (fase III) (Figura 6). En las transformaciones químicas se involucran una o más reacciones de catálisis enzimática, ya sea hidrólisis, oxidación y síntesis confiriendo características químicas diferentes al xenobiótico original, tales como incremento en la solubilidad en agua, formación de sitios reactivos y conjugación con metabolitos vegetales. Esto disminuye la vida media del xenobiótico y el tiempo de exposición con la especie vegetal reduciendo la probabilidad de acumulación en la planta (Coleman *et al.*, 1997).



**Figura 6.** Reacciones enzimáticas responsables de la detoxificación de xenobióticos en plantas (Coleman *et al.*, 1997).

Aunque en la transformación de HPA *in vitro* se ha reportado la participación de diversos tipos de enzimas oxidativas vegetales, tales como fenol oxidasas, peroxidasas, lacasas, dioxigenasas y monooxigenasas, aún se desconocen los mecanismos químicos-enzimáticos que se llevan a cabo durante las reacciones de oxidación, así como su interacción con los metabolitos secundarios producidos

como respuesta a la presencia de compuestos recalcitrantes (Reboreda & Cacador, 2008; Rivera-Casado *et al.*, 2009).

Estos mecanismos químico-enzimáticos, pudieran ser inicialmente llevados a cabo por proteínas asociadas a la pared celular, ya que tienen un papel crucial en la estructura, arquitectura y metabolismo de la pared celular, elongamiento celular, señalización, como respuesta al estrés biótico y abiótico, y algunos otros procesos metabólicos. Este tipo de proteínas abarcan menos del 10% del peso seco de la pared celular y el conocimiento que se tiene acerca de ellas es aún limitado (Zhu *et al.*, 2006). Por ejemplo, en un estudio realizado en las células de la raíz primaria de maíz, se pudieron identificar algunas proteínas asociadas a pared. Se establecieron tres categorías basadas en la asociación química y física con la pared celular y a los métodos de extracción disponibles: Solubles en agua, ligeramente unidas iónicamente (fracción I), estrechamente unido iónicamente (fracción II) y covalentemente unidos pared (fracción III). Se observaron diferencias notables entre la composición de proteínas en cada extracto, entre las que destacan las de la fracción I, donde se obtuvieron proteínas relacionadas con el metabolismo de la pared celular y modificaciones estructurales, tales como  $\beta$ -xilosidasa,  $\beta$ -D-glucanoexohidrolasa,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa,  $\beta$ -glucosidasas,  $\beta$ -galactosidasa,  $\alpha$ -galactosidasa, endoxiloglucano transferasas, quitinasa, endo-1,3;1,4- $\beta$ -D-glucanasa y 4 peroxidasas que no se observan en la proteínas solubles (Zhu *et al.*, 2006).

El conocimiento de la actividad y función de algunas de estas proteínas de pared, específicamente las iónicamente enlazadas tales como peroxidasas, pudiera establecer las bases del mecanismo oxidativo inicial de HPA aunado a la actividad de enzimas oxidativas extracelulares en conjunto con la participación de los fenilpropanoides que se encuentren en citosol o asociados a pared, lo que fue parte de objetivo principal de este trabajo.

### **2.3 Fenilpropanoides, síntesis y potencial como mediadores naturales en el catabolismo de HPA**

La importancia de fenilpropanoides de origen vegetal en procesos de remoción, radica en que podrían ser utilizados como mediadores naturales en los procesos de remoción de HPA y pesticidas (Camareno *et al.*, 2008; Torres-Duarte *et al.*, 2009). El precursor biosintético de los fenilpropanoides es el ácido cinámico formado a partir de la fenilalanina (Figura 7) por acción de la fenilalanina amonio liasa (PAL). Sin embargo, también en algunas especies se ha reportado la formación de *p-cumarato* a partir de tirosina por la actividad de la tirosina amonio liasa (TAL). Algunos otros fenilpropanoides simples, se producen a partir del cinámico mediante reacciones de hidroxilación, metilación y deshidratación, tales como los ácidos caféico, ferúlico, sinápico y algunas cumarinas. Sin embargo, estos ácidos normalmente no se acumulan en forma libre en altos niveles dentro de las células de las plantas, sino más bien se encuentran conjugados con moléculas de azúcar, carbohidratos de pared celular u ácidos orgánicos (Dixon & Palva, 1995).

Dentro del grupo de los fenilpropanoides, los flavonoides son los metabolitos secundarios más comunes en plantas vasculares. Se caracterizan por tener propiedades antioxidantes como las estudiadas para ascorbato,  $\alpha$ -tocoferol y carotenoides, dado que numerosos estudios *in vitro* han demostrado que los flavonoides pueden atrapar directamente especies reactivas de oxígeno: superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxil, oxígeno singlete y radical peroxilo (Dixon & Palva, 1995).

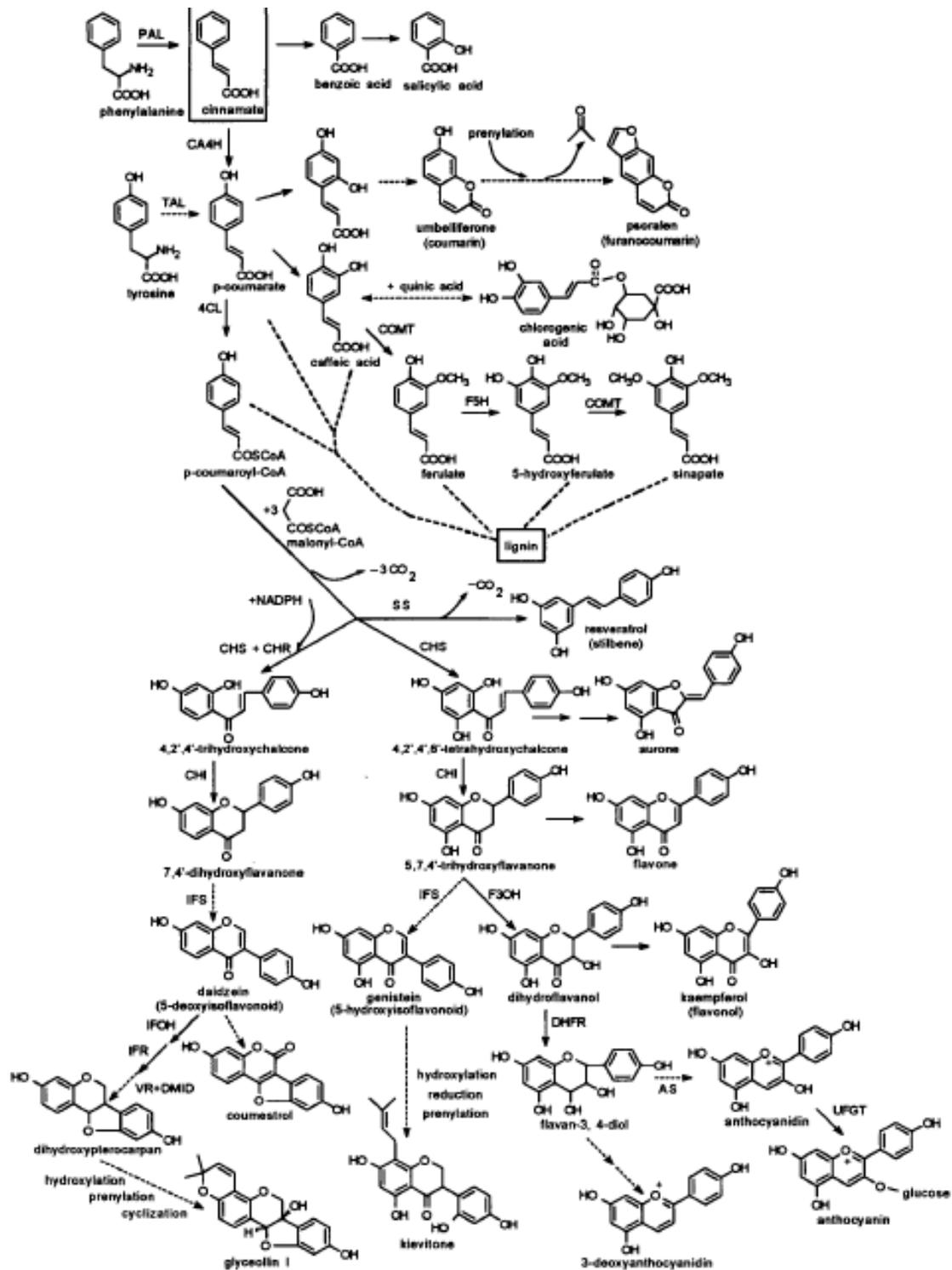
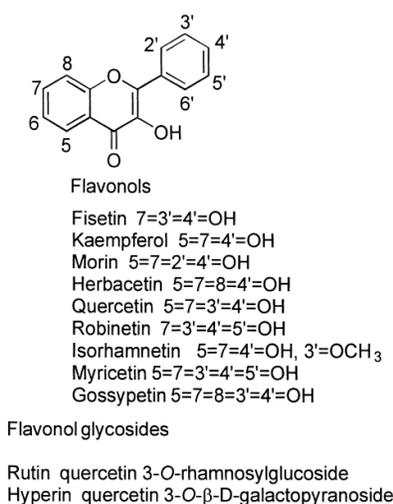


Figura 7. Relaciones biosintéticas de fenilpropanoides (Dixon & Palva, 1995).

Entre los derivados de los fenilpropanoides, el subgrupo flavonol es considerado como el grupo más importante y ampliamente sintetizados por las especies vegetales. Se ha detectado también en musgos y helechos, además de atribuírseles diversas actividades fisiológicas. Esta diversidad estructural entre los flavonoles y sus derivados (Figura 8) originada por la variedad de modificaciones región-específica, hidroxilación, glicosilación, acilación, prenilación, sulfatación y metilación (Dixon & Palva, 1995).



**Figura 8.** Estructura y grupos funcionales del grupo de flavonoles (Robards, 2003)

Diversos métodos genéticos y moleculares han proporcionado información acerca de la enzimología involucrada en la síntesis de fenilpropanoides, sitios de síntesis celular y subcelular, y el papel o importancia de los fenilpropanoides en la vida de la planta. Sin embargo, actualmente se sigue estudiando el mecanismo que controla la cantidad y variedades de flavonoides que producen las plantas en respuesta a la presencia de compuestos xenobióticos en el ambiente. Particularmente, el interés del presente estudio radica en evaluar si la presencia de ciertos compuestos fenólicos es fundamental durante la oxidación de hidrocarburos poliaromáticos independientemente de la microbiota presente en la rizósfera de la planta.

## **2.4 Compuestos fenólicos en lignina y suberina de las Cyperaceas**

Para el caso de la familia de las *Cyperaceas*, que es de interés para este trabajo, Parker *et al.*, (2000) identificó que en *Cyperus esculentus* es dominante la presencia de ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico unidos a la pared celular del tubérculo y al tejido superficial del mismo respectivamente, así como la presencia de ácidos diferúlicos del tipo 8-O-4`-, 8-5`-, y 5-5`. De igual forma, los carbohidratos de la pared celular fueron principalmente xilosa, arabinosa, glucosa, ácido urónico, galactosa y manosa en menor cantidad. La morfología de los tubérculos de *C. esculentus* y la composición de carbohidratos y fenoles de la pared celular se han asociado con la textura termoestable que presentan. En este sentido, en este trabajo se investigó la presencia de la aglicona del flavonoide en los diversos órganos de la *C. laxus* adicionalmente a la caracterización los carbohidratos de la respectiva glicona, ya que hasta el momento no hay reportes sobre la caracterización de fenoles en esta especie vegetal crecida en suelos libres de contaminante y en presencia de ellos.

## **2.5 Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre el metabolismo de ácidos grasos en plantas**

Desde el punto de vista ambiental, algunos compuestos vegetales alelopáticos son estructuralmente similares a diversos xenobióticos. Para el caso específico de hidrocarburos poliaromáticos se ha demostrado la participación de diversos ácidos grasos, principalmente linoleico, durante la remoción de benzo[a]pireno, que a su vez promueve la estimulación de diversas comunidades microbianas rizosféricas que favorecen el proceso de biodegradación (Yi & Crowley, 2007).

Para el caso de algunas *Cyperaceas*, se han realizado diversos estudios sobre la cantidad y tipo de ácido graso en bulbo, ya que se ha observado que este órgano posee diversas propiedades farmacológicas conocidas ancestralmente. Por una parte, para bulbos de *Cyperus esculentus* provenientes de Nigeria bajo condiciones libres de contaminación por HPA, se encontró que predominaban el ácido mirístico, ácido oleico y el ácido linoléico en proporciones de 28%, 45% y 8.8% respectivamente (Eteshola & Oraedu, 1996). Por otro lado, para esta misma especie

pero de origen egipcio se observó la presencia de ácido palmítico y oleico como principales representantes de los ácidos saturados e insaturados con 14.5% y 69.5% respectivamente, estas proporciones pueden ser comparadas con las presentes en el aceite de oliva que es característico por su alto valor nutrimental (Shaker *et al.*, 2009).

Por otro lado, no se encontraron reportes sobre la composición de ácidos grasos en *C. laxus* en cuanto a la variación en tipo y distribución de estos metabolitos en los diversos órganos de esta planta. Debido a ello, en el presente trabajo se analizó el perfil de ácidos grasos y otros lípidos en plantas crecidas den suelos no contaminados y en relación al proceso de fitorremediación. Se espera que los resultados generados serán de utilidad para conocer el comportamiento del metabolismo vegetal de esta planta potencialmente fitorremediadora.

## **2.6 Fitorremediación con *Cyperus laxus***

El término de fitorremediación, ha sido definido como la tecnología que utiliza las plantas y su asociación con microorganismos rizosféricos para degradar, asimilar, metabolizar o destoxificar compuestos localizados en suelos, sedimentos acuíferos y de la atmósfera. En años recientes se ha descrito el papel de diversas plantas en la remediación de suelos y aguas contaminadas que han sido utilizadas para el tratamiento de diferentes clases de contaminantes incluyendo hidrocarburos del petróleo, solventes clorados, plaguicidas, explosivos, metales pesados y radioactivos (Susarla *et al.* 2002). Siendo *Cyperus* una especie vegetal pionera del sureste mexicano con potencial para fitorremediar suelos contaminados con hasta 320 000 ppm de hidrocarburos totales del petróleo (Palma Cruz *et al.* 2004), fue la especie seleccionada para este estudio.

## **2.7 Biorremediación de hidrocarburos poliaromáticos en suelos**

Hasta el momento, las propuestas sobre las rutas de biotransformación de algunos hidrocarburos poliaromáticos han sido evaluadas tanto en sistemas bacterianos (Seo *et al.*, 2009), como en hongos (Sutherland *et al.*, 1991) y algas (Narro *et*

al.,1992); sin embargo los estudios en plantas son escasos. Por lo que el estudio sobre la captación, transporte y transformación de HPA en el tejido vegetal realizado en el presente trabajo aporta información importante sobre la posible participación de *Cyperus laxus* durante la remoción de estos compuestos en el sistema de fitorremediación natural. Para ello, en el presente trabajo, se utilizó fenantreno como hidrocarburo poliaromático modelo, dadas sus características fisicoquímicas (Tabla 1).

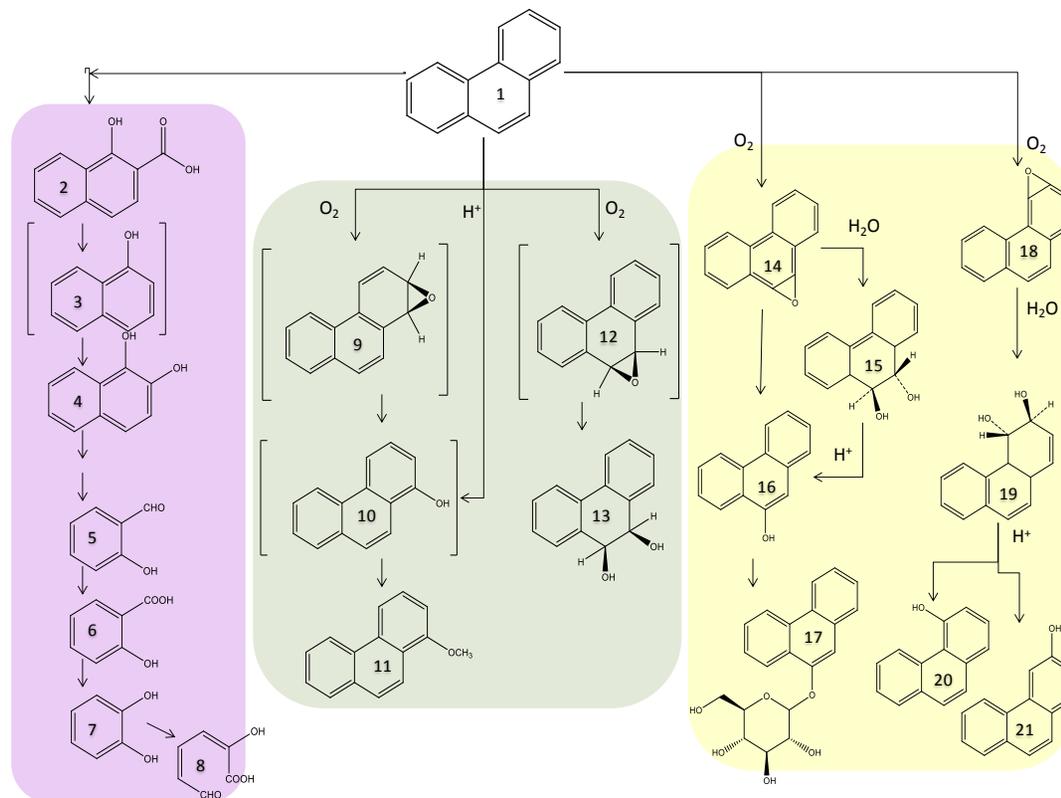
**Tabla 1.** Propiedades fisicoquímicas del fenantreno

<i>Número de anillos</i>	3	
<i>Características estructurales</i>	Región-K Region-bay	
<i>Punto fusion</i>	98-100	°C
<i>Punto de ebullición</i>	340	°C
<i>Densidad</i>	1.063	g/mL (25°C)
<i>Solubilidad en agua</i>	1.100	µg/L
<i>Coefficiente octanol/agua (log Kow)</i>	4.57	
<i>Peso molecular</i>	178.2	
<i>Presión de vapor</i>	6.8 x 10 <sup>-4</sup>	mmHg

Fuente: (Ma. W-C. et al., 1998)

### 2.7.1 Principales rutas de biodegradación de fenantreno

Las principales rutas descritas sobre la transformación de fenantreno en bacterias, hongos y algas, involucra una primera oxidación en cualquiera de los sitios C1-C2, C3-C4 y C9-C10 formando moléculas inestables como: fenantreno-1,2-óxido, fenantreno-3,4-óxido y fenantreno-9,10-óxido. Estas se transforman en moléculas más estables como el fenantreno-trans 9,10 dihidrodiol en cianobacterias, y el 3-fenantrol, 4-fenantrol y 9-fenantrol en hongos (Figura 9). En el caso de bacterias, se ha logrado dilucidar gran parte de la ruta de degradación detectando como intermediarios el catecol (Figura 9).

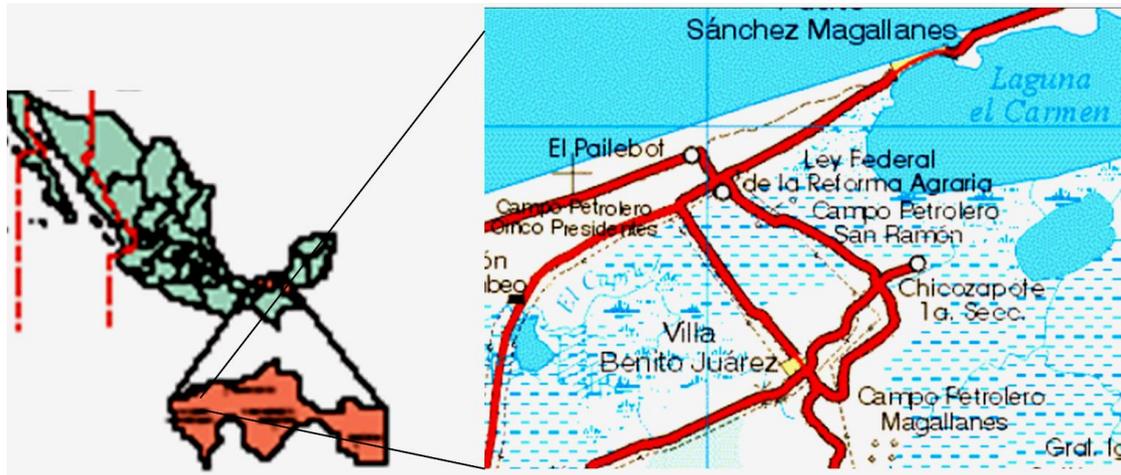


**Figura 9.** Ruta de degradación de fenantreno por la bacteria *Pseudomonas sp* PP2 (Prabhu & Phale, 2003), la cianobacteria marina *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 (Narro *et al.*, 1992) y el hongo ligninolítico *Phanerochaete chrysosporium* (Sutherland *et al.*, 1991). **1.** Fenantreno; **2.** Ácido 1-hidroxi-2-naftóico; **3.** α-naftol; **4.** 1,2-dihidroxi-naftaleno; **5.** Salicilaldehido; **6.** Salicilato; **7.** Catecol; **8.** 2-hidroximuconicsemialdehido; **9.** 1,2-óxido fenantreno; **10.** 1-fenantrol; **11.** 1-metoxifenantreno; **12.** 9,10-óxido fenantreno; **13.** Fenantreno *trans*-9,10-dihidrodiol; **14.** 9,10-óxido fenantreno; **15.** Fenantreno *trans*-9,10-dihidrodiol; **16.** 9-fenantrol; **17.** 9-fenantrol-β-D-glucopiranosido; **18.** 3,4-óxido fenantreno; **19.** Fenantreno *trans*-3,4-dihidrodiol; **20.** 4-fenantrol; **21.** 3-fenantrol

### 3 ANTECEDENTES DIRECTOS

#### 3.1 Características de los sitios de estudio

En estudios previos realizados por Palma-Cruz *et al.*, (2004), se realizó la prospección de la ecología y la fenología de especies vegetales crecidas en 19 sitios impactados con hidrocarburos en el municipio de Cárdenas en el estado de Tabasco (Figura 10). El clima predominante es cálido-húmedo (*Am*) con abundantes lluvias en verano observándose las máximas precipitaciones en los meses de septiembre y octubre. La temperatura media anual es de 27.0 ° C y oscila entre 14 y 13 ° C en invierno y 41°C en los meses de abril a junio. De 19 zonas visitadas, se seleccionó el pozo 205 del Campo Sánchez-Magallanes (**S205**) que originalmente fue impactado por un derrame de petróleo crudo en 1950, además de recibir subsecuentes adiciones de hidrocarburos producidas por la dinámica hidrológica natural de la zona. El análisis de hidrocarburos del suelo indicó que poseía 325,000 ± 80,000 mg de TPH por kilogramo de suelo. El suelo **SSR** corresponde a la Batería San Ramón, que fue impactado por un derrame de petróleo crudo en 1999, producido por la ruptura de una línea de conducción y que estuvo sujeto a derrames constantes de hidrocarburos producidos por daños en los oleoductos del área. El análisis de la concentración de hidrocarburos dio como resultado un contenido de 141,000 ± 25,000 mg de HTP por kilogramo de suelo. Finalmente, el pozo 163-D de la Batería 3 en el campo Sánchez Magallanes (**S163**) que aunque aparentemente parecía estar libre de contaminación, presentó una concentración de 16,000 ± 2,000 mg de HTP por kilogramo de suelo. Esta zona fue remediada por PEMEX en 1999, mediante la sustitución del suelo contaminado por otro suelo procedente de un sitio sin contaminación de los ecosistemas circundantes (Palma-Cruz *et al.*, 2004).



**Figura 10.** Localización del área de estudio, en el estado de Tabasco México

Los análisis fisicoquímicos de los suelos de los tres sitios seleccionados (Tabla 2) indican que se trata de suelos con densidades aparentes muy altas debido a su elevado contenido de arcilla. Adicionalmente, se observó que estos sitios fueron ocupados paulatinamente por especies vegetales invasoras, las cuales son responsables del incremento de materia orgánica y otras características que se modifican sustancialmente y permiten el restablecimiento natural de nuevas comunidades vegetales.

### **3.2 Vegetación en los sitios afectados por las actividades petroleras**

Según los reportes de Palma Cruz *et al.*, (2004 y en impresión 2015), la vegetación natural predominante en la zona no afectada corresponde a la vegetación acuática y subacuática, principalmente popales como *Thalia geniculata*, *Cyperu ssp*, *Mimosa pigra*, *Sagittaria latifolia* y *Ludwigia peploides*; tulares y vegetación flotante como *Typha latifolia*, *Scirpus sp*, *Nymphaea ampla*, *Pistia stratiotes* entre otras (Figura 11).

**Tabla 2.** Características fisicoquímicas de los suelos en estudio

	<b>S205</b>	<b>SSR</b>	<b>S163</b>
Tipo de suelo	Gleysol mólico	Fluvisol gleyi-éutrico	Gleysol éutrico
<b>Color</b>	Gris (5 Y 4 / 1)	Pardo amarillento (10 YR 5 / 6)	Gris (10 YR 6 / 1)
<b>Textura</b>			
% arcilla	40.65	38.36	46.01
% limo	24.55	12.72	16.01
% arena	34.29	48.91	37.99
<b>Clase textural</b>	Arcilloso	Franco-arcilloso	Arcilloso
<b>pH</b>	7.4	6.5	7.3
<b>% materia orgánica</b>	2.41	1.96	1.62
<b>% Nitrógeno total</b>	0.1108	0.0862	0.0664
<b>Capacidad de intercambio catiónico</b>	42.1	35.71	36.45
<b>Cmol*kg<sup>-1</sup></b>			
<b>Cmol*kg<sup>-1</sup> Ca</b>	26.44	23.94	18.9
<b>Cmol*kg<sup>-1</sup> Mg</b>	14.27	10.71	14.28
<b>Cmol*kg<sup>-1</sup> Na</b>	1.18	0.55	0.71
<b>Cmol*kg<sup>-1</sup> K</b>	1.68	0.30	1.50
<b>mg kg<sup>-1</sup> P asimilable</b>	36.53	18.45	33.89
<b>Densidad aparente</b>	1.29	1.26	1.37

Tomado de Palma-Cruz *et al.*, 2004



**Figura 11.** Vegetación acuática y subacuática aledaña a la zona de estudio

Dada la constante actividad extractiva de petróleo en las últimas cinco décadas, los popales, tulares y palmares han sido fuertemente transformados o eliminados lo que ha producido una severa alteración en las condiciones ambientales de esta área. Tal como se muestra en la Tabla 3, donde se observó un cambio dinámico en la estructura de la comunidad vegetal en un lapso de dos años. La disminución de la diversidad de especies de herbáceas en la vegetación acuática y la sustitución por poblaciones puras de *Cyperaceas*, se debe no solo al impacto de los derrames de

petróleo crudo sobre el ecosistema, sino también al acortamiento de los períodos de inundación del humedal (Palm-Cruz *et al.*, 2004).

**Tabla 3.** Cambio dinámico de las poblaciones vegetales en los sitios de estudio

ESPECIE	DENSIDAD (Individuos/m <sup>2</sup> )		DOMINANCIA <sup>a</sup> (% Área cubierta/especi e)		FRECUENCIA <sup>b</sup> (Probabilidad de encuentro)		VALOR DE IMPORTANCIA <sup>c</sup> (vim)	
	2002	2003	2002	2003	2002	2003	2002	2003
S205: 325 000 ± 80 000 mgTPH/kg suelo								
<i>Carex crus-corvi</i>	8	20	5	5	0.25	50	23.5	21.7
<i>Cyperus esculentus</i>	81	79	17.5	17.5	0.75	62.5	<b>105.0</b>	<b>55.8</b>
<i>Cyperus laxus</i>	-	235	-	17.5	-	62.5	-	<b>85.0</b>
<i>Cyperuspapyrus</i>	37	14	17.5	5	0.375	37.5	<b>63.5</b>	18.2
<i>Eragrostis reptans</i>	18	66	5	5	0.375	62.5	34.8	32.8
<i>Heliconia latispata</i>	-	2	-	0.1	-	25	-	5.4
<i>Ipomoea purpurea</i>	-	2	-	0.1	-	25	-	5.4
<i>Ludwigia peploides</i>	-	3	-	0.1	-	25	-	5.6
<i>Mimosa pigra</i>	-	2	-	0.1	-	25	-	5.4
<i>Phlebodium decumanum</i>	3	1	0.1	0.1	0.125	12.5	7.7	2.8
<i>Poaceae 1</i>	-	64	-	5	-	37.5	-	27.5
<i>Sonchus oleraceus</i>	-	2	-	0.1	-	25	-	5.4
<i>Thalia geniculata</i>	6	7	5	0.1	0.25	25	22.4	6.4
<i>Typha latifolia</i>	32	38	17.5	5	0.375	37.5	60.8	22.7
SSR: 141 000 ± 25 000 mgTPH/kg suelo								
<i>Cyperus esculentus</i>	39	53	5	17.5	0.75	75	45.6	38.6
<i>Cyperus laxus</i>	233	907	37.5	37.5	1	100	<b>143.0</b>	<b>132.1</b>
<i>Eragrostis reptans</i>	-	74	-	17.5	-	50	-	34.0
<i>Ludwigia peploides</i>	-	1	-	0.1	-	12.5	-	3.3
<i>Myrtaceae 1</i>	1	1	0.1	0.1	0.125	12.5	5.4	3.3
<i>Poaceae 1</i>	-	106	-	17.5	-	75	-	<b>42.9</b>
<i>Poaceae 2</i>	-	42	-	5	-	37.5	-	17.2
<i>Pontederia cordata</i>	82	45	17.5	17.5	0.25	37.5	51.8	28.6
<i>Typha latifolia</i>	71	-	17.5	-	0.375	-	<b>54.2</b>	-
S163: 16 000 ± 2 000 mgTPH/kg suelo								
<i>Carex crus-corvi</i>	6	-	5	-	0.25	-	37.5	-
<i>Cyperus esculentus</i>	36	-	17.5	-	0.625	-	<b>138.6</b>	-
<i>Eragrostis reptans</i>	12	78	17.5	17.5	0.375	25	<b>83.2</b>	<b>41.1</b>
<i>Ludwigia peploides</i>	8	-	5	-	0.25	-	40.7	-
<i>Poaceae 1</i>	-	4	-	0.1	-	25	-	31.3
<i>Pontederia cordata</i>	-	17	-	5	-	37.5	-	29.8
<i>Thalia geniculata</i>	-	3	-	0.1	-	12.5	-	15.8
<i>Typha latifolia</i>	-	691	-	87.5	-	62.5	-	<b>205.0</b>

Tal como reporta Palma-Cruz, *et al.*, 2004 es importante reconocer que las especies presentes en los sitios en estudio, representan un indicador confiable de la resistencia o estado de recuperación de cada uno de ellos, así como de la disminución del efecto tóxico, provocado por los hidrocarburos del petróleo.

De acuerdo a los resultados del valor de importancia, se observa que las *Cyperaceas* participan de manera dominante y co-dominante en los sitios con mayor grado de contaminación. Adicionalmente, durante el 2007-2009 se observó que *C. laxus* crecido en condiciones de invernadero, prevalecía durante las cuatro estaciones del año, al contrario de *C. esculentus* donde su ciclo de vida duraba únicamente de otoño a invierno. Razón por la cual, *C. laxus* resulta ser un modelo vegetal adecuado para el estudio de mecanismos y estrategias de fitorremediación, por ser una especie perennifolia capaz de desarrollarse y prevalecer en suelos con elevadas cargas de HTP.

### **3.2.1 *Cyperus spp***

De lo anterior, *Cyperus spp* es una especie vegetal del orden de los *Cyperales* (Tabla 4) que ha sido utilizada para pruebas de fitorremediación y que crece en las zonas contaminadas por hidrocarburo en los pantanos tropicales mexicanos de Veracruz y Tabasco. En la literatura se reporta que la mezcla de *Ludwigia peploides*, *Cyperus esculentus* y *Cyperus laxus* tuvo un efecto sinérgico en la remoción de TPH logrando disminuir estos contaminantes en un 92% en el lapso de tres años (Figura 12). En otro estudio, se demostró la existencia de beneficios mutuos entre *C. laxus* y los microorganismos degradadores de hidrocarburos inoculados, durante el proceso de fitorremediación (Palma-Cruz *et al.*, 2004).



**Figura 12.** *Cyperus esculentus* (izquierda), *Cyperus laxus* (centro) y *Ludwigia Peploides* (derecha) crecidos en condiciones de invernadero

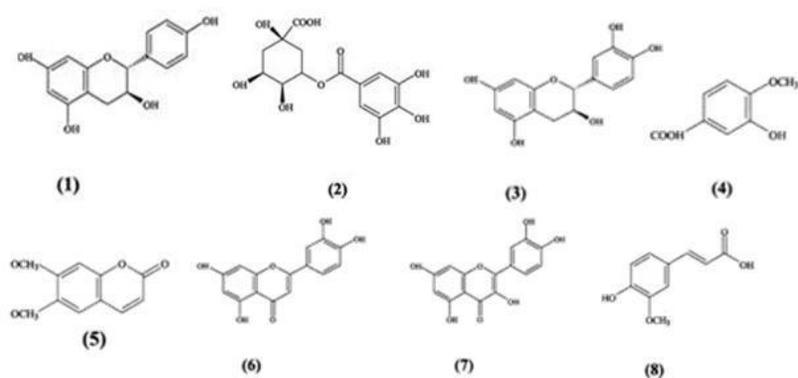
**Tabla 4.** Clasificación botánica de *Cyperus*

INFORMACIÓN SISTEMÁTICA	
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Tracheabionta (planta vascular)
<b>Superdivisión</b>	Spermatophyta (planta con semilla)
<b>División</b>	Magnoliophyta (planta con flor)
<b>Clase</b>	Liliopsida (Monocotiledonea)
<b>Subclase</b>	Commelinidae
<b>Orden</b>	Cyperales
<b>Familia</b>	Cyperaceae
<b>Género</b>	<i>Cyperus</i> L.

### **3.2.2 Metabolitos secundarios de Cyperaceas y distribución de fenilpropanoides y actividad enzimática oxidativa en *C. laxus* crecido en suelos con diferente carga de hidrocarburos**

Se han reportado actividades terapéuticas obtenidas a partir de extractos fenólicos de raíz y tallo de *Cyperus alternifolius*. Estos extractos mostraron actividad antifúngica, mientras que el extracto de raíz presenta actividad antioxidante de

EC50 9.3 mg/ml<sub>1</sub> (Salazar-Aranda *et al.*, 2009). Los rizomas y tubérculos de *Cyperus rotundus* L. han sido utilizados como agentes estrogénicos, inflamatorios, analgésicos y sedantes (Yan *et al.* 2009; Kilani *et al.* 2008). Estudios fitoquímicos han demostrado que la mayoría de los compuestos de esta última *Cyperaceae* son principalmente: aceites, flavonoides, terpenoides, mono- y sesquiterpenos. En un extracto alcohólico hidroalcohólico de esta planta se demostró su capacidad reductora, alta capacidad de atrapar radicales libres, especialmente con 2,2 difenil-1-picrilhidracil (DPPH) y superóxido, así como un efecto moderado en óxido nítrico (Kilani *et al.*, 2008). Adicionalmente, se ha reportado el uso de extractos metanólicos de esta especie como candidatos en el tratamiento antiinflamatorio mediante la sobreproducción de óxido nítrico y superóxido (Kilani-Jaziri *et al.*, 2009) y en esos extractos se identificaron estructuralmente 8 compuestos (Figura 13).



**Figura 13.** Metabolitos de extractos metanólicos de *Cyperus rotundus*. 1 afzelequin; 2. Ácido galloilquínico; 3. Catequina; 4. Ácido 3-hidroxi, 4-metoxibenzóico; 5. 6,7-dimetoxicumarina; 6. Luteolina; 7. Quercetina. 8. Ácido ferúlico (Kilani-Jaziri *et al.*, 2009).

Por otro lado, en el trabajo de maestría predecesor del presente estudio (Rivera-Casado, 2009), se evaluó el perfil de compuestos fenólicos presentes en un sistema experimental para la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante el cultivo de *Cyperus laxus pl.* En el perfil cromatográfico por HPLC/UV tanto de los suelos cultivados, como de extractos de raíz, bulbo y hoja se identificaron fenoles pertenecientes al grupo de los ácidos benzóicos, cinámicos, flavonas y flavonoles tales como ácido protocatecúico, alcohol coniferílico, crisina,

p-hidroxibenzóico, quercetina, quercetrina y luteína, algunos libres y otros presumiblemente conjugados con hidrocarburos poliaromáticos (Figura 14).

	Suelo no cultivado		Suelo cultivado		Raíz		Bulbo		Hoja	
5J pl			NAF ANT CRI BfF	QTN QTRN	NAF* ACNF ANT Iz3P*	HMBOH QTRN* QTN V PTC* BEN	ACNF FNN FLT* BaA* Iz3P	HMBOH BEN DMBA* PTC* CIN* V SLA pHBZ QTN	ANT FLT BaA FL*	HMBOH BEN SLA CRY* pHBZ* ComOH QTN LUT
SSR pl (141.000 ppm)	NAF ACFTY ANT FLT FL*	HMBOH PTC LUT ComOH QTRN* DMBA*	NAF ACNF ANT FNN FLT CRI	QTN QTRN	ACNF NAF*	HMBOH BEN QTN QTRN*	ACNF FL BaA* FLT*	HMBOH BEN PTC* pHBZ* V* DMBA* CIN pHBA	ACNF ANT FNN BaA CRI FL*	HMBOH BEN ComOH SLA PTC* CRY*
S205 pl (325.000 ppm)	ACNF NAF ANFTY FL* ANT BfF	HMBOH DMBA PTC QTRN* QTRN LUT	NAF* ANT FNN CRY	DMBA* QTN	NAF* ACNF ANT BaA* BfF	HMBOH QTRN* QTN V pHBZ* BEN	ACNF FNN FLT* BaA*	HMBOH BEN DMBA* pHBA* BEN SLA PTC	NAF* ACNF FL* ANT FNN FLT BaA	HMBOH PTC* BEN CRY* pHBZ* ComOH
S205 plI					NAF* ACNF ANT	HMBOH BEN QTRN* QTN PTC	ACNF FNN FLT*	HMBOH BEN DMBA* PTC ComOH CIN V pHBZ	FL ANT FLT* BaA BfF	HMBOH BEN CRY* pHBZ* PTC ComOH SLA

**Figura 14.** Perfil de hidrocarburos poliaromáticos y compuestos fenólicos en *C. laxus* (Rivera-Casado, 2009)

Esos resultados sugirieron una posible participación de estos metabolitos en el proceso de fitorremediación de HPA como mediadores metabólicos durante el proceso inicial de oxidación debido en gran medida a las propiedades antioxidantes de estos fenoles. Además de que en las reacciones de conjugación podrían estar involucrados mecanismos enzimáticos oxidativos, del tipo peroxidasas, lacasas, catecol oxidasas, dioxigenasas y polifenol oxidasas presentes comúnmente en las plantas *C. laxus* y producidas también por los microorganismos presentes en su

rizósfera. De ello, se sugirió que el mecanismo de remoción de estos HPA probablemente incluía la participación de un sistema complejo Enzima-Mediador-Sustrato, hipótesis estudiada en este trabajo.

### 3.2.3 *La especie Cyperus laxus*

La planta *Cyperus laxus* utilizada en este trabajo, es una planta herbácea de hojas lanceoladas de 15 a 25 cm de longitud por 5 a 7 mm de ancho, de color verde; sus raíces son delgadas de color blanco o ligeramente amarillas y forman densas redes dentro del agua o del sustrato en que se desarrollan (Figura 15). Sus flores están agrupadas en espiguillas de 2-3 mm de longitud, formando espigas poliédricas compactas en el ápice de las inflorescencias, protegidas por gruesas brácteas con la misma forma que las hojas, aunque un poco más cortas, mismas que cuelgan desde los tallos florales. Estos últimos son cilíndricos y ásperos, llegando a medir hasta 40 cm de longitud. Las semillas son elipsoidales-alargadas, muy planas y pequeñas de 0.3 mm de largo por 0.1 mm de ancho, de color café pálido.



**Figura 15.** *Cyperus laxus* crecidos en (A) suelo contaminado con hidrocarburo y (B) suelo libre de hidrocarburo (Palma-Cruz *et al.*, 2004).

De igual forma, en este periodo fue posible identificar dos poblaciones dominantes de *Cyperus laxus*, cuya diferencia radica principalmente en el tipo de inflorescencia, aunque la distribución de los órganos principales se conservó (Figura 16). De igual forma que *C. esculentus*, *C. laxus* población II prevalece en el periodo de otoño-invierno por lo que los estudios subsecuentes basados en este sistema de

fitorremediación, incluyendo los se realizarán en este trabajo, se desarrollarán con *C. laxus* población I



**Figura 16.** *Cyperus laxus* población I (izquierda). *Cyperus laxus* población II (centro). Órganos principales de *Cyperus laxus* (derecha)

En consecuencia, el presente estudio partió de la observación de que en presencia de antraceno la actividad de estas enzimas en extractos proteicos de *C. laxus pl* favoreció la formación de metabolitos oxidados del HPA formando *o*-quinonas, *o*-fenoles y 9,10-antraquinona. En esos estudios se encontró que como producto de la actividad de las enzimas oxidativas en los extractos proteicos de *C. laxus*, se formaban metabolitos cuya característica principal era la presencia de grupos carboxílicos, aldehídos, cetonas y alcoholes. Todos esos datos soportan la hipótesis de que en los sistemas de fitorremediación para la remoción de HPA por *Cyperus* se llevan a cabo procesos bioquímicos compartidos entre la especie vegetal y las microflora presentes en la rizósfera. Sin embargo el presente estudio se enfocó a investigar el papel del metabolismo bioquímico-enzimático de la planta y sus metabolitos fenólicos como mediadores metabólicos así como el efecto de los hidrocarburos sobre los cambios fisiológicos de la planta.

## 4 JUSTIFICACIÓN

Las posibles conjugaciones fenilpropanoide-HPA detectados previamente en los extractos de los órganos de *C. laxus* pl crecidos en suelos con diversa carga de hidrocarburos del petróleo, así como la presencia de enzimas oxidativas de la planta en presencia de antraceno, soportan la hipótesis de que la planta sintetiza diversos compuestos fenólicos para llevar a cabo los procesos de fitotransformación y fitoremoción de los HPA del suelo. Dado que los mediadores naturales derivados de compuestos fenólicos vegetales suelen tener una participación importante en los procesos oxidativos de xenobióticos, este modelo vegetal resultó ideal para el estudio del sistema Enzima-Mediador-Xenobiótico, que hasta el momento habían sido evaluados únicamente para enzimas de hongos.

Aunque la actividad microbiana rizosférica no puede ser ignorada en los procesos de fitorremediación, el metabolismo de esta especie vegetal es capaz de llevar a cabo la traslocación y transformación del contaminante debido a cambios en la composición lipídica de sus células, la síntesis de moléculas con alto poder antioxidante como la quercetina y la presencia de enzimas oxidativas como peroxidasas aunado a la liberación de especies reactivas de oxígeno como respuesta al estrés ocasionado por el hidrocarburo en el sitio.

Los resultados de esta investigación permitieron dilucidar algunos mecanismos químicos, bioquímicos y enzimáticos oxidativos involucrados en el proceso de fitorremoción de hidrocarburos poliaromáticos en suelos contaminados con hidrocarburos mediante su estudio en sistemas de fitorremediación en invernadero e *in vitro*, así como determinar que la cantidad y tipo de hidrocarburo promueve cambios en la morfología de la planta principalmente a nivel de raíz y hoja. Con ello se propuso un esquema donde se integran las estrategias que *C. laxus* utiliza para la remoción de HPA, sin descartar que aún queda una infinidad de variables e interacciones que no fueron evaluadas en este estudio pero que forman parte del complejo metabolismo vegetal.

## 5 HIPÓTESIS

La remoción de hidrocarburos por *C. laxus* se efectúa con la participación de compuestos fenólicos que actúan como mediadores metabólicos en los primeros pasos de oxidación de hidrocarburos poliaromáticos

Los hidrocarburos presentes en los sistemas de fitorremediación afectan la composición de ácidos grasos y fenoles en las plantas de *Cyperus laxus*

## 6 OBJETIVOS

Investigar el potencial los compuestos fenólicos para actuar como mediadores metabólicos en el proceso de fitorremediación de suelos intemperizados contaminados con hidrocarburos

Evaluar el efecto de los hidrocarburos sobre la fisiología y el perfil metabólico de ácidos grasos y fenoles en las plantas de *C. laxus* usadas en el proceso de fitorremediación de suelos intemperizados contaminados con hidrocarburos

## 7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer sistemas de fitorremediación en cultivos *in vitro* a partir de semillas de *C. laxus*, utilizando fenantreno como HPA modelo
- Evaluar el cambio en el perfil de compuestos fenólicos en los principales órganos de *C. laxus* crecidos en sistemas de fitorremediación en invernadero e *in vitro*
- Investigar los cambios en la composición lipídica de *C. laxus* debido a la presencia del HTP y fenantreno, y su posible repercusión en los procesos de fitorremediación
- Identificar algunas moléculas del metabolismo de *C. laxus* con potencial como mediadores oxidativos de HPA
- Evaluar la oxidación enzimática de fenantreno bajo el modelo enzima-mediador-xenobiótico utilizando a la peroxidasa como sistema enzimático modelo y a la quercetina como mediador metabólico
- Proponer un modelo de interacción xenobiótico – sistema vegetal e indicar su importancia durante el proceso de fitorremediación de hidrocarburos poliaromáticos

## **8 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1 Sustancias**

Todas las sustancias fueron grado reactivo y obtenidas de Sigma Aldrich Chemical Co. Ltd., Toluca, México. Las soluciones stock de HPA fueron preparadas a partir de la mezcla de hidrocarburos aromáticos poliaromáticos de SUPELCO® (No. 48905-U). Los solventes fueron grado analítico o HPLC según correspondiera. Los medios de cultivo o sus componentes fueron adquiridos de Sigma Aldrich Chemical Co. Ltd., Toluca, México.

### **8.2 Material vegetal y suelos**

Se utilizaron plantas maduras completas de *Cyperus laxus* (población I, Figura 16) crecidas en macetas con suelo de pozos P163 (16 000 ppm de HTP), P250 (325 000 ppm), batería San Ramón (SSR) (141 000 ppm) todas ellas provenientes del estado del Tabasco, adicionalmente se utiliza suelo con tierra negra como control. Para todos los casos, la germinación y crecimiento se lleva a cabo bajo condiciones de invernadero.

Para la extracción de metabolitos y enzimas, las plantas o sus órganos se lavan para eliminar tierra, desecho orgánico e hidrocarburo adherido superficialmente al tejido. El órgano o tejido limpio se secó en un horno a 60°C durante 18h. El tejido seco se molió en presencia de nitrógeno líquido en un mortero.

### **8.3 Generación plantas en cultivos in vitro**

Se colectaron semillas de *C. laxus pl* de plantas desarrolladas en invernadero a partir, del cultivo de plantas colectadas de los sitios contaminados con petróleo crudo en el estado de Tabasco (Figura 12, Sección 3.2.1) Previa a la desinfestación las semillas se dejaron en agua desionizada durante 48h. Posteriormente, las semillas se sumergieron durante 20s en etanol 70% seguido de 15 minutos en

NaHClO 5% (se realizaron lavados con H<sub>2</sub>O desionizada estéril (3x) entre cada paso de la desinfestación.

Las semillas desinfestadas se colocaron en cajas petri con medio MS semisólido (4.3g/L de MS basal, 30 g/L de sacarosa, 1 g/L de vitaminas y 1.8 g/L de fitagel). Después de 14 días y 30 días se realizaron trasplantes a frascos de vidrio con 25 mL de medio MS colocando 6 plántulas en cada frasco. Para el mantenimiento de las plántulas se agregó medio MS líquido cada tres meses.

#### **8.4 Extracción primaria de metabolitos**

A partir de la materia vegetal seca, molida y pesada se realiza una primera extracción con metanol:cloroformo (1:1) para obtener la fracción acuosa y la fracción orgánica. Para ello es necesaria la adición de agua desionizada hasta observar separación de fases.

#### **8.5 Extracción y análisis de ácidos grasos de materia vegetal crecida en invernadero**

##### **8.5.1 Extracción del material lipídico**

Se realizó a partir de una modificación de los métodos reportados por Bligh & Dyer (1959). Se tomaron 100 mg de tejido vegetal previamente pulverizado con N<sub>2</sub> y se mezcló con 1 mL de la mezcla cloroformo-metanol durante 20s en vortex. La mezcla de solventes se ajustó a una proporción (1:2:03) cloroformo-metanol-agua en base al contenido de humedad del tejido (generalmente 77% para hoja y 51% para corno y raíz). Posteriormente, se adicionó 1 mL de cloroformo y se homogeneizó durante 10 segundos en vortex. A esta mezcla se le agregó 1 mL de agua desionizada obteniendo una proporción final de 2:2:1.8 cloroformo-metanol-agua, la cual fue nuevamente homogeneizada por 20 segundos en vortex y filtrada. Los lípidos se concentran en la fracción orgánica, la cual se colectó, se llevó a sequedad con N<sub>2</sub> gaseoso y se resuspendió en 1 mL de cloroformo.

### **8.5.2 Extracción de ácidos grasos**

*Ácidos grasos metil esteficados:* Se realizó a partir de modificaciones a las técnicas de Hautfenne (1982) y Burja *et al.*, (2007) donde se llevan a cabo procesos de saponificación, metilación y esterificación para estudios fitoquímicos. Para la saponificación y transesterificación, se colectaron de 200  $\mu$ L del extracto de la fracción orgánica obtenida de la extracción primaria y se colocaron en vasos de precipitado de 100mL, se adicionó NaOH (2 hojuelas o 250mg), metanol (20 mL) y agua (5mL) y se calentó hasta llevar la solución a sequedad. Se llevó a cabo un lavado con hexano (5mL) para eliminar la materia insaponificable. Nuevamente se adicionó en caliente 3 mL de HCl (37% p/v), metanol (20 mL) y hexano (10 mL) y se llevó a casi sequedad. Con hexano y agua (20mL/20mL) se llevó a cabo la separación de la fase orgánica donde se encuentran los ácidos grasos saponificables. La muestra se llevó a 20 $\mu$ L para inyectarse 3 $\mu$ L de muestra en un cromatógrafo de gases bajo las siguientes condiciones: col-150<sup>o</sup>-2-6<sup>o</sup>/min  $\rightarrow$  220<sup>o</sup>C-0` min  $\rightarrow$  2<sup>o</sup>/min  $\rightarrow$  250<sup>o</sup>C-14 min/42.7 min

### **8.6 Extracción de compuestos fenólicos**

A partir de la fracción acuosa (metanol) se toma una muestra de 200  $\mu$ L que se inyecta en el HPLC utilizando en una columna PRODIGY ODS2 fase reversa (C18, 25 cm x 4.6 mm; 5 $\mu$ m; HPLC UV-visible Thermo Separation). La elución se desarrolla utilizando como solvente A TFA 50 $\mu$ M y como solvente B Acetonitrilo HPLC con el siguiente gradiente: de 0-5 min A 10%, B 90%; de 5 a 25 min A 20%, B 80%; de 25 a 45 min A 65%, B 35%; de 45 a 60 min A 80%, B 20%; de 60 a 70 min A 95%, B 5%; y de 70 a 85 min A 10%, B 90%. Se usó una solución de compuestos fenólicos estándar que contenía: fenilalanina, cinámico, ferúlico, caféico, dihidroxicapsaicina, vainillina, ácido vainillínico, vainillínamina, isovainillínico, cumárico a una concentración de 75 $\mu$ M

El análisis se lleva a cabo utilizando la herramienta SPECTACLE del software PC1000/ HPLC mediante la comparación espectral con librerías establecidas.

Los tiempos de retención de algunos flavonoides que se encuentran en la librería son: QTN, 34.1 min; QTRN, 23.4 min; CRY, 38.95 min; MAY, 23.06 min; LUT, 32.9 min; RUT, 16.58 min.

### **8.7 Extracción de hidrocarburos poliaromáticos**

Se realiza de acuerdo al método 3550B reportado por la US EPA con algunas modificaciones. Se toman muestras de 15 g de suelo y un ejemplar de cada una de especies vegetales en estudio, separando estas últimas en sus tres órganos fundamentales: raíz, bulbo y hojas. Las muestras se secan a 100°C. Después de 48 h se maceran en N<sub>2</sub> líquido y se adiciona Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1:1) para mantener condiciones libres de humedad. Se realizan tres extracciones de 30 minutos en un equipo Ultrasonic Cleaner (capacidad de tanque de 3.78L, 40kHz), con diclorometano y los extractos fueron evaporados en un rotavapor Büchi B-490. Finalmente las muestras se resuspenden en 10 mL de diclorometano:tolueno (1:1). Para el análisis en HPLC las muestras fueron preparadas en una solución hexanos-etanol (1:1) ajustando a la dilución 1:10 ó 1:1000 de acuerdo a la muestra.

### **8.8 Extracción y cuantificación de proteína a partir de tejido vegetal**

El material vegetal se lava con diclorometano y se determina el peso fresco. Posteriormente, se tritura el tejido con N<sub>2</sub> líquido y se adiciona Buffer de extracción [25mM de Tris-HCl pH 7.0, 2mM EDTA, 1mM DTT, 1.5% (w/w) PVPP, 1.3 mM PMSF y 0.25% Tritón X100 (v/v); en proporción 1:1 (v/w)] La extracción se lleva a cabo en condiciones de refrigeración, en baño de hielo y agitación constante. Después de dos horas, la mezcla se centrifuga a 10000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se recupera y se cuantifica proteína por Bradford de acuerdo al protocolo Standard 3.1 mL establecido por Sigma. La mezcla de reacción consiste de 3 mL de solución de Bradford (Sigma B-6916) y 0.1 mL de la proteína muestra. Se incubaba a temperatura ambiente por 30 minutos. La absorbancia se mide a 595 nm. Se adicionan 20% de glicerol al extracto proteico para su almacenamiento a 4°C.

## **8.9 Oxidación in vitro de fenantreno por peroxidasa de rábano para estudiar la formación del complejo EMX.**

Los ensayos se realizaron en viales de vidrio de 1.5 mL con 500µL de mezcla de reacción (0.1M de Buffer de Potasio pH 6.0, 1% acetonitrilo grado HPLC, 350µM de SDS 1%, 50 µM de FNN, 300µM de QTN 0.000187 U/ µL de peroxidasa de rábano). La concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varió de 0 - 30000 µM dependiendo del experimento. Las condiciones de incubación fueron a 37°C/180rpm.

### **8.9.1 Extracción, identificación y cuantificación parcial de los productos de oxidación enzimática de FNN**

Se realizaron 3 extracciones con 750 µL de cloroformo. Se juntaron las fases orgánicas y se llevaron a sequedad a 40°C. Para su inyección en HPLC se resuspendieron en 1mL de dimetilformamida:acetona (1:1). Mientras que para la inyección de la fase acuosa (≈400 µL) se le adicionó 100 µL de metanol. La identificación parcial y la cuantificación de los compuestos presentes en la reacción de oxidación de FNN por la peroxidasa de rábano se realizó mediante separación y análisis espectral HPLC-UV. Se utilizó una columna PRODIGY ODS2 fase reversa (C18, 25 cm x 4.6 mm; 5µm; HPLC UV-visible Thermo Separation). La elución se desarrolla utilizando como solvente A Acetonitrilo HPLC y como solvente B TFA 1mM con el siguiente gradiente: de 0-4 min 0%B; de 4-5 min 35%; de 5-8 min 35%B; de 9-13 min 20%B y de 15-18 min 80%B. El análisis se lleva a cabo utilizando el software PC1000/HPLC y Chromeleon

## **8.10 Espectrometría de masas**

Estos análisis se realizaron en el Laboratorio Nacional de Servicio (LaNSE) del CINVESTAV. Se utiliza un instrumento Agilent Technologies Modelo G1969A acoplado a un HPLC 1100 utilizando detección por tiempo de vuelo (MS-TOF). La inserción se realizó por volumen muerto utilizando como modo de ionización /electron spray/.

## 9 RESULTADOS

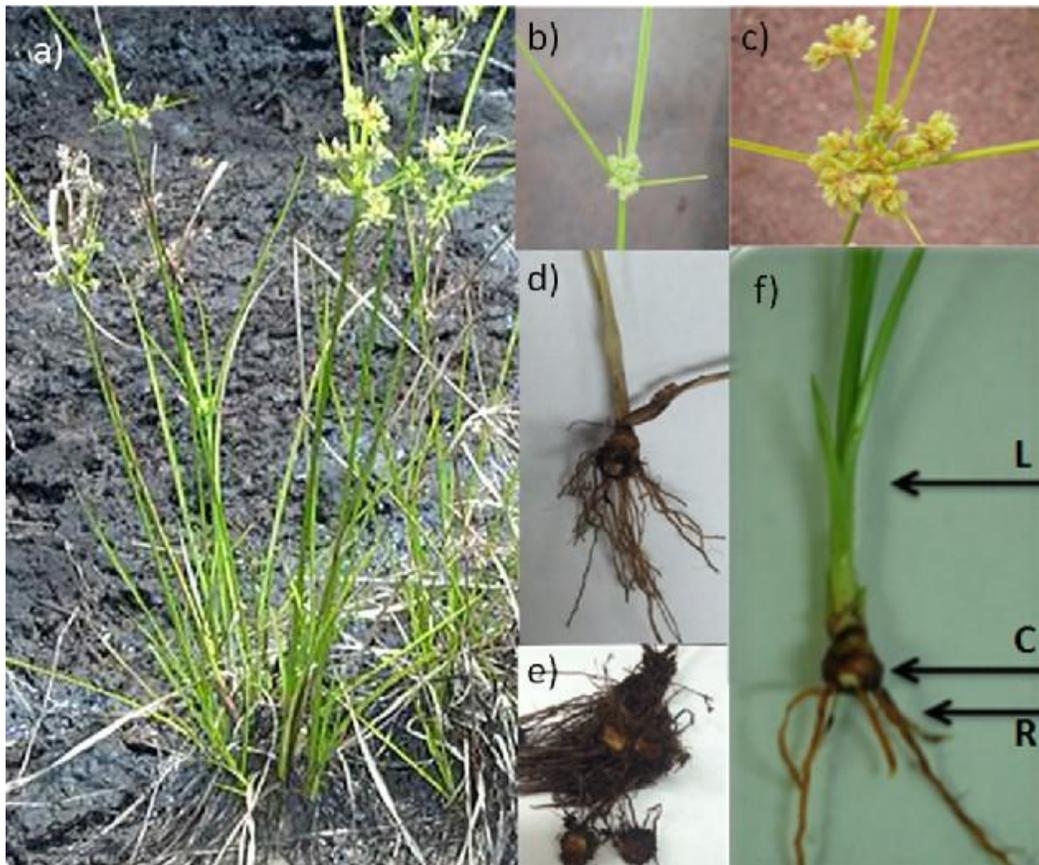
### 9.1 Estudios con Cultivo en invernadero

#### 9.1.1 Efecto de los hidrocarburos sobre la morfología y propagación de las plantas de *Cyperus laxus* en los sistemas de fitorremediación

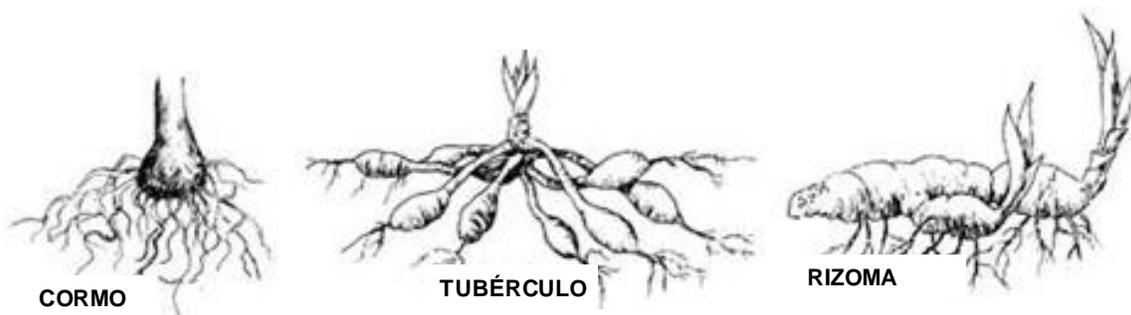
Las plantas de *C. laxus* crecidas bajo condiciones de invernadero en los sistemas de fitorremediación presentaron características fisiológicas similares a las plantas encontradas en los sitios impactado por petróleo crudo (Figura 17a). En ambos casos la altura de las plantas llegó a ser de hasta 30-40 cm. La formación de la inflorescencia característica de esta planta (Figura 17b) se inicia a las 9-10 semanas de edad, y queda completamente desarrollada después de 14-16 semanas, tiempo al que se puede observar la liberación de las primeras semillas, lo que se usó como criterio para determinar que se trataba de una planta madura, tal como se ilustra en la Figura 19c.

De igual forma, se observó que la propagación de *C. laxus* en los sistemas de fitorremediación, los cuales se iniciaron por inoculación con semillas, se llevaba a cabo por medio de cormos. A diferencia de otros órganos de reserva como los bulbos o tubérculos (Figura 18), el cormo se caracteriza por ser una estructura firme a partir de la cual, en el caso del cormo basal, se desprenden por un extremo las hojas y por el otro las raíces. En el caso de las plantas de *Cyperus laxus* desarrolladas en los sistemas de fitorremediación, además de los cormos basales (Figura 17d y 17f), se observó que las raíces solían extenderse hasta un siguiente cormo que mostraba la presencia de una gran cantidad de pelos radicales (Figura 17e). Interesantemente, en estos órganos subterráneos no fueron encontrados en las plantas crecidas en suelos no contaminados y no se encontraron reportes sobre las características fisiológicas de *C. laxus*. No obstante, reportes sobre otras Cyperaceas, como *C. esculentus* y *C. rotundus*, mencionan la presencia de rizomas o tubérculos (Sivapalan & Jeyadevan, 2012), pero no de cormos. De cualquier forma, se ha reportado que estos órganos de reserva en algunas Cyperaceas son

fuelle rica en carbohidratos, ácidos grasos y metabolitos secundarios del tipo flavonoides y/o alcaloides (Fuentes R.G *et al.*, 2000), lo que sugiere que este tipo de compuestos deben estar involucrados en el metabolismo de transformación de hidrocarburos durante el proceso de fitorremoción, lo que se investigó en este trabajo.



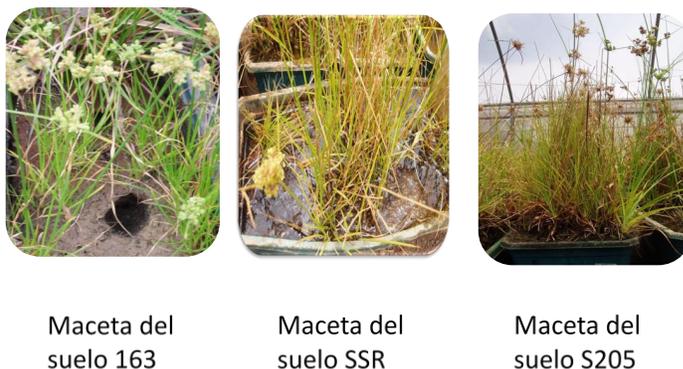
**Figura 17.** Principales características morfológicas de *Cyperus laxus*. Se muestran plantas pioneras de *Cyperus laxus* creciendo en sitios intemperizados después de haber sido impactados por derrames crónicos de petróleo crudo en el estado de Tabasco, México (a). Las características típicas de una planta joven son sus inflorescencias inmaduras (b), mientras que las plantas maduras muestran inflorescencias con presencia de semillas (c). El sistema radicular (R) se encuentra unido la parte aérea (L) por un cormo basal (C), órgano subterráneo de reserva (d y e) Para este trabajo se analizaron los tres órganos principales de la planta (f), es decir raíz (R), cormo (C) y hoja (L).



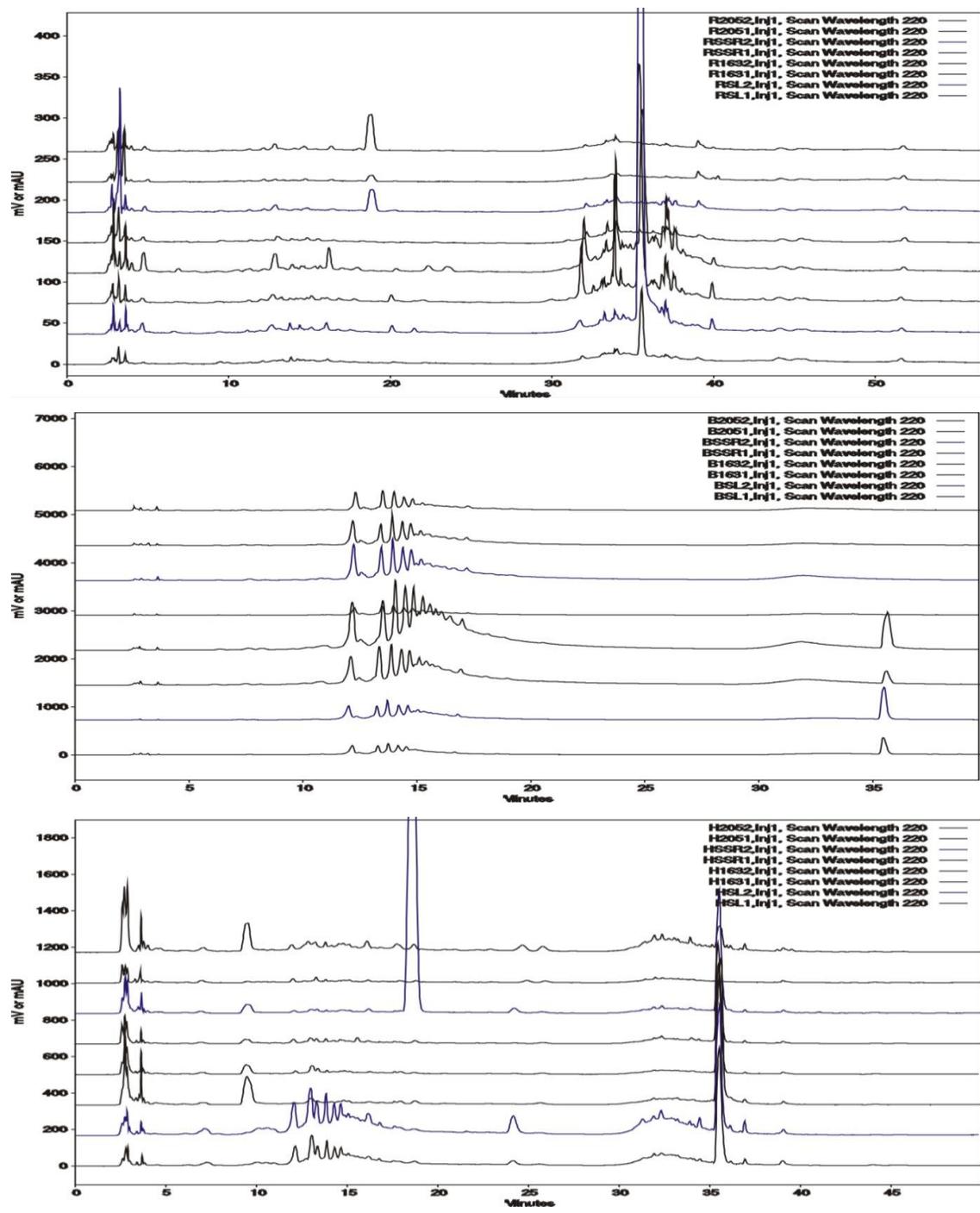
**Figura 18.** Principales órganos de reserva subterráneos de plantas. La diferencia entre estas estructuras radica tanto en la forma: esférica para cormos y ovalada para tubérculos y rizomas; además de la posición del brote del tallo para la planta: en cormo suele estar en la parte superior del mismo, en rizomas en un extremo y en tubérculos se genera a partir de nódulos.

### 9.1.2 Efecto de los hidrocarburos sobre el perfil de compuestos fenólicos

A partir de plantas maduras de *C. laxus* crecidas en suelo con diferentes contenidos de HTP (Figura 19) se realizó la extracción de compuestos fenólicos de los órganos principales de la planta: raíz, cormo y hoja.



**Figura 19.** *Cyperus laxus* crecido en macetas con suelos con a) 16 000 ppm, b) 141 000 ppm y c) 325 000 ppm de hidrocarburos totales del petróleo



**Figura 20.** Perfil de compuestos fenólicos en raíz (a), cormo (b) y hoja (c) de *C. laxus* pl crecidos en el sistema de fitorremediación en invernadero en las UE1. Para cada órgano, se muestran los cromatogramas a 220nm (de abajo hacia arriba) correspondientes a los extractos de dos plantas crecidas en suelo libre (SL), suelo con 16 000 ppm HTP (S163), suelo con 141 000 ppm HTP (SSR) y suelo con 325000 ppm HTP (S205) La identificación de los picos se indica en la Tabla 5, mostrando el

tiempo de retención, así como el nombre del compuesto identificado y su respectivo % de correlación espectral.

**Tabla 5.** Compuestos fenólicos detectados en raíz, (R), Cormo (B) y hoja (L) de plantas de *C. laxus* crecidos en UE1

RAÍZ			CORMO			HOJA		
TR (min)		% CE	TR (min)		% CE	TR (min)		% CE
2.88	QTN	85	2.07	PTC	94	2.67	QTN	90
	CRY	84		QTN	86		CRY	82
				CRY	84			
3.03	QTN	81	3.03	QTN	81	3.03	QTN	82
4.79	CRY	39	7.59	QTN	74	3.4	QTN	86
							QTRN	85
11.33	QTRN	85	10.4	QTRN	73	4.35	QTN	93
13.00	CRY	86	13.3	QTRN	78	7.26	LUT	70
14.5	QTRN	76	13.8	QTRN	73	12.82	LUT	25
22.3	LUT	66	14.3	QTRN	70	13.38	QTRN	77
	MAY	57						
32.11	LUT	90	35.5	QTRN	79	14.49	QTRN	97
	RUT	87		RUT	75			
	QTRN	81		LUT	77			
34.11	QTN	78	59.97	QTN	30	18.75	QTN	72
	CRY	77						
36.4	QTN	76				24.15	QTN	80
37.3	LUT	75				25.67	LUT	97
	QTRN	73					RUT	93
							MAY	93
51.7	QTRN	70				35.06	LUT	73
	QTN	70						
						36.9	CRY	86
						39.1	QTN	83
						51.8	QTN	74
							QTRN	70

% CE = % correlación espectral respecto al estándar de la librería utilizada en el equipo HPLC RP UV

Los perfiles de fenoles en los extractos de los órganos de la planta (Figura 20) evidenciaron la presencia de flavonoides libres como quercetina (QTN), crisina (CRY), moléculas similares a la maizina (MAY), luteína (LUT) y flavonoides glicosilados como quercetrina (QTRN) y rutina (RUT). Cabe destacar que la gran mayoría de estos compuestos fenólicos presentó un porcentaje de correlación espectral menor al 90% además de eluir a tiempos diferentes a los estándares. Esto indica que la estructura principal del flavonoide se conservó aunque sufrió algunas modificaciones estructurales que promueve la disminución de su polaridad, por ejemplo una glicosilación. Sin embargo, también se identificaron compuestos como la luteína en el tejido de raíz (Figura 20a) cuyo tiempo de retención fue similar al estándar y con correlación espectral de 90% indicando gran nivel de identidad. O bien, como el caso de QTRN de tejido de hoja (Figura 20c) donde se observó una correlación del 97% aunque hubo disminución en el tiempo de retención de aproximadamente 10 minutos respecto al estándar, lo que podría sugerir nuevamente que el compuesto identificado haya sufrido glicosilaciones que aumenten su polaridad.

En base al análisis de los perfiles, se observó que la mayoría de los flavonoides en raíz se concentra principalmente en el rango que comprende de los 22 a 40 minutos; sin embargo en cormo fue entre los 10 a 20 y en la hoja hubo dos regiones, entre 10 a 20 y 25 a 40 minutos. Esta distribución indica que el tipo de modificaciones en estos compuestos depende del órgano. Por ejemplo los flavonoides en el cormo eluyeron a tiempos de menores tiempos de retención que en los otros órganos, lo que sugiere que podrían estar glicosilados como el caso de la QTRN, conjugado glicosilado de la QTN. Este tipo de comportamiento también podría corresponder a lo que sucede en la primera región de compuestos en hoja. Por otro lado, en raíz el tiempo de retención se mantiene en el rango de los compuestos libres, aunque el porcentaje de correlación espectral fue de entre 75 y 88%.

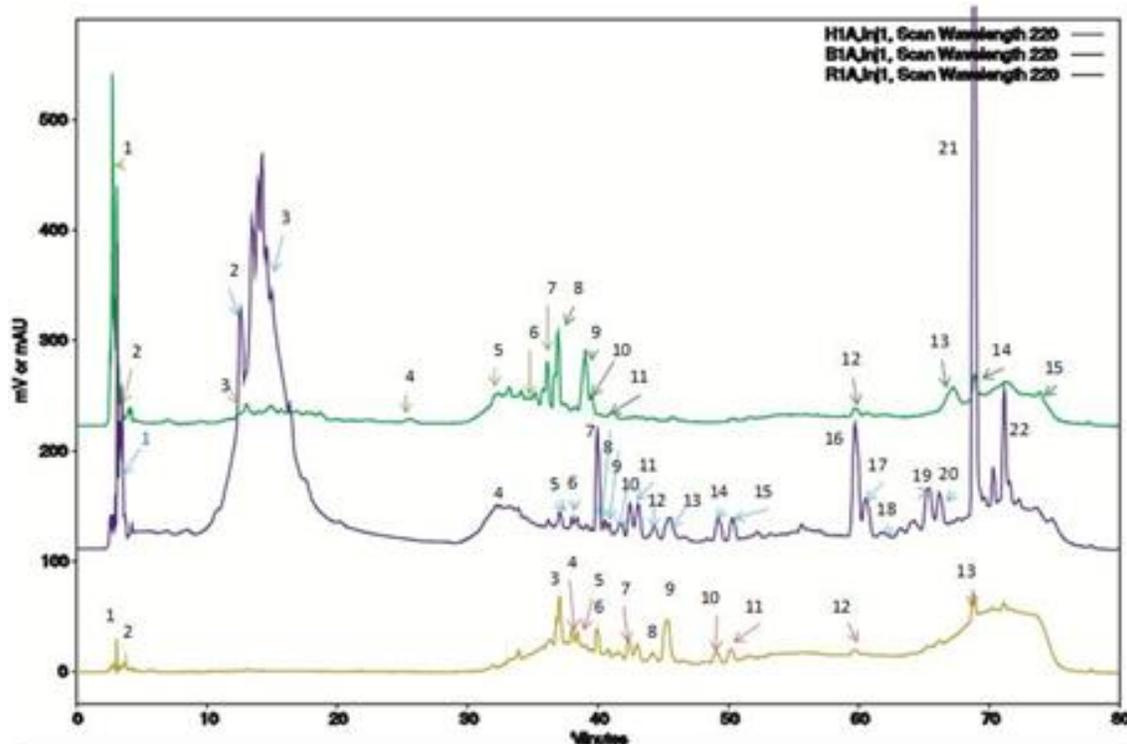
Dado que los resultados en estos perfiles no fueron comparables con los obtenidos en estudios previos (Rivera-Casado *et al.*, 2009, Anexo 1) se decidió implementar nuevas unidades experimentales de fitorremediación (UE2) utilizando macetas con

suelo contaminado pero no cultivado previamente (traído del sitio contaminado en Tabasco) y utilizando semillas de *Cyperus laxus* obtenidas de plantas crecidas bajo condiciones de invernadero para la fitorremediación de los suelos contaminados desde el año 2001 (UE1). A partir de los extractos metanólicos de plantas maduras de 14-17 semanas, crecidas en estas nuevas unidades experimentales, se obtuvieron los perfiles de compuestos fenólicos de los tres órganos principales de la planta (Figura 21; Tabla 5), donde interesantemente se pudieron observar cambios importantes en el tipo de compuestos fenólicos; por ejemplo la presencia de epicatequina y la presencia de flavonoides a tiempos de retención mayores al de los estándares, indicando la posible formación de éteres, ésteres o bien oligómeros de flavonoides.

Aunque el perfil de compuestos fenólicos de los órganos de *C. laxus* crecidos en UE1 y UE2 fue muy similar, sugiriendo la presencia de moléculas conjugadas de fenoles-HPA tanto a nivel de raíz, cormo y hoja (Figura 21, Tabla 5: 1R,2R, 12R, 13R, 6B, 9B, 10B, 16B, 18B, 20B, 8H, 11H, 12H, 13H), así como HPA libres como ANT y FNN en el tejido de raíz, y flavonoides como LUT y RUT en el tejido de hoja, definitivamente hubo cambios importantes respecto al tipo y distribución de éstos metabolitos. Por lo anterior, dado que los perfiles de UE1 y UE2 difieren de aquellos obtenidos en estudios previos, además de que se observaron desplazamientos de las poblaciones de especies vegetales a lo largo del tiempo: desde el año 2001 al 2012 (Anexo2), tanto en los sitios contaminados de Tabasco como en las macetas (tal es el caso de otras especies pioneras del sitio contaminado como *Cyperus esculentus* y *Ludwigia peploides* que fueron observadas desde su germinación, crecimiento y sobrevivencia bajo condiciones de invernadero y que posteriormente fueron desplazadas a los siete y nueve años respectivamente después de iniciado el experimento y que en su lugar prevaleció la población II de *Cyperus laxus*) se sugirió que todos estos cambios fueron consecuencia de una posible modificación

en el tipo y concentración de hidrocarburos del suelo por efecto del fitotratamiento realizado por estas especies vegetales en conjunto con la microbiota del suelo.

Es importante hacer notar que la presencia mayoritaria de flavonoides con menor poder antioxidante como la EPC y VITX en los extractos de UE2 en comparación con la QTN, QTRN, RUT y LUT en los perfiles de UE1 sugiere que las características del suelo donde estuvo creciendo *C. laxus* se fueron modificando con el tiempo, provocando un menor nivel de estrés para la planta lo que manifiesta de forma indirecta la disminución de la carga de hidrocarburo, y que a su vez estaría indicando una recuperación paulatina del suelo.



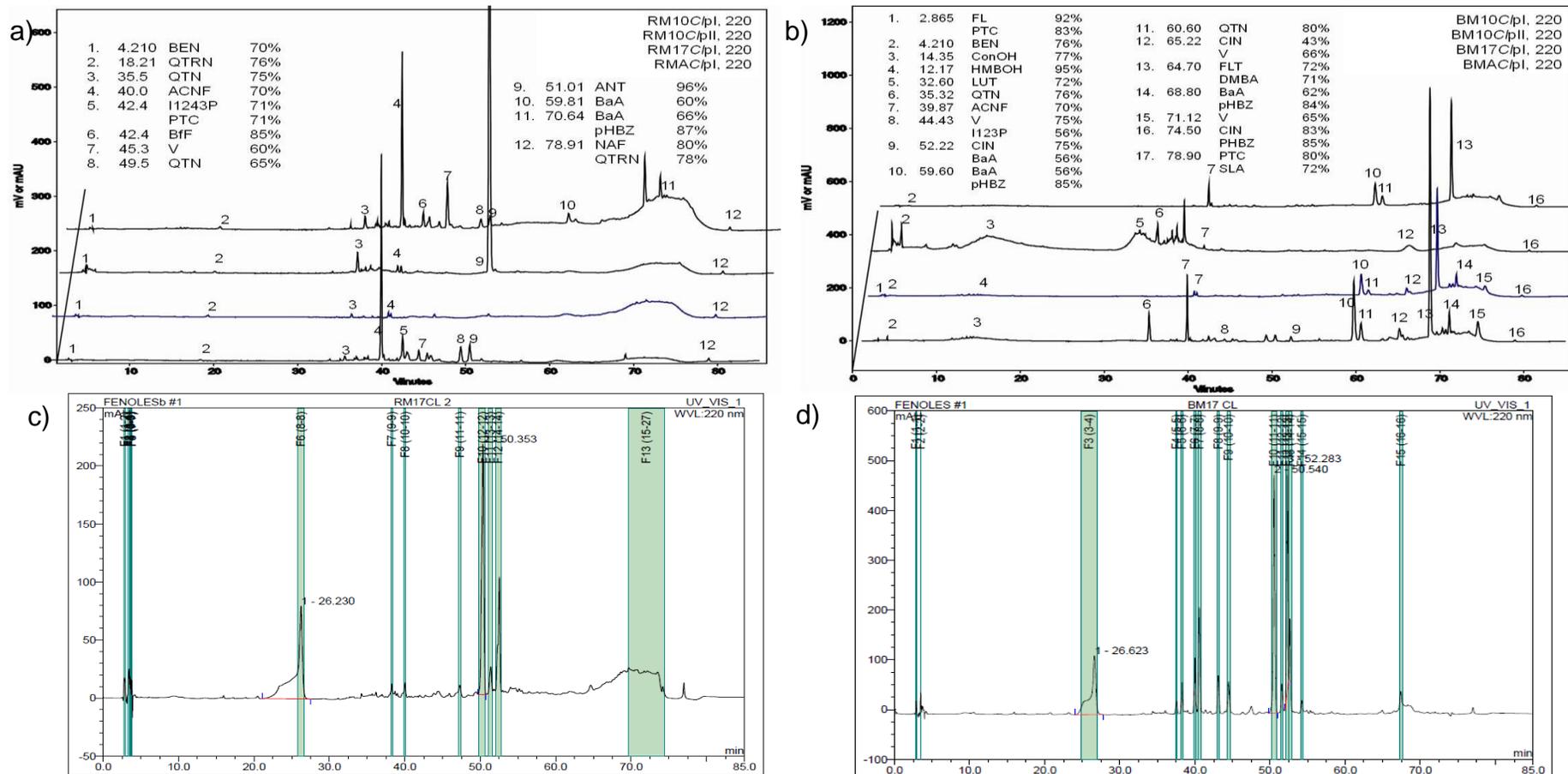
**Figura 21.** Perfil de compuestos fenólicos y flavonoides en los extractos de raíz, (R), Corno (B) y hoja (L) de plantas de *C. laxus* crecidas en UE2. La referencia numérica de cada uno de los compuestos se indica en la Tabla 6, indicando el tiempo de retención, así como el nombre del compuesto identificado y su respectivo % de correlación espectral respecto a la librería utilizada en el equipo HPLC RP UV

**Tabla 6.** Compuestos fenólicos detectados en raíz, (R),Cormo (B) y hoja (L) de plantas de *C. laxus* crecidos en UE2

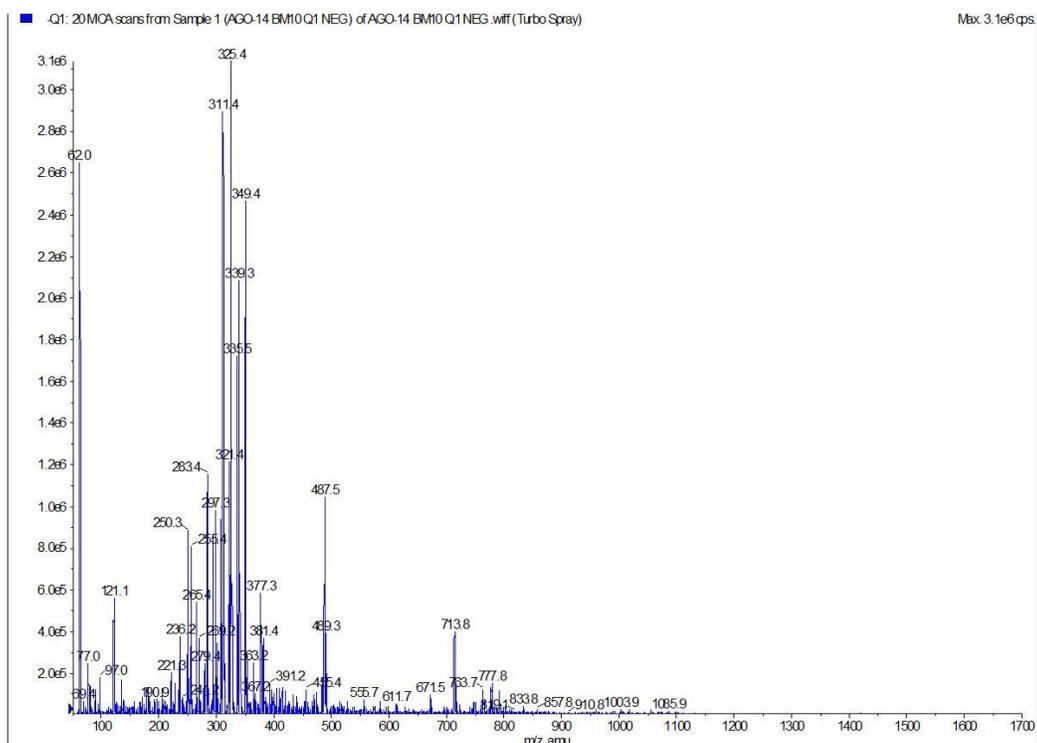
	R1A		%	B1A		%	H1A		%		
1.	3.008	ConOH	89	1.	3.49	EPC	94	1.	2.69	PTC	95
		QTN	88			SLA	86			ConOH	92
		FL	87	2.	12.57	EPC	95	2.	3.008	PTC	95
2.	3.98	IsvOH	88			SLA	87			ConOH	93
		VN	85	3.	14.78	EPC	90	3.	13.03	EPC	90
3.	37.21	EPC	92			PTC	82			PTC	87
		Phe	88	4.	32.59	EPC	92	4.	25.43	LUT	97
4.	38.01	EPC	90			SLA	86			RUT	96
		SLA	81	5.	37.03	COU	69	5.	32.11	EPC	97
5.	38.47	EPC	91			EPC	67			SLA	93
		QTN	85	6.	38.01	EPC	72	6.	35.29	EPC	89
6.	39.9	ACNF	70			PTC	72			SLA	83
		ACNFTY	62			FLT	67	7.	36.26	EPC	87
		VITX	52	7.	40.07	ACNF	73			SLA	84
7.	42.63	CRI	77			ACNFTY	62	8.	38.89	ConOH	92
		BghiP	75			VITX	42			VA	86
8.	44.2	V	72	8.	40.53	PTC	79			FL	85
		CAF+VA	67			ConOH	77	9.	38.95	ConOH	91
9.	45.32	V	63	9.	40.87	V	66			VA	87
		COU	49			CAF+VA	63			QTN	76
10.	49.3	pHBZ	57			FLT	60	10.	39.59	EPC	89
		COU	50	10.	41.82	V	67			PTC	88
11.	51.04	ANT	92			pHBZ	53			QTN	85
		FNN	58			I123p	47	11.	41.02	CIN	81
12.	59.64	pHBZ	84	11.	43.25	PTC	76			BaP	72
		CIN	77			ConOH	75	12.	59.78	pHBZ	86
		BaA	57			EPC	75			CIN	82
13.	68.83	pHBZ	84	12.	44.37	V	59			BaA	56
		CIN	82			pHBZ	55	13.	67.4	FLT	79
		BaA	71	13.	45.46	V	60			ConOH	78
						pHBZ	41				
				14.	49.12	V	64				
						pHBZ	64				
				15.	50.41	ConOH	65				
						VA	65				
				16.	59.79	pHBZ	85				
						CIN	76				
						BaA	58				
				17.	60.58	EPC	97				
						SLA	95				
				18.	61.7	BghiP	58				
						ACNF	43				
				19.	65.34	V	66				
						pHBZ	62				
				20.	65.83	BghiP	63				
						DMBA	56				
						FLT	53				
				21.	68.69	pHBZ	84				
						CIN	80				
						BaA	62				
				22.	71.07	ConOH	67				
						VA	65				

Por otro lado, con el objetivo de poder evidenciar la presencia de compuestos conjugados flavonoide-HPA identificados por RP-HPLC UV, el extracto metanólico de la muestra de raíz y cormo de *C. laxus* crecido en suelo con 141 000 ppm (muestra BM17, RM17 Figura 22 a,b) de UE1 obtenido en el 2008, se analizó nuevamente en el 2014 pero ahora en el HPLC RP-UV del LaNSE-Cinvestav (Figura 22 c,d RM17, BM17). Sin embargo, fue notable la diferencia en el perfil obtenido en ambas corridas, lo que sugiere una posible oxidación de los compuestos fenólicos durante el almacenamiento de la muestra.

Cabe mencionar que bajo los alcances del proyecto, a ninguna de estas fracciones se le estimó el peso molecular mediante la técnica de MS, sin embargo el extracto metanólico de cormo de *C. laxus* crecido en suelos con 325 000p ppm (S205) fue analizado mediante inyección directa en un equipo de espectrometría de masas, en donde (Figura 23) se observaron moléculas cuyos valores abarcan desde 100 hasta 1200 m/z (-), lo que sugiere que en este órgano de reserva pudieran estar presentes estructuras del tipo: flavonoides, coumarinas, fenilpropanoides, sesquiterpenos, quinonas, ácidos fenólicos y alcaloides, que concuerda con lo ya reportado para el género *Cyperus* crecidos en suelos libres de contaminación (Sayed *et al.*, 2008).



**Figura 22.** Cromatogramas de los compuestos fenólicos y flavonoides obtenidos en los sistemas de fitorremediación en el 2008 (a,b) y en el 2014 (c,d) para el extracto de raíz (RM17CI) y cormo (BM17CI). Para los estudios del 2014, se utilizó un equipo HPLC 3000 del LaNSE-Cinvestav donde fue posible coleccionar fracciones de cada uno de los picos de la corrida (franjas color verde en c y d) para posteriormente pudieran ser analizadas por inyección directa en el equipo de MS (QTRAP).



**Figura 23.** Muestra del extracto metanólico de bulbo crecido en el suelo S205 (BM10). Análisis MS en 3200 QTRAP inyección directa por electro spray en modo negativo.

Sin embargo, dada la complejidad de la muestra observada tanto en el análisis por HPLC como MS inyección directa, no fue posible definir la presencia de alguna molécula conjugada fenol/flavonoide con algún HPA. Para ello, hubiera sido necesario contar con mayor cantidad de extracto (>16µL/mg PF) para realizar la purificación de algún pico específico, así como contar con el equipo para realizar la separación previa a la inyección en el equipo MS, sin embargo ambas condiciones se mantuvieron lejos de los alcances del presente trabajo.

De esta forma, fueron evidentes los cambios en el perfil de compuestos fenólicos en tejidos de *C. laxus* a lo largo del tiempo. Aunque estos resultados estarían sugiriendo una recuperación paulatina del sitio aún quedan pendientes algunas interrogantes, como: qué estrategias metabólicas utiliza la planta para transformar el contaminante del suelo, cuál es la participación de la especie vegetal y de los

microorganismos de su rizósfera, será la misma estrategia metabólica para la mezcla de hidrocarburos o la presencia de uno en específico, entre otras.

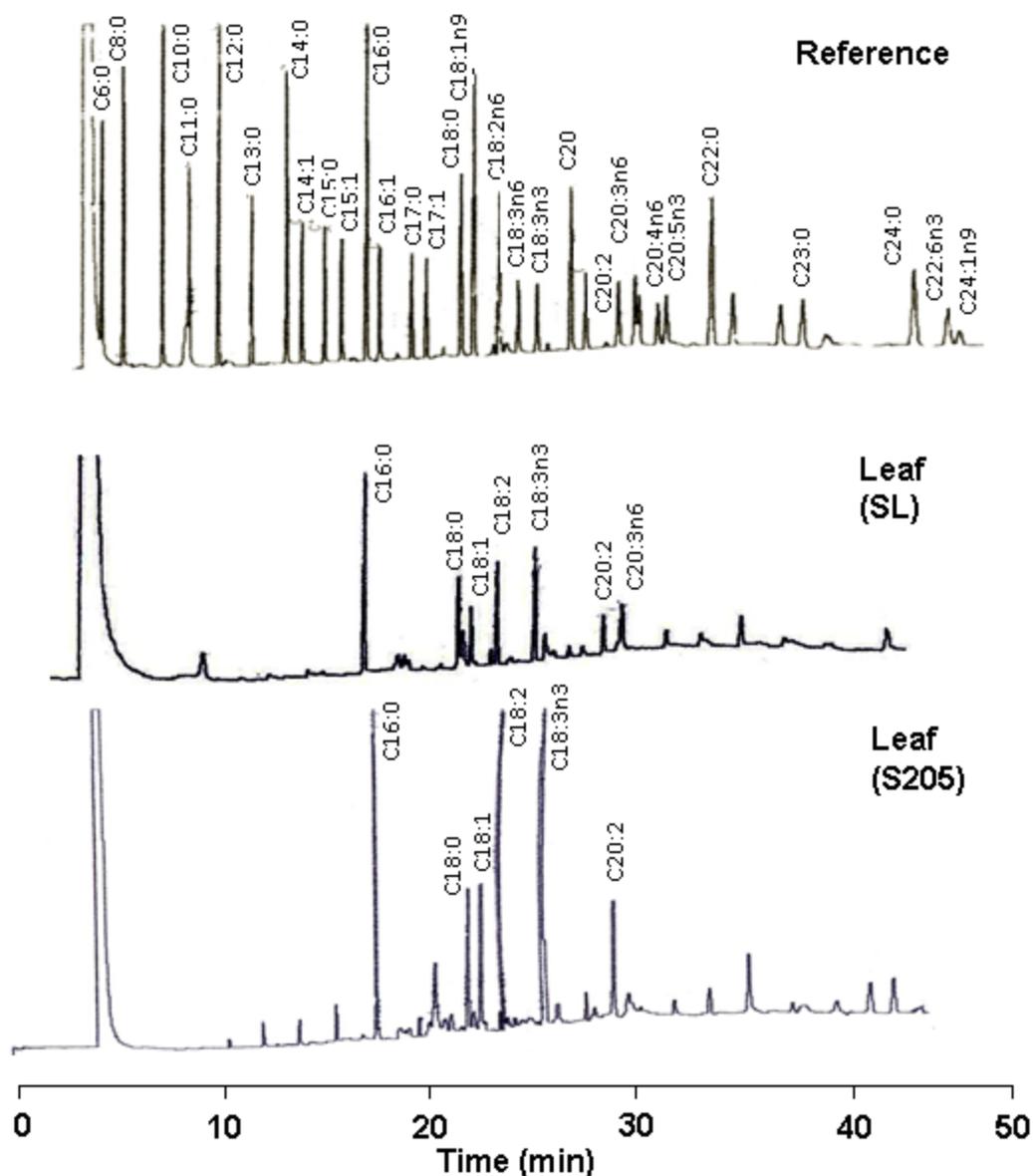
### **9.1.3 Perfil y contenido de ácidos grasos en plantas de *Cyperus laxus* usadas para fitorremediación en invernadero**

En seguimiento a las observaciones previas sobre los cambios en la composición de ácidos grasos en las plantas usadas para la fitorremediación de los suelos contaminados con respecto a las plantas crecidas en suelos no contaminados y considerando que los lípidos son parte importante en el desarrollo y estructura de las plantas, se analizaron los cambios en el contenido, tipo y distribución de los ácidos grasos en los órganos principales de las plantas sometidas a la presencia de hidrocarburo en relación a las plantas crecidas en suelos de sitios no contaminados.

#### **9.1.3.1 Crecimiento en Suelos no contaminados: *Cyperus laxus* es una planta C18:3**

El contenido de ácidos grasos en hoja, cormo y raíz de estas plantas fue de, 1.09, 4.46, y 0.31 mg AG/g PF respectivamente (Tabla 7), que en base al contenido de humedad de 77% para la hoja y 51% para el cormo y la raíz, corresponden a 4.8, 9.1, and 0.6 mg AG/g PS, respectivamente. Dado que no se encontraron reportes sobre el contenido de ácidos grasos en hoja ni en raíz de *C. laxus*, ni para otras especies de *Cyperus*, los resultados del presente estudio para esos órganos no pueden ser comparados con algún dato de la literatura. Sin embargo, para órganos de reserva como el cormo, el valor obtenido en este trabajo se encuentra por debajo de los límites reportados para órganos de reserva (tubérculo y cormos) de otras *Cyperaceas*, tales como *C. rotundus* (6 mg/g PS o *C. esculentus* (51-74 mg /g PS) los cuales usualmente se encuentran en el rango de 1 a 300 mg AG/g PS (Stoller & Weber, 1975; Ezeh *et al.*, 2014). Por otro lado, en la Figura 24 se muestra el perfil de ácidos grasos de los extractos lipídicos de hojas de plantas crecidas en suelos no contaminados (SL) y de plantas crecidas en sistemas de fitorremediación de suelo contaminado por petróleo crudo con hasta 340 g/Kg THC (S205). En las plantas del SL se observaron claramente nueve ácidos grasos con mayor

prevalencia de ácido palmítico (C16), octadecanoico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolénico (C18:3n3) y ácidos insaturados como (C20:2-C20:3). Sin embargo, para este extracto, fue notable la ausencia de C16:3. Esto concuerda con reportes para extractos de hoja de otras *Cyperaceas*, tales como *Carex sp.*(Bogucka-Kocka & Janyszek, 2010), *Cyperus alternifolius* (Mongrand *et al.*, 1998) y demostraría por primera vez, que *C. laxus* es una planta C18:3. Es decir, de acuerdo a la bioquímica vegetal, se conoce que en hojas o partes verdes de las plantas los ácidos grasos C16:0, C18:0 y C18:1 son parte de la ruta plastídica o procariota de la biosíntesis ácidos grasos, Una vez sintetizados, estos ácidos grasos pueden ser exportados al citoplasma e incorporados como lípidos al retículo endoplásmico donde se lleva a cabo la poli-insaturación y/o la elongación de los mismos a través de la ruta eucariótica de la síntesis de glicerolípidos (Mongrand *et al.*, 1998; Somerville *et al.*, 2000).



**Figura 24.** Perfil de ácidos grasos de los extractos lipídicos de hoja, parte aérea o follaje (Leaf) de plantas de *C. laxus*, cultivadas en suelo de sitios no contaminados del estado de Tabasco, presuntamente libre de hidrocarburos (SL), en comparación con el follaje de plantas usadas en sistemas de fitorremediación de suelo contaminados proveniente del sitio del pozo 205 (S205) con carga de hasta 340 g de HTP/Kg suelo. Para identificación de los compuestos se comparó con los tiempos de retención un estándar de 37 FAME SUPELCO

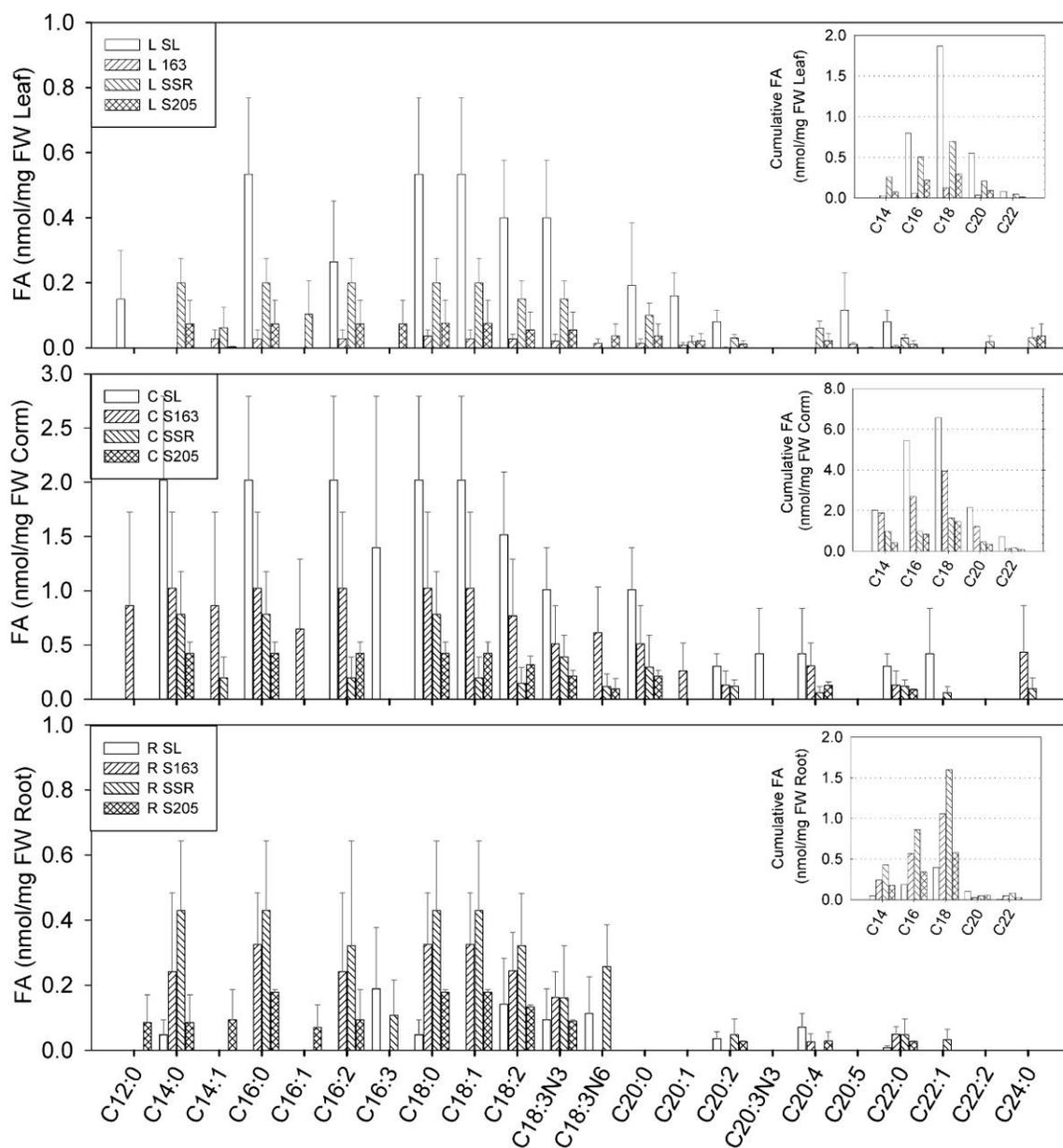
**Tabla 7.** Relación entre ácidos grasos saturados/insaturados y contenido total de ácidos grasos C12-C24 en los órganos de *Cyperus laxus* cultivados en sistemas de fitorremediación a partir de suelos con diferentes concentraciones de hidrocarburos provenientes de sitios intemperizados con petróleo crudo

<b>Suelo y contenido total de hidrocarburos (HTP g/Kg suelo)</b>												
Organo	SL (0)			S163 (16)			SSR(140)			S205(340)		
F=27.1	Statistic F 17.3			4.9			4.7			19		
	Sat/Unsat	Un	Total	Sat/Unsat	Un	Total (mg/g	Sat/Unsat	Un	Total	Sat/Unsat	Un	Total (mg/g
	(%)	(%)	(mg/g FW)	(%)	(%)	FW)	(%)	(%)	(mg/g FW)	(%)	(%)	FW)
<b>LEAF</b>	0.80	49.10	<b>1.09±0.02a</b>	0.50	49.63	<b>0.07±0.03c</b>	0.95	51.31	<b>0.51±0.04b</b>	0.81	53.55	<b>0.20±0.02c</b>
<b>F=6.6</b>			<b>a</b>			<b>a</b>			<b>a</b>			<b>a</b>
<b>CORM</b>	1.20	45.52	<b>4.46±0.20a</b>	1.20	45.53	<b>2.98±0.10b</b>	2.39	29.48	<b>1.17±0.06b</b>	1.70	37.09	<b>0.84±0.04c</b>
<b>F=6.5</b>			<b>b</b>			<b>b</b>			<b>a</b>			<b>b</b>
<b>ROOT</b>	1.04	55.58	<b>0.31±0.05a</b>	1.01	66.87	<b>0.55±0.00a</b>	0.94	51.67	<b>1.01±0.02b</b>	0.87	58.04	<b>0.35±0.01a</b>
<b>F=2.5</b>			<b>a</b>			<b>a</b>			<b>b</b>			<b>a</b>

Promedio del contenido de total de FAME ± desviación estándar. Los valores de F se obtuvieron a partir de un análisis ANOVA F-test usando un modelo anidado: Contenido(mg) FAME = Suelo + Organo + FAME. Las letras a,b,c a un costado del contenido total de FAME indica medias equivalentes en cuanto al contenido de FAME entre suelos (Scheffé test, p<0.05) y significativamente diferente al tratamiento control SL (Dunnett test, p<0.05). Las letras a, b debajo del valor de contenido total de FAME hacen referencia a las medias significativamente diferentes respecto a los órganos (Scheffé test, (p<0.05).

### **9.1.3.2 Crecimiento en Suelos de sitios contaminados: los hidrocarburos afectan negativamente el contenido de ácidos grasos en hoja y cormo pero positivamente en raíz**

El efecto del contenido de hidrocarburos totales sobre el perfil (Figura 25), cantidad (Tabla 7) y distribución de la cantidad acumulada de ácidos grasos agrupada con número de cadenas carbonadas (insertos en Figura 25) fue diferente para cada órgano. De acuerdo al perfil de ácidos grasos en hojas de plantas crecidas en suelos con 340 g/Kg THC, se observó la presencia de ácidos grasos poco comunes, tales como los de cadenas carbonadas impares (C15, C17, C21, C23) e insaturados como C20:3n6 and C20:4, además de un incremento generalizado notable de los de C22:2 and C24:0 en el cormo y en la hoja de las plantas crecidas en los sistemas de fitorremediación (Figura 25).



**Figura 25.** Contenido de ácidos grasos C12-C24:0 en raíz, cormo y hoja de *C. laxus* crecidos en sistemas de fitorremediación con suelos contaminados con carga de 16 g/Kg (S163), 140 g/Kg (SSR) y 340 g/Kg (S205) comparado con plantas crecidas en suelos de zonas urbanas considerados como sitios no impactados (SL). Los insertos indican el contenido acumulado de FAME respecto al número de carbonos tanto saturados como insaturados en cada órgano.

La presencia de C16:3 en cantidades bajas o su ausencia en el extracto de hoja es consistente con lo observado en las plantas control confirmando que *C. laxus* es una planta C18:3. Tal como se muestra en la Tabla 7, en plantas crecidas en los sistemas de fitorremediación, el contenido de ácido graso en la hoja y en el cormo fue afectado negativamente por el nivel de hidrocarburo, pero en contraste en el tejido de raíz, el efecto fue notablemente positivo para el contenido de HTP por debajo de 340 g/Kg suelo. Tal y como se mencionó anteriormente, no se encontraron reportes sobre el efecto de hidrocarburos en el perfil de ácidos grasos en Cyperaceas, sin embargo el efecto observado en el tejido de raíz es consistente con los reportes de cultivos monoaxénicos de *Cichorium intybus* crecidos en presencia de Benzo[a]pireno (Debiane et al, 2012) y también pudiera ser comparado con el efecto en plántulas de *Zea mayz* cultivadas en presencia de monoterpenos (Zunino & Zygodlo, 2005), donde se incrementa la cantidad de ácidos grasos totales después de la aplicación del xenobiótico/estrés. Sin embargo, los resultados para el cormo en el presente estudio contrastan con los estudios de Stoller and Weber (1974), donde se observó un incremento significativo en el contenido de ácidos grasos en los tubérculos de una variedad de *C. esculentus* tolerante al frío después de 6 semanas de exposición a la temperatura de 2°C

Como se esperaba en los resultados anteriores, la relación saturados/insaturados se vio afectada por la presencia de hidrocarburo en el sitio (Tabla 7). Para plantas crecidas en suelo no contaminado, la prevalencia entre ambas fracciones insaturadas y saturadas fue equivalente (50%) en la hoja, sin embargo, en la raíz, la fracción insaturada predominó (56%) con una ausencia de C16:2, pero con cantidades similares de C16:3 y C18:3. En contraste, en el cormo, la fracción insaturada tuvo una baja notable (45%) con un contenido similar de C16:3 y C18:0-C18:3. Estos resultados para cormo y hoja de *C. laxus* crecidos en suelos libres de contaminante contrasta con lo reportado en la composición de ácidos grasos en tubérculos (Arafat et al., 2009; Turesson et al., 2010; López-Cortés et al., 2013) y hojas (Stoller & Weber, 1975) de *C. esculentus*, que contienen una alta cantidad de ácidos grasos monoinsaturados con una baja cantidad de saturados: saturados/insaturados en tubérculos de 0.12 a 0.71, con ácido palmítico como

principal ácido saturado (15%) y ácidos oléico como ácido insaturado predominante (72%) y de 0.38 to 0.52 en hoja, con ácido palmítico como principal ácido saturado (30%) nuevamente, pero ahora con ácido linolénico como principal insaturado (50%).

Para *C. laxus* crecidos en suelos contaminados, la prevalencia de fracciones saturadas e insaturadas fue prácticamente semejante en hoja (50%) y en raíz, en la cual la fracción insaturada estuvo en un intervalo de 52% a 67%. En contraste, de manera similar en las observaciones para cormo de plantas control, la fracción saturada prevaleció, sin embargo en plantas crecidas en suelos contaminados, ésta fracción se incrementó notablemente por la presencia de hidrocarburo: desde 54% en plantas control hasta 70% en plantas crecidas en suelo con 140 g de HTP/Kg suelo. Como se esperaba, el perfil de ácidos grasos fue específico para cada órgano y se afectó notablemente por la presencia de hidrocarburos (Figura 25).

Fue evidente que la distribución de la cantidad de ácidos grasos C18 fue el grupo predominante en cada órgano (insertos, Figura 25). Sin embargo, el mayor contenido en cadenas C18 fue resultado de cantidades elevadas y similares de C18:0, C18:1 y C18:2 y C18:3n3 en conjunto con una baja o nula presencia de C16:1, C16:2 y C16:3. Por ejemplo, en las hojas de las plantas control (Figura 25, SL) la cantidad y perfil de cadenas cortas de ácidos grasos (C12-C14) fue comúnmente baja en comparación con el promedio de las cadenas C16-C18. Sin embargo, en cormo y raíz, la cantidad de C12-C14 fue similar a la cantidad de C16. Interesantemente, la presencia de hidrocarburos (S163, SSR, and S205) provocaron un incremento en el valor de ácidos grasos de cadena corta en hoja y raíz, sin embargo, en el cormo se observó una disminución general en la cantidad de ácidos grasos. Así, aunque el perfil de ácidos grasos en cada órgano fue similar entre plantas cultivadas en el mismo tratamiento, la presencia de hidrocarburos afectó el contenido de ciertos ácidos grasos en el órgano. Este efecto fue particularmente evidente en los ácidos grasos de hoja, reduciendo el contenido del grupo C14-C20 en más del 50%. En contraste, el contenido de ácidos grasos en la raíz se incrementó notablemente con la presencia de hidrocarburos (Tabla 7), incluyendo ácidos grasos de cadenas C20:2, C22:0 y C22:1, principalmente en suelos con alto

contenido de HTP (Figura 24-25). Adicionalmente a los ácidos grasos comunes, la presencia de pequeñas cantidades de ácidos grasos poco comunes como impares o con mayor número de insaturaciones en raíz y hoja de las plantas crecidas en los sistemas de fitorremediación fueron detectados en los cromatogramas (Figura 24), pero no fueron correctamente identificados. En resumen, el contenido de ácidos grasos en los órganos de la planta control disminuyen en orden de cormo>hoja>raíz, sin embargo para plantas crecidas en sitios contaminados el orden fue de cormo>raíz>hoja.

Estos resultados implican que los cambios observados en el perfil de ácidos grasos dependieron tanto de la cantidad de hidrocarburos como de la habilidad de *C. laxus* para adaptar el metabolismo lipídico de las células de cada órgano en respuesta a los cambios ambientales, tal como ha sido reportado para otras especies vegetales crecidas bajo otras condiciones de estrés (Kolattukudy, 1970; Kroumova *et al.*, 1994).

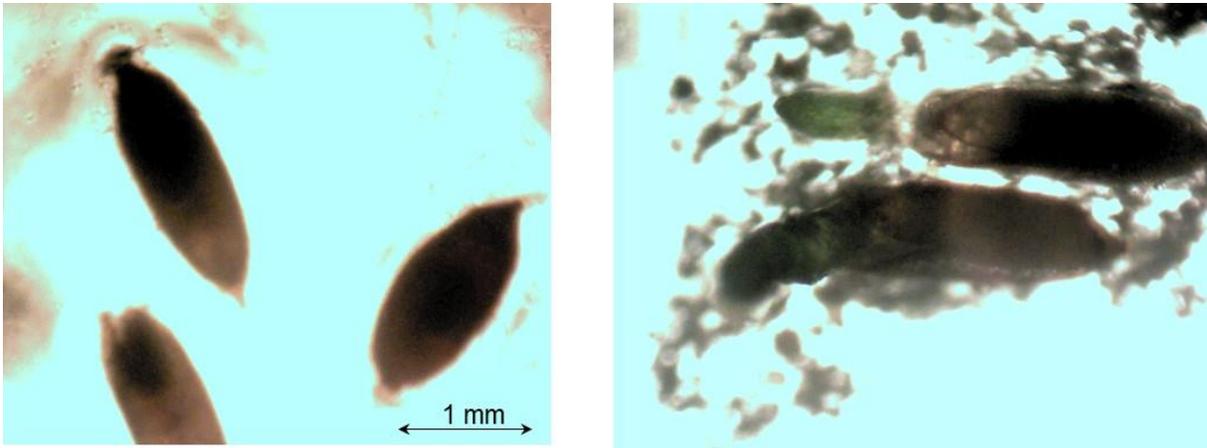
## **9.2 Investigaciones con cultivos *in vitro* de *Cyperus laxus***

Las investigaciones anteriores con plantas crecidas en invernadero dio lugar a considerar que la propagación de *C. laxus in vitro* podría contribuir a establecer sistemas experimentales estables donde se podrá controlar la cantidad y tipo de xenobiótico a estudiar, de tal forma que se pudiera observar la participación única del metabolismo vegetal en el proceso de fitorremediación y así tratar de explicar los cambios observados en los perfiles metabólicos a nivel de fenoles y ácidos grasos observados en los sistemas de fitorremediación.

### **9.2.1 Establecimiento y propagación de plantas de *Cyperus laxus in vitro***

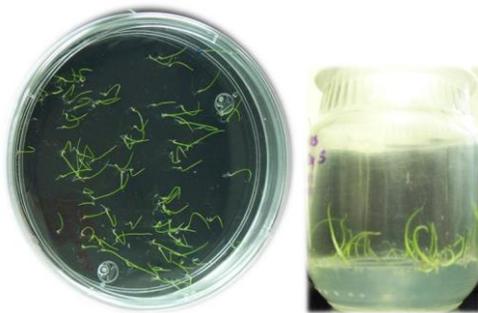
Los primeros ensayos para la implementación del cultivo *in vitro* de *C. laxus* se trabajaron a partir de explantes de raíz, cormo, raíz-cormo y raíz-cormo-hoja de plántulas jóvenes crecidas en invernadero de acuerdo a la metodología que describe (Weng *et al.*, 2004), sin embargo estos ensayos no tuvieron éxito y se procedió a establecer los cultivos *in vitro* a partir de semillas de plantas maduras de *Cyperus laxus* crecidas en los sistemas de fitorremediación (Figura 26).

Antes del proceso de desinfestación, se decidió ensayar la presencia de algunos agentes oxidantes, antimicóticos y bactericidas que pudieran ayudar a mejorar el porcentaje de germinación sin contaminación, puesto que en ensayos previos durante los estudios de maestría se tenía el problema de baja eficiencia de germinación en conjunto con la contaminación por hongo de todos los tratamientos. Se realizaron ensayos utilizando soluciones de 1g/L de  $\text{KMnO}_4$ , 100 mg/L de Kanamicina y 270 $\mu\text{L/L}$  de cloro en 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ estéril usando agua miliQ estéril como control. Estas soluciones se utilizaron previas a la desinfestación durante el proceso de hidratación de las semillas.



**Figura 26.** .Micrografía 40x de semillas de *C.laxus* desinfestadas y puestas en placa con medio sintético MS (izquierda). La presencia del cotiledón indicaba que la germinación se había llevado a cabo (derecha) generalmente a los 7 días después de la desinfestación y bajo condiciones de oscuridad.

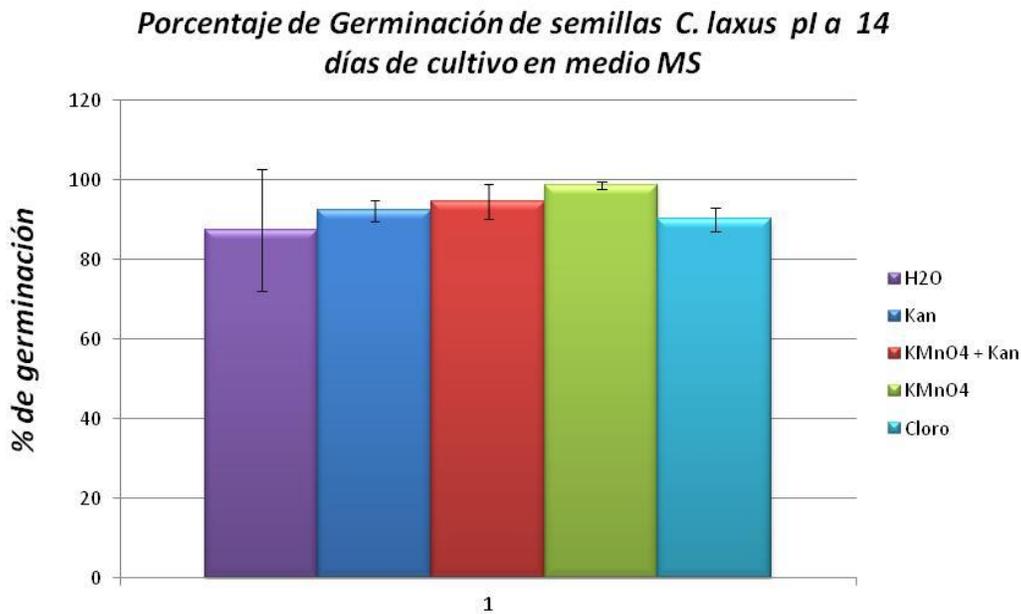
Entre el quinto y séptimo día después de la germinación, se observó la formación de radícula y a partir del día nueve el crecimiento del tallo alcanzó entre los 0.8 y 0.9 cm. El día 14 se realizó el paso de caja petri a frasco conteniendo medio MS. A los 22 días, el crecimiento del tallo alcanzó de 1.5 hasta 2.0 cm y el de raíz 0.5 cm. (Figura 27).



**Figura 27.** Germinación y crecimiento de plántulas de *Cyperus laxus pl* en medio MS. En placa y en frasco

A partir de los resultados de la germinación en caja petri, se observó que no hay diferencia significativa en el porcentaje de germinación utilizando cualquiera de las

cuatro soluciones respecto al uso de H<sub>2</sub>O miliQ como procedimiento previo de la desinfección (Figura 28).



**Figura 28.** Eficiencia de germinación de semillas de *C. laxus* sometidos a cuatro tratamientos diferentes previos a la desinfección

Bajo estas condiciones de trabajo fue posible generar cultivos *in vitro* de *C. laxus* de diferentes edades y en cantidad suficiente para los ensayos necesarios durante el desarrollo de este proyecto, así como se han podido mantener cultivos viables de hasta 3.5 años (Figura 29).



**Figura 29.** Plantas de *C. laxus* crecidas *in vitro* en medio MS. A las 5 semanas de la germinación (izquierda) y a 3.5 años (derecha).

Con el fin de comparar los resultados obtenidos en plantas cultivadas en invernadero con suelos contaminados con altas concentraciones de HTP, también se realizó el análisis de los compuestos fenólicos y ácidos grasos de los tres órganos principales de *C. laxus* cultivadas *in vitro*, tanto en ausencia como en presencia de diferentes concentraciones de fenantreno usado como hidrocarburo poliaromático modelo.

### **9.2.2 Efecto del FNN sobre el Perfil de compuestos fenólicos en plantas de *Cyperus laxus*: Formación de conjugados flavonoides-FNN**

En el caso de la plantas control sin FNN (R0 y H0), el perfil de compuestos fenólicos de raíz-cormo y hoja evidenció la presencia de metabolitos como ácidos benzoicos del tipo hidroximetoxi; flavonoides principalmente quercetina (QTN) y quercetrina (QTRN) y compuestos con estructuras parecidas a los HPA como el acenaftileno (Figura 30), aunque estos últimos en un porcentaje muy bajo, por lo que su presencia pudiera estar relacionada con sustancias naturales como los reguladores de crecimiento vegetal o metabolitos secundarios propios de las plantas.



**Figura 30.** Perfil de compuestos fenólicos en la parte subterránea (R = raíz-cormo) y aéreo follaje (H) de *C. laxus* crecidas *in vitro* en medio MS adicionado con 0-50 g FNN/L. Se representan en código de colores los compuestos identificados en las diferentes muestras de acuerdo al tiempo de retención (TR). El número al interior de cada cuadro de color indica el % de correlación espectral UV respecto a los estándares. NAF = naftaleno; FL=fluoreno; FLT=fluoranteno, ACNFTY= acenaftileno, ANT=antraceno; FNN=fenantreno, i123P=indeno-1,2,3-perileno; BaA=venzo(a)antraceno; QTN=quercetina; QTRN= quercetrina, LUT=luteína; CRY=crisina, DMBA=ácido dimetoxibenzóico; pHBA= ácido p-hidroxibenzóico; PTC=ácido protocatecoico; ConOH=alcohol coniferílico; VA= ácido vainillínico; VN=vainillín amina

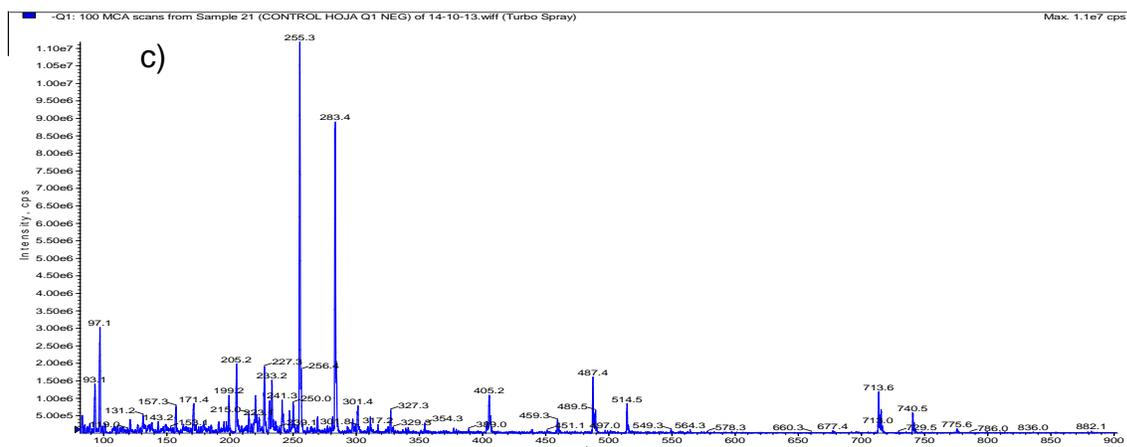
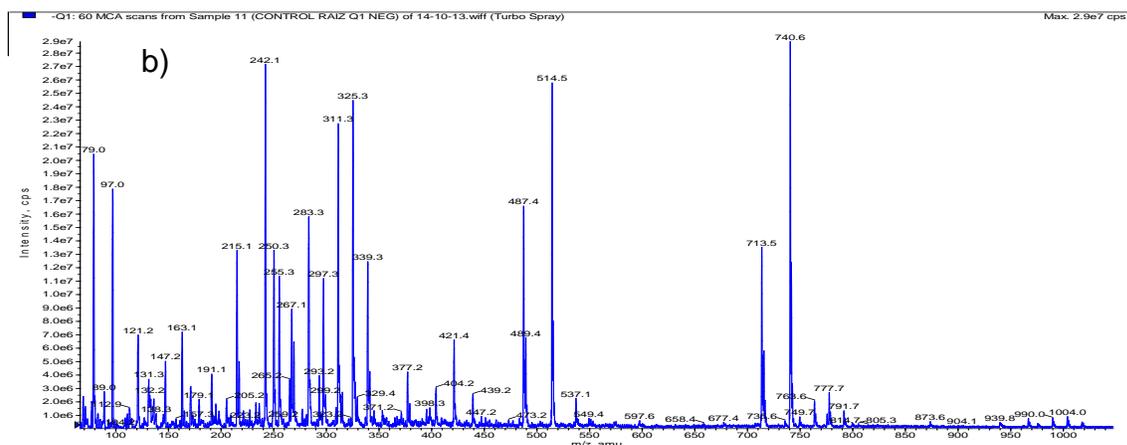
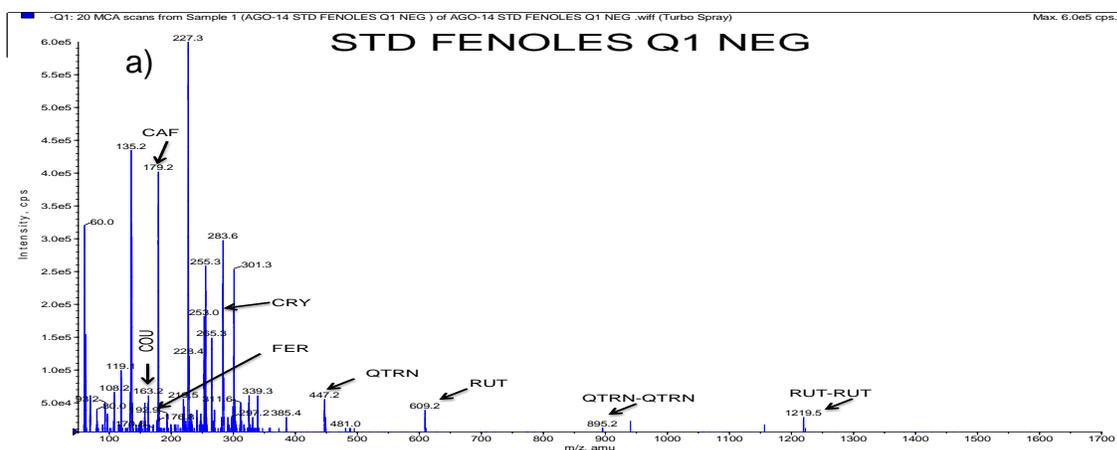
Como se puede observar, la diferencia entre el perfil de fenoles en las plantas crecidas en ausencia de fenantreno FNN(0) fue principalmente en el tipo de ácido benzoico presente. Mientras en los órganos subterráneos (R) dominó el alcohol

vainillínico (HMBOH), en el follaje (H) dominó el ácido vainillínico y el ácido protocatecólico. Sin embargo, en los órganos de las plantas crecidas en presencia de FNN, tanto en R como en H, fue notable la presencia de fenoles del grupo de los flavonoides, como la QTRN y QTN; los cuales por análisis espectral UV produjeron una correlación del 74-92% con compuestos de referencia. De esta forma, la presencia del hidrocarburo afectó substancialmente el perfil de compuestos fenólicos. Por otro lado, en H de las plantas control (FNN =0) se detectaron cantidades pequeñas compuestos que son presuntamente conjugados naftaleno-ácido protocatecólico (NAF-PTC) y Fluoranteno-Alcohol vainillínico (FLT-HMBOH); sin embargo, en H de las plantas crecidas en presencia de FNN se detectó una variedad de compuestos conjugados mucho mayor y a concentraciones mayores. Entre estos posibles conjugados figuraron: NAF-DMBA, FNN-pHBA, i123P-ConOH, ACNFTY-VN, FL-QTN, FLT-SLA, ACNF-DMBA, NAF-ConOH. Estos resultados indican que la presencia de FNN promueve la síntesis de QTN y QTRN tanto en H como R, favoreciendo la formación de conjugados de estos flavonoides con el hidrocarburo. Por consiguiente soportan la hipótesis de que este tipo de reacciones de conjugación entre los metabolitos de origen vegetal y los hidrocarburos poliaromáticos podría ser un mecanismo involucrado en los procesos de fitorremoción de este tipo de xenobióticos por *Cyperus laxus*.

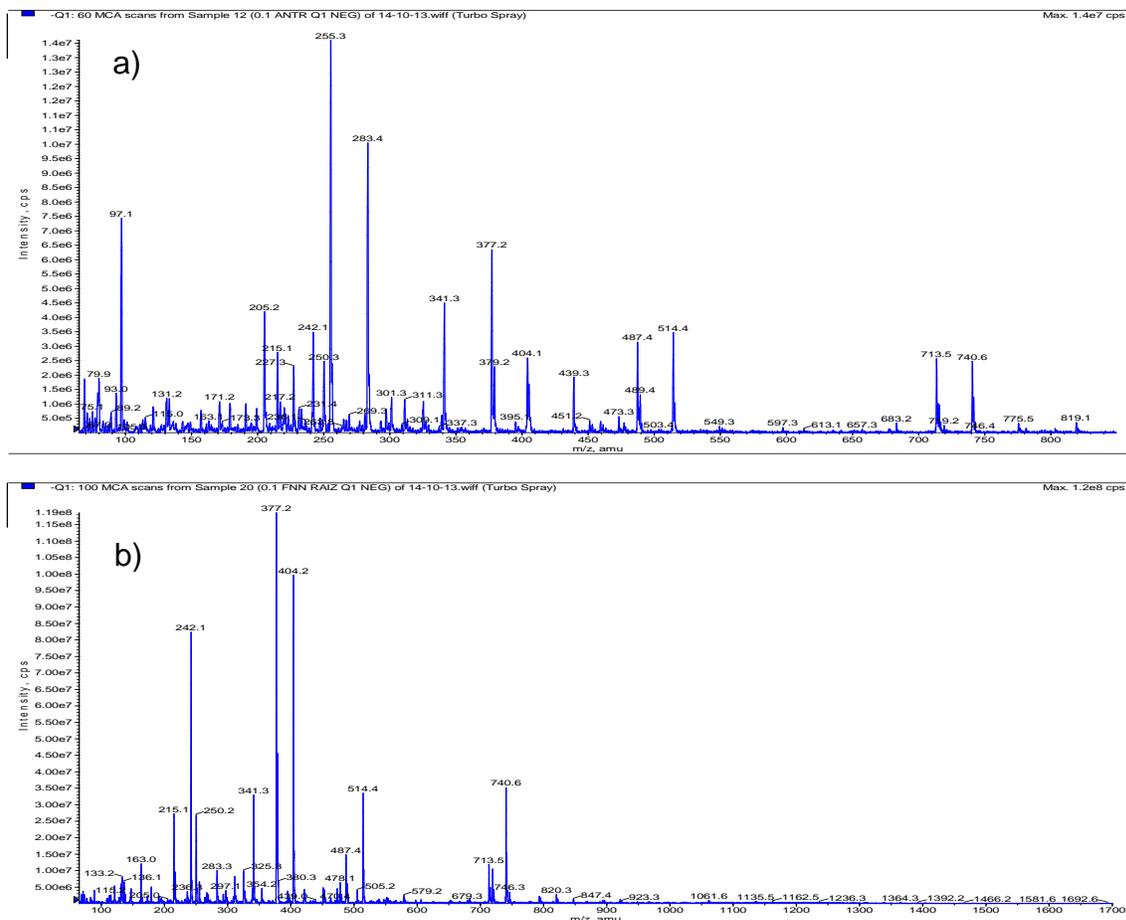
El análisis por cromatografía de LC-MS/MS de extractos metanólicos de raíz-cormo, y de hoja de plantas de *C. laxus* de 21 días de edad crecidas *in vitro* en medio MS, utilizando compuestos estándar como referencia para dicho análisis (Figura 31), revelaron la presencia de compuestos putativos del tipo de azúcares, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos. Y una disminución de los mismos en órganos de plantas crecidas *in vitro* en presencia de 0.1M FNN o 0.1M ANT (Figura 32a,32b). Estos resultados sugieren que la presencia del hidrocarburo promueve la disminución en la síntesis de ciertos metabolitos vegetales como ácidos orgánicos y compuestos fenólicos presentes en el tejido de raíz-cormo en comparación con los tejidos de la planta control (Figura 32 vs Figura 31). Sin embargo se observa un incremento notable en la intensidad de aquellas moléculas comprendidas entre 300 – 550 m/z tanto para los extractos obtenidos de tejidos de plantas crecidas en

antraceno como en fenantreno, además de la aparición de un pico de 341.3 m/z en ambas muestras.

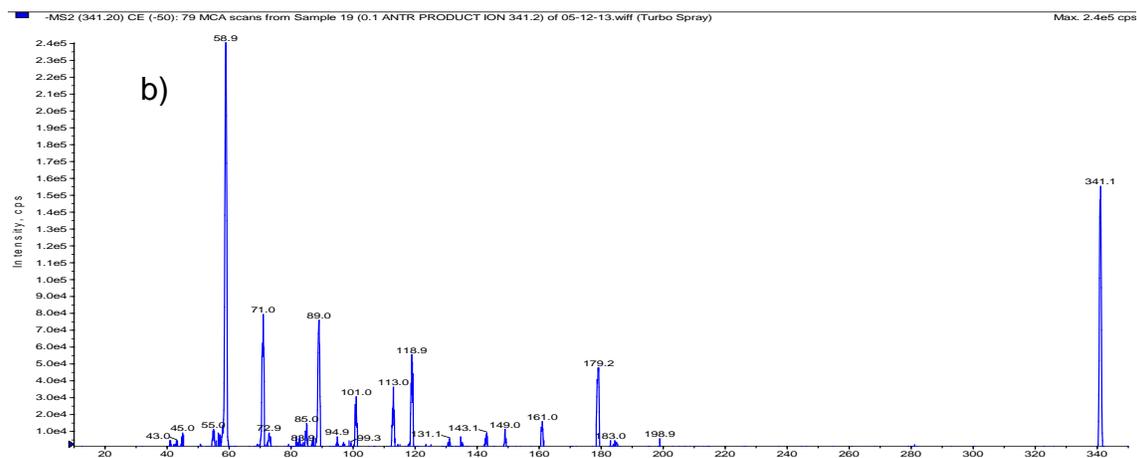
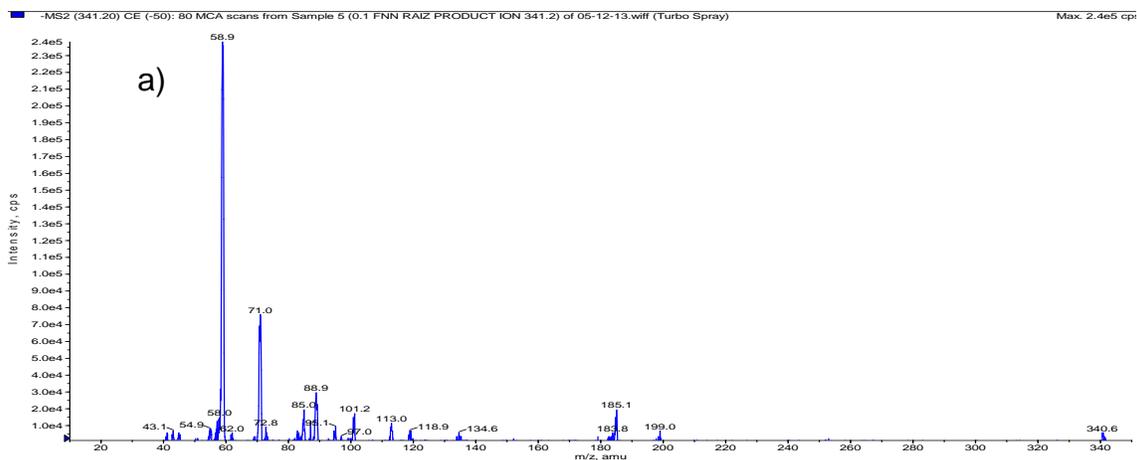
El patrón de fragmentación de ese pico 341 m/z (Figura 33b) para las muestras de la raíz de las plantas crecidas en presencia de fenantreno fue diferente al detectado en las muestras de raíz de plantas crecidas en presencia de antraceno (Figura 33a), lo que indica que se trata de moléculas distintas, aunque con pesos moleculares semejantes; aunque no se llegó a una identificación completa, con base en estos datos, dado el patrón de fragmentación de la molécula 341 m/z mostrado para el extracto metanólico raíz-cormo de las plantas crecidas en 0.1M de antraceno, donde el segundo pico mayoritario es de 179 m/z, pareciera corresponder a la molécula cafeoil- $\beta$ -D-glucósido como lo reportado para alfalfa y especificado como monómero de lignina en dichos tejidos (Guo *et al.*, 2001), lo que pudiera sugerir que la presencia del hidrocarburo en el medio de cultivo promueve la síntesis de algunas moléculas presentes en las capas externas de la planta con el fin de proteger la integridad de la misma. Para el caso de la molécula de 341m/z presente en el extracto de raíz-cormo de las plantas sometidas a fenantreno, aún faltaría realizar estudios por RMN para conocer con certeza la estructura.



**Figura 31.** Cromatogramas de masas de una mezcla de compuestos fenólicos estándar (a), y de extractos metanólicos de raíz-cormo (b), y de hoja (c) de plantas de *C. laxus* de 21 días de edad crecidas *in vitro* en medio MS. Las muestras se analizaron por inyección directa a un equipo LC-MS/MS 3200 QTRAP y se ionizaron por electrospray en modo negativo.



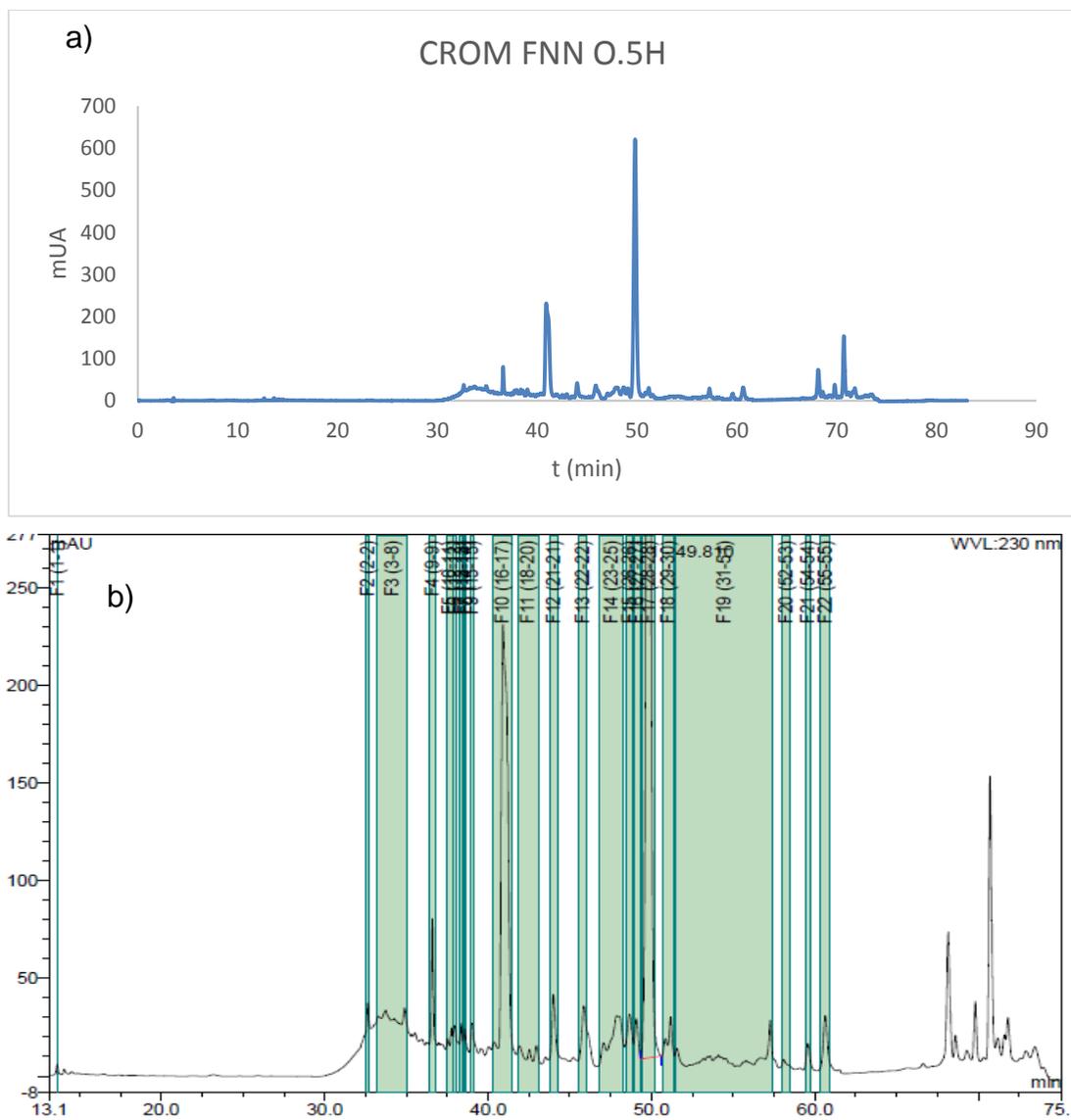
**Figura 32.** Cromatogramas de masas de extractos metanólicos de raíz-corno de plantas de *C. laxus* de 21 días de edad crecidas *in vitro* en medio MS suplementado con 0.1 mM de antraceno (a) o con 0.1 mM de fenantreno (b). Las muestras se analizaron por inyección directa a un equipo LC-MS/MS 3200 QTRAP y se ionizaron y por electrospray en modo negativo.



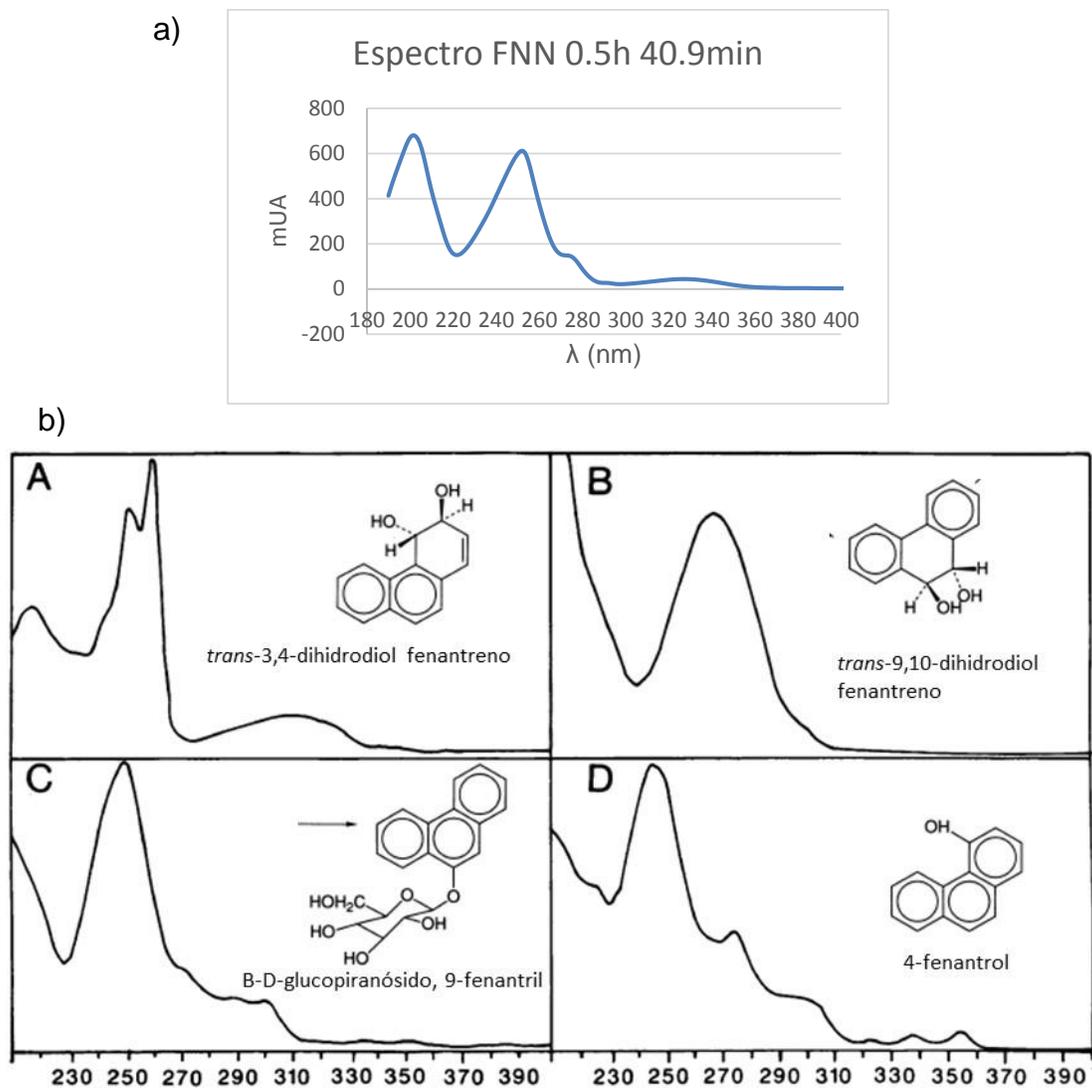
**Figura 33.** Fragmentación del pico 341 m/z observado en el cromatograma de masas de extractos metanólicos de raíz de plantas de *C. laxus* de 21 días de edad crecidas *in vitro* en medio MS suplementado con 0.1 mM de fenantreno (a) o con 0.1 mM de antraceno (b).

Ahora bien, las fases clorofórmicas de raíz-cormo y de hoja de *C. laxus* germinados y crecidos en presencia de 0.5mM de fenantreno, fueron evaluadas en el HPLC3000 del Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (CINVESTAV) donde se observaron espectros de absorción presuntamente de metabolitos de oxidación del FNN, tal y como lo reportó Morales-Navarro et al. (2014). Un ejemplo de ello fue la fracción 4 (TR = 36.6min) y fracción 11 (TR = 40.39min) de tejido de hoja (Figura 34, Figura 35). Esta fracción se analizó también en LC-MS/MS. Los resultados sugieren que en el metabolismo vegetal se llevan a cabo procesos de

transformación del fenantreno mediante la oxidación del mismo sin que hasta el momento se tenga la certeza si se éstas reacciones son promovidas por enzimas, por algún mediador o por la interacción entre ambos.



**Figura 34.** Cromatogramas a 230nm del extracto clorofórmico de la hoja de *C. laxus* crecida *in vitro* en medio sintético MS + 0.5mM de FNN (3 semanas a partir de la desinfestación). Imágenes obtenida del equipo HPLC 3000 Dionex LaNSE-Cinvestav. La figura b, muestra en verde las fracciones que se colectaron a partir de cada uno de los picos del cromatograma (F0 a F22)



**Figura 35. a)** Espectro de adsorción de la fracción 11 (tiempo de retención = 40.9min) del extracto de hoja de *C.laxus* crecida *in vitro* en medio sintético MS + 0.5mM de FNN (3 semanas a partir de la desinfestación). Imagen obtenida del equipo HPLC 3000 Dionex LaNSE-Cinvestav. **b)** Espectro de adsorción de los metabolitos de oxidación del fenantreno producidos por *Phanerochaete Chrysosporium* (Sutherland *et al.*, 1991)

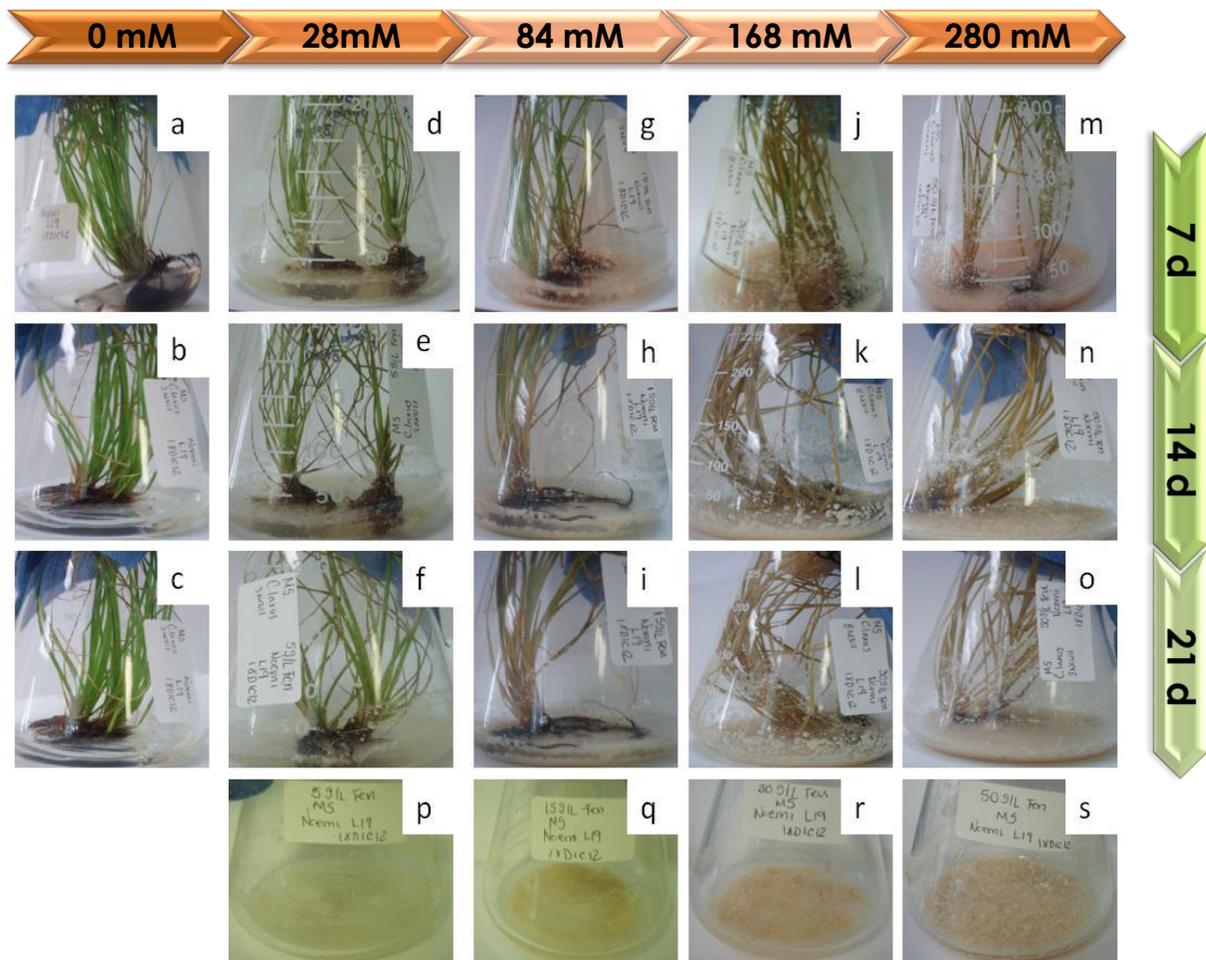
Por otro lado, Morales-Navarro *et al.*, (2014) reportó los cambios en los perfiles de compuestos fenólicos durante las primeras semanas de vida de la planta cuando ésta fue cultivada *in vitro* y germinada bajo la presencia de diferentes concentraciones de antraceno, fenantreno y queroseno, evidenciando, por un lado,

la presencia de fenilpropanoides del tipo metoxibenzoicos, flavonoides como quercetina, quercetrina, epicatequina y posibles moléculas conjugadas fenol-HPA como FNN-dimetoxibenzoato y FNN-p-hidroxibenzoato. Por otro lado, aunque no fueron corroboradas por otras técnicas, se observaron indicios de la presencia de moléculas tales como fenantreno trans 3,4 dihidrodiol y 9-fenantril-glucopiranosido, similares a las reportadas para la oxidación del fenantreno en sistemas de biorremediación con hongos (Sutherland *et al.*, 1991).

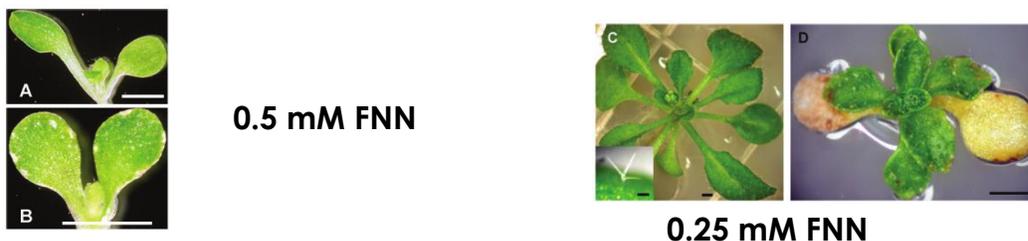
### **9.2.3 Efecto del FNN sobre el desarrollo de plantas de *C. laxus* crecidas *in vitro*. Transporte y catabolismo de FNN**

Por otro lado, la evaluación de características morfológicas así como el perfil de ácidos grasos y metabolitos presentes en los diversos órganos de *C. laxus* bajo la presencia de FNN, se realizó en cultivos *in vitro* incorporando de 0 a 50 g/L FNN (0mM a 280mM) del hidrocarburo al medio MS. Se utilizaron plantas de un año de vida crecidas *in vitro* en medio MS, donde era evidente la presencia de tejido radical, cormo y tejido foliar con 2-4 cm, 1 cm y 12-15 cm de longitud respectivamente. Estas plantas fueron sometidas a la presencia del hidrocarburo durante 21 días. Bajo la presencia de fenantreno, se observaron cambios importantes en el tejido foliar a partir del séptimo día (Figura 36). Fue evidente la clorosis a concentraciones de 30g/L y 50 g/L del hidrocarburo. Mientras que en el tratamiento de 15gFNN/L se observó este fenómeno a partir de los 14 días y en el de 5gFNN/L una clorosis ligera a los 21 días.

La pérdida de coloración en las hojas también ha sido reportado para *Arabidopsis* expuesta a concentraciones de fenantreno de 0.05 mM donde la clorosis fue evidente a partir de las 6h de haber sometido la planta al PAH (Figura 37) , lo cual pudiera estar relacionado con el aumento de especies reactivas de oxígeno en el tejido como consecuencia de la presencia del xenobiótico en el medio, ya que se ha reportado que la toxicidad del PAH disminuye la actividad del metabolismo vegetal dañando a nivel de membrana celular lo que reduce el transporte de nutrientes y metabolitos a la célula (Alkio *et al.*, 2005).



**Figura 36.** Sistema *in vitro* de *Cyperus laxus pl* cultivado en medio MS con fenantreno a los 7, 14 y 21 días de tratamiento [0mM FNN\* a, b, c; [28mM FNN] d, e,f; [84mM FNN] g, h, i; [168mM FNN] j,k, l; [280mM de FNN] m, n, o. Figura 1(p,q,r,s) corresponde a FNN + medio MS a diferentes concentraciones de FNN como control abiótico



**Figura 37.** Cambios fisiológicos de *Arabidopsis thaliana* germinada en medio MS y crecida en 0.5mM y 0.25 mM de FNN. La clorosis como respuesta a la presencia de FNN fue evidente a partir de las 6h después de haber iniciado el tratamiento (tomado de Alkio *et al.*, 2005)

Los cambios en la fenología de *C. laxus* estuvieron relacionados con la concentración del hidrocarburo presente en los tejidos, siendo mayor en tejido de raíz y hoja con hasta 160 y 100 µg de FNN por g de biomasa fresca respectivamente (Tabla 8).

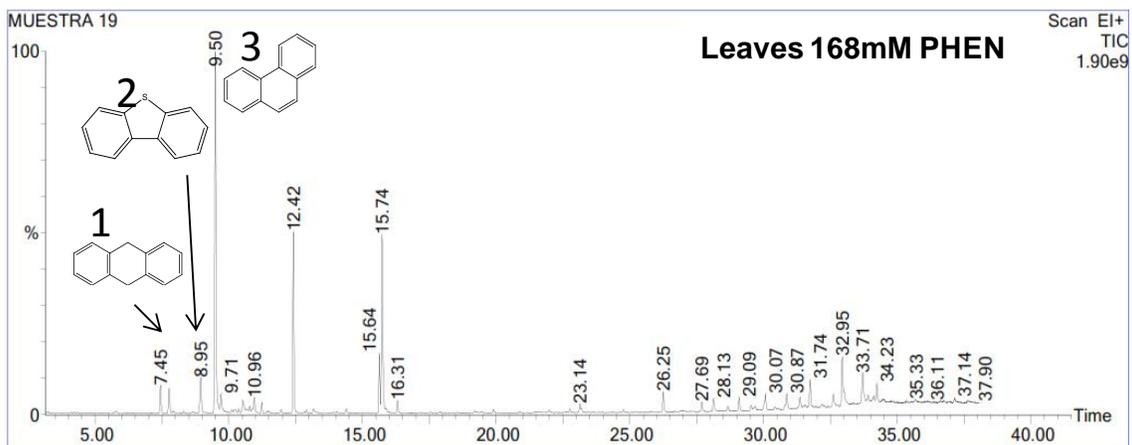
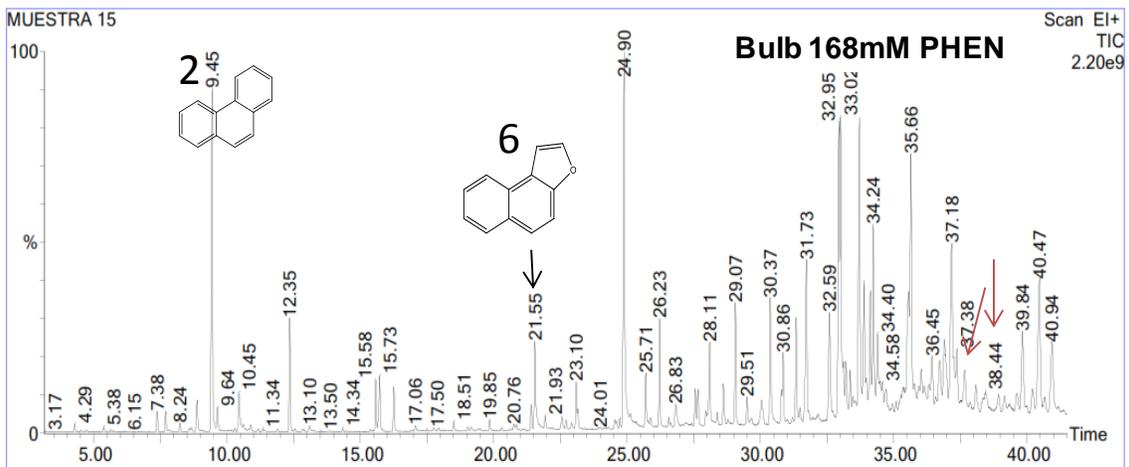
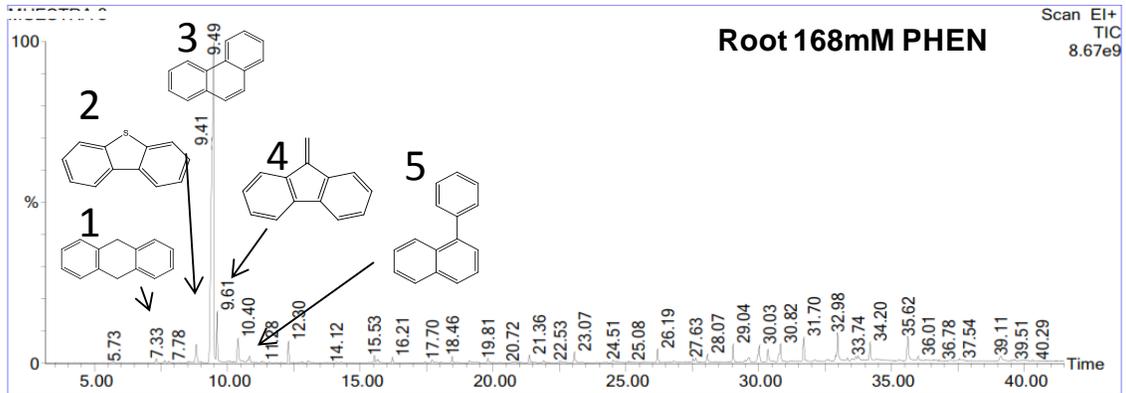
Fue notable el incremento de la concentración de FNN en los órganos de *C. laxus* conforme se incrementaba la concentración de FNN en el medio, a excepción del tratamiento de 50 g FNN/L donde la cantidad de FNN acumulado en tejido fue menor que lo cuantificado para el tratamiento de 30 g/L. Estos resultados estuvieron relacionados con la cantidad de hidrocarburo removido del medio de cultivo, ya que el porcentaje de remoción más alto se presentó igualmente para el tratamiento de 30g FNN/L con hasta 69% en contraste con un 10% para el tratamiento de 50gFNN/L, lo que sugiere límites de toxicidad del FNN para *C. laxus*, donde a concentraciones mayores de 30g/L de FNN en el medio, el metabolismo vegetal no posee la capacidad suficiente para realizar el proceso de remoción, lo que también se pudo ver reflejado en las características morfológicas de las plantas mostrando clorosis evidente desde los 7 días del tratamiento de 50g FNN/L, tal y como lo describen otros estudios sobre fitorremediación (Paskova *et al.*, 2006).

**Tabla 8.** Concentración de FNN (µg FNN/g FW) en los órganos de plantas de *C. laxus* de un año, así como el % de remoción del FNN del medio, después de 21 de días de la adición de diferentes concentraciones de FNN (g/L) a un medio sintético (MS) en cultivos *in vitro*.

Tratamiento FNN (g/L)	% remoción de FNN en el medio	Raíz	Cormo	Hoja
<b>FNN (0)</b>	--	n.d.	n.d.	n.d.
<b>FNN (5)</b>	33	30.80± 4.25	9.68 ± 1.03	15.76 ± 2.57
<b>FNN (15)</b>	40	131.91 ± 22.31	9.76 ± 3.13	10.01 ± 2.42
<b>FNN (30)</b>	69.5	162.44 ± 27.76	16.34 ± 2.53	100.55 ± 22.34
<b>FNN (50)</b>	10.4	107.70 ± 17.61	22.64 ± 6.12	36.23 ± 3.91

Por otro lado, mediante el análisis de las muestras de tejido por CG-MS se pudo evidenciar la presencia de metabolitos derivados de la oxidación de fenantreno en los diferentes órganos de la planta (Figura 38).

Estos resultados sugieren que el fenantreno pudiera ser transportado de manera sistémica a la planta (Figura 38 3R,3C,3H) además de sufrir transformaciones, ya sea mediante la actividad enzimática, química o ambas del metabolismo de *C. laxus*, siendo la raíz el tejido donde se observó la mayor acumulación y variedad de productos de transformación del hidrocarburo (Figura 38, 1, 2, 4, 5,6).

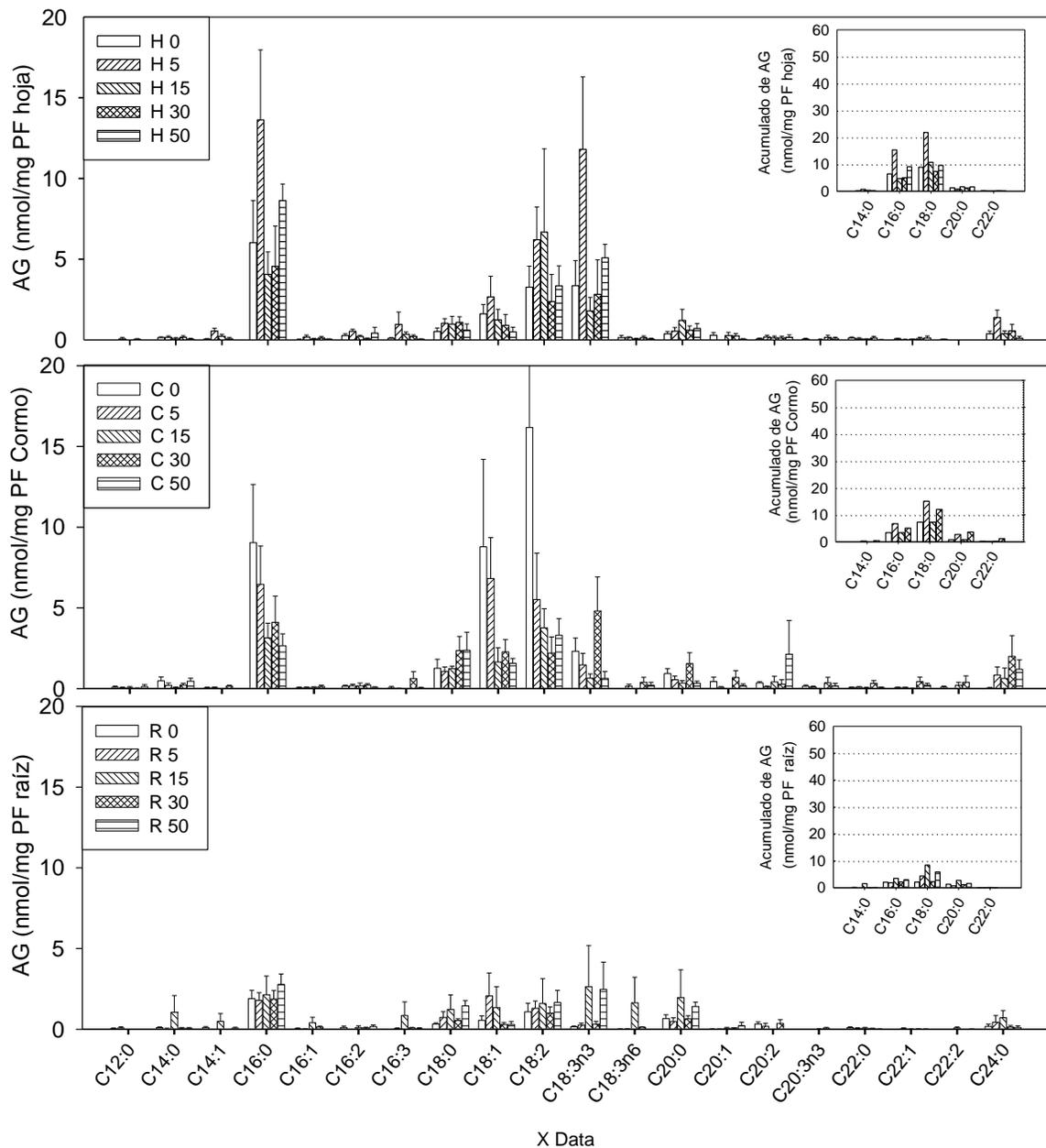


**Figura 38.** Moléculas derivadas de la transformación de fenantreno identificadas en el extracto lipídico de tejido de *C. laxus* pl después de 21 días de tratamiento con 168 mM de FNN en el medio MS. 1, antraceno, 9,10-dihidro; 2, dibenzotiofeno 9; 3 fenantreno; 4, 9H-fluoreno, 9 metileno 5, naftaleno 1 fenil 6, naftol [2,1-b]furano.

#### **9.2.4 Efecto del fenantreno sobre el perfil y contenido de ácidos grasos en órganos de *C. laxus* cultivados *in vitro***

La presencia de FNN también afectó el perfil y contenidos de ácido graso en los órganos principales de la planta indicando cambios importantes a nivel de metabolismo primario de los lípidos (Figura 39). Mientras que en los órganos de raíz y hoja de las plantas en presencia de FNN se observó un incremento en la cantidad de ácidos grasos de C14- C24 tanto saturados como insaturados y con hasta tres insaturaciones con respecto a las plantas sin FNN (barras R0, H0 en Figura 49), para el tejido de cormo se observó una disminución generalizada en la concentración de los mismos.

Para los cultivos de *C. laxus* en sistemas *in vitro* en medio sin FNN, cabe resaltar la presencia mayoritaria de ácidos grasos C16 y C18, indicando que C16:0 fue el ácido graso con mayor concentración para el tejido de raíz y hoja, mientras que C18:2 lo fue para el cormo, esto aunque la cantidad acumulada de ácidos grasos de cadenas C16 haya sido menor a la de C18 en todos los órganos (insertos Figura 39).



**Figura 39.** Contenido de ácidos grasos C12-C24:0 en raíz, corno y hoja de *C. laxus* crecidos en sistemas de fitorremediación *in vitro* en medio sintético Murashige-Skoog adicionados con FNN (0, 5, 15, 30 y 50 g/L). Los insertos indican el contenido acumulado de FAME respecto al número de carbonos tanto saturados como insaturados en cada órgano

La cantidad de ácidos grasos totales fue de  $1.77\pm 0.11$ ,  $11.56\pm 1.04$  y  $4.94\pm 0.37$  en raíz, cormo y hoja (FNN=0) respectivamente, que en comparación con lo observado en plantas crecidas en invernadero en suelo limpio que fue de  $0.31\pm 0.5$  en raíz,  $4.46\pm 0.2$  en cormo y  $1.09\pm 0.02$  en hoja. Se observa que en los cultivos *in vitro* el contenido de ácidos grasos fue mayor que en las plantas de invernadero. Esto puede deberse tanto a la metodología de extracción como a las características fisicoquímicas del método de cultivo. En los sistemas de fitorremediación en invernadero se utilizó el proceso de metilación por saponificación del extracto lipídico obtenido de la molienda de la biomasa y su posterior extracción con hexano, mientras que para la biomasa de plantas *in vitro* la metodología involucró la transesterificación directa a partir de biomasa vegetal molida y la posterior extracción con una mezcla de solventes. Esta última metodología permitió la obtención de ácidos grasos metil esterificados a partir de cantidades pequeñas de biomasa y sin el manipuleo excesivo del extracto durante el proceso.

Otro punto a considerar, es el estado fisiológico de la planta al momento del estudio. Aunque las plantas *in vitro* mostraron crecimiento de raíz y cormo similar al de las plantas de invernadero, la talla de las plantas *in vitro* llegó a ser menor de 15 cm al año de vida, además de que follaje no alcanzó la estructura rígida que da la turgencia natural ni llegó a producir la inflorescencia característica que se observó para plantas de invernadero después de 3.5 años (Figura 29).

De manera similar a lo descrito para *C. laxus* crecido en invernadero, no se encontraron reportes de la cantidad y tipo de ácidos grasos presentes en tejido de raíz y hoja, sino únicamente para cormo (Tabla 9). En consecuencia que resulta interesante resaltar que la diferencia entre el contenido de ácidos grasos en cormo entre *C. laxus* y *C. esculentus*, está dado por los niveles altos de C16:0, C18:0, C18:2, C18:3n3, C20:0 y C20:2 para *C. laxus*, mientras que en el rizoma *C. esculentus* se produce mayor cantidad de C18:1. Estas diferencias pudieran estar relacionadas con las características propias de cada tipo de órgano de reserva al igual que por la especie.

**Tabla 9.** Comparación del % de ácidos grasos en los tejido de los órganos de reserva de *C. laxus* y *C. esculentus*, cormo y rizoma respectivamente.

<b>Ácido graso</b>	<b>%ác. graso<sup>1</sup></b>	<b>% ác. graso<sup>2</sup></b>	<b>% ác. graso<sup>3</sup></b>	<b>% ác. graso<sup>4</sup></b>
C14:0	1.7	28.1	0.12	
C14:1			0.09	
C16:0	32.7	14.5	14.5	14.9
C16:1	0.6		0.33	
C18:0	5.6	3.4	5.6	2.6
C18:1	9.5	44.8	64.8	69.3
C18:2	18.6	8.8	11.8	13.1
C18:3n3	2.5		0.21	
C20:0	11.5		0.69	
C20:2	5.6			
C22:0	1.5		0.15	

1. Este trabajo 2. Eteshola & Oraedu (1996). 3. Glew *et al.*, 2006. 4. Zhang *et al.*, 1996

Así, con este perfil de ácidos grasos de plantas crecidas *in vitro*, fue posible corroborar nuevamente que *C. laxus* es una planta C18:3 debido a la presencia de este ácido graso en el tejido de hoja en los tratamientos control (FNN=0) y la presencia de apenas 0.1nmol de C16:3/ mg PF en el mismo extracto. Por otro lado, el análisis del perfil de ácido graso respecto a los distintos tratamientos con FNN en raíz, mostró que conforme se incrementó la concentración de FNN en el medio no se presentaron cambios notables en la cantidad de ácidos grasos de C16:0 y C18:2, pero si en la cantidad de los C18:0, C18:1, C18:3n3, C20:0 y de algunos de cadena larga como C24:0. Estos cambios fueron notorios en el tratamiento FNN(15) principalmente, donde se detectaron incrementos de hasta 4 (C18:0), 2.4 (C18:1), 18 (C18:3n3), 3 (C20:0) y 4 (C24:0) veces en comparación a lo detectado en raíces de plantas crecidas en ausencia de FNN. En cormo, estos cambios fueron evidentes en las muestras del tratamiento FNN (30) con decrementos en ácidos grasos de cadenas <C18:3 en razón de 0.5 (C14:0 y C16:0) 2 (C18:0) y 0.2 (C18:0 y C18:1)

veces respecto al tratamiento control. Sin embargo fueron notables los incrementos en ácidos grasos >C18:3 en razón de 2.1 (C18:3n3), 3.0 (C18:3n6), 1.7 (C20:0), 5.0 (C22:0) y 55 (C24:0) veces respecto al tratamiento control. Finalmente, en el tejido de hoja, los principales efectos se observaron en el tratamiento FNN (5), donde los incrementos de ácidos grasos fueron de 2.3 (C16:0), 2.0 (C18:0), 1.6 (C18:1), 1.9 (C18:2), 1.4 (C20:0) y 3.7 (C24:0) veces respecto a lo obtenido para FNN (0).

Como se puede apreciar, los cambios en el perfil y contenido de ácidos grasos fue dependiente del órgano: para raíz el mayor efecto se observó con 15 g/L FNN, para cormo fue con 30 g/L y para hoja fue con 5 g/L. Estos resultados pudieran resultar del orden en que el metabolismo vegetal comienza a actuar cuando se encuentra sometido a la presencia del hidrocarburo. De esta forma, a concentraciones bajas de FNN las raíces envían señales a toda la planta indicando la necesidad de ácidos grasos para la reforzar las membranas de la epidermis, probablemente aumentando las capas de cutina y suberina formadas por una red de ácidos grasos de cadena larga. De acuerdo a los resultados obtenidos, esto involucraría primeramente la síntesis de ácidos grasos en los cloroplastos de la hoja. Sin embargo, si la concentración de hidrocarburo en el medio incrementa, la síntesis de ácidos grasos de cloroplasto no sería suficiente, por lo que se iniciaría el mecanismo de síntesis de lípidos a partir de los plásticos de los órganos no fotosintéticos, en este caso de la raíz por ser el órgano que se encuentra en contacto directo con el contaminante. Finalmente, a concentraciones muy elevadas del contaminante, los resultados sugieren que se pudieran estar liberando ácidos grasos almacenados en el cormo ya que es el único órgano de reserva de *Cyperus*, esto en conjunto con la síntesis de ácidos grasos en cloroplastos y plástidos regularía el estado hidrofóbico de la planta para responder a la presencia del hidrocarburo. Como consecuencia se propone que la presencia de FNN repercute esencialmente en la composición de ácidos grasos C16 y C18, que son los principales constituyentes de membrana, y de ácidos grasos de cadenas >C20, los cuales están involucrados en la composición de estructuras como cutina, suberina y capas de cera. De igual forma, se encontró que la cantidad de ácido graso depende del tipo de órgano, lo que sugiere una respuesta sistémica de *C. laxus* a la presencia del contaminante de manera similar

a lo reportado para sistemas de fitorremediación de metales pesados (Verdoni *et al.*, 2001).

Por otro lado, la cantidad total de ácido graso tanto en los órganos de las plantas control FNN (0), como en los tratamientos con altas concentraciones de FNN, creció el orden de cormo>hoja>raíz resaltando la importancia de los ácidos grasos almacenados en cormo para satisfacer las necesidades de lípidos tanto para la raíz como para la hoja. De igual forma, los cambios en el perfil de ácidos grasos de plantas sometidas al estrés del hidrocarburo, sugieren que los ácidos grasos de cadenas C16, C18 e inclusive C20 poseen una participación importante en la biosíntesis de ácidos grasos en todos los tejidos y pudiera estar relacionado con los principales flujos metabólicos en esta ruta, tanto a nivel de plástido como de retículo endoplásmico (Ohlogge & Browse, 1995; Verdoni *et al.*, 2001). Esto sugiere que el mecanismo bioquímico y enzimático de *C. laxus* mantiene un sistema de autoregulación basado en nódulos metabólicos flexibles (Stephanopoulos *et al.*, 1998), que le permiten a la planta continuar con las funciones del metabolismo primario.

Por otro lado, la relación entre ácidos grasos saturados e insaturados para cada órgano fue variable en función de la concentración de hidrocarburo en el medio (Tabla 10). De manera general, en raíz se incrementó la producción de ácidos grasos insaturados totales (de 43% a 56%) conforme se aumentó la concentración de FNN en el medio, siendo los principales los C18:1, C18:2, C18:3n3. Contrariamente, en hoja la cantidad de ácidos grasos insaturados disminuyó de 55% a 46% conforme la concentración de FNN aumentó, principalmente para C18:2 y C18:3n3. En cormo, la proporción mayoritaria de ácidos grasos insaturados mantuvo una variabilidad mínima (entre 54%-70%) en todos los tratamientos, manteniendo las mayores proporciones de C16:0, C18:1 y C18:2.

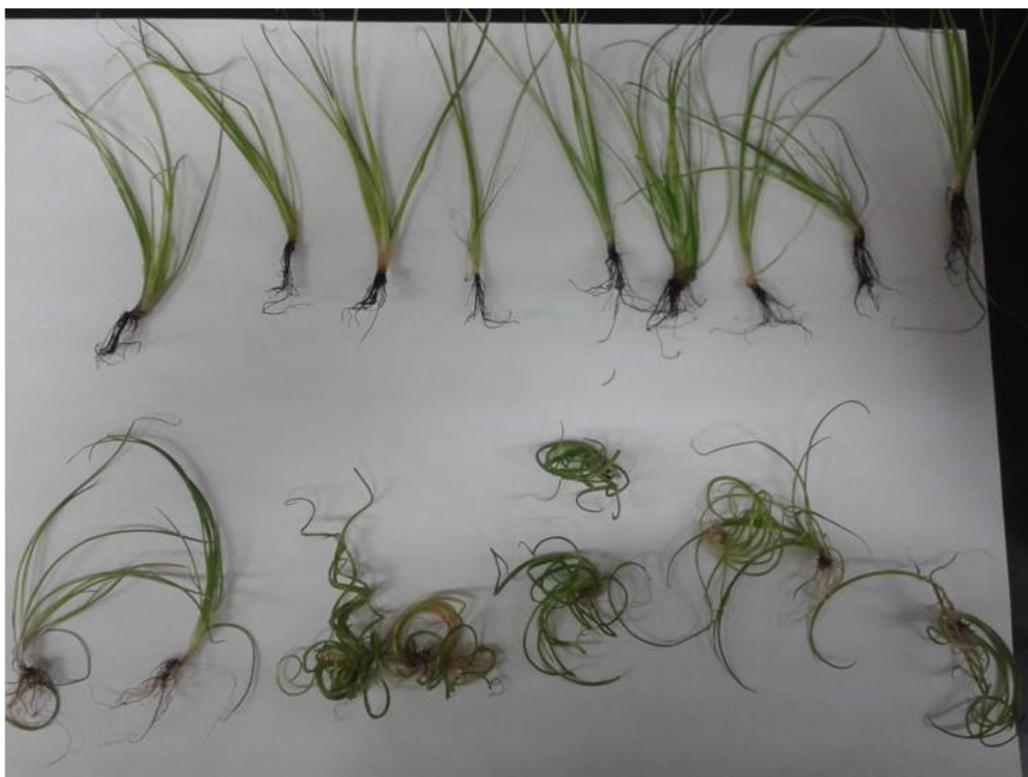
**Tabla 10.** Contenido de ácidos grasos y relación saturados/insaturados en órganos de *Cyperus laxus* crecidos en sistemas experimentales *in vitro* bajo varias cantidades de fenantreno

Suelo y contenido total de hidrocarburos (HTP g/Kg suelo) F= 1.62															
Organ	FNN (0)			FNN (5)			FNN (15)			FNN (30)			FNN (50)		
F =	1.7			2.5			4.7			19			19		
F = 3.2	Sat/Unsat	Un (%)	Total (mg/g FW)	Sat/Unsat	Un (%)	Total (mg/g FW)	Sat/Unsat	Un (%)	Total (mg/g FW)	Sat/Unsat	Un (%)	Total (mg/g FW)	Sat/Unsat	Un (%)	Total (mg/g FW)
<b>LEAF</b> <b>F=1.3</b>	0.81	55.19	<b>4.94±0.37</b>	0.79	40.85	<b>11.36±0.93</b>	0.74	57.45	<b>5.31±0.40</b>	1.15	46.21	<b>4.39±0.28</b>	1.15	46.61	<b>6.02±0.51</b>
<b>CORM</b> <b>F=0.6</b>	0.44	69.28	<b>11.56±1.04</b>	0.64	60.82	<b>7.67±0.54</b>	0.85	54.14	<b>3.76±0.26</b>	0.75	57.19	<b>7.25±0.35</b>	0.75	57.19	<b>7.21±0.42</b>
<b>ROOT</b> <b>F=0.6</b>	1.32	43.17	<b>1.77±0.11</b>	1.45	55.91	<b>2.59±0.17</b>	0.76	56.94	<b>4.88±0.22</b>	1.18	45.87	<b>1.70±0.11</b>	1.18	45.87	<b>3.02±0.22</b>

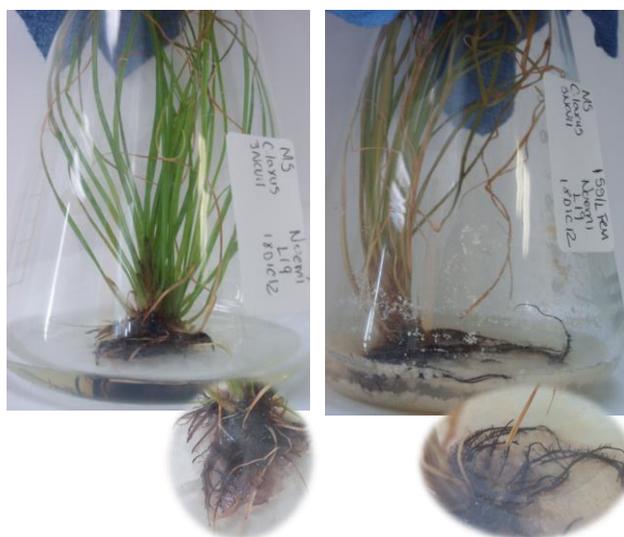
Al contrario de lo observado en los experimentos en invernadero, la concentración de ácidos grasos en raíz y hoja de *C. laxus* cultivado *in vitro* en presencia de FNN presentó incrementos ligeros en los ácidos grasos comunes, lo que sugiere que las elevadas cargas de hidrocarburos totales de petróleo (16000 – 325000ppm de HTP) encontradas en los sitios impactados por derrames de petróleo, al ser una mezcla de hidrocarburos aromáticos y alifáticos, promueve que el metabolismo de *C. laxus* reaccione de manera diferente a que si solo se encontrara presente un hidrocarburo poliaromático, en este caso el FNN. Este razonamiento concuerda con los estudios de Morales-Navarro *et al.*, (2015) donde el cultivo de *C. laxus* tanto en antraceno como FNN y queroseno mostró cambios similares en la cantidad y tipo de ácidos grasos tanto en raíz-cormo como en hoja, dependiendo del tipo de hidrocarburo adicionado al medio. En esos resultados se observó un aumento en la presencia de ácidos grasos de cadenas >C20 y de ácidos grasos con insaturaciones poco comunes como C20:3n3, C18:3n6, C20:4 en las plantas crecidas en ANT y FNN, pero no así en las de queroseno. Esto concuerda con la premisa de que la estructura química y las características fisicoquímicas de cada hidrocarburo estimulan respuestas diferentes por parte del metabolismo vegetal.

#### **9.2.5 Efecto del fenantreno sobre la morfología de plantas de *C. laxus* cultivadas *in vitro***

Finalmente, resulta importante reportar que la presencia de FNN promueve cambios morfológicos notables en las plantas cultivadas *in vitro* (Figura 40). La presencia de fenantreno, desde la germinación promueve cambios en la estructura de hoja haciéndola más rígida en el centro y produciendo hojas exteriores acareeladas con mayor cantidad de clorofila evidenciada por un incrementando el color verde. De igual manera, la longitud de la raíz disminuyó por la presencia de fenantreno en el medio de cultivo (Figura 41). Como se observa, en contraste con las plantas crecidas en invernadero, en las plantas crecidas *in vitro* sin fenantreno se aprecia la presencia de pelos radicales, pero no en las que crecieron en fenantreno.



**Figura 40.** Evidencia de los cambios fisiológicos de *C. laxus* germinada y crecida *in vitro* en presencia de FNN (parte inferior de la imagen) en comparación con plantas crecidas en medio MS libre del contaminante. Plantas de 10 meses de tratamiento.

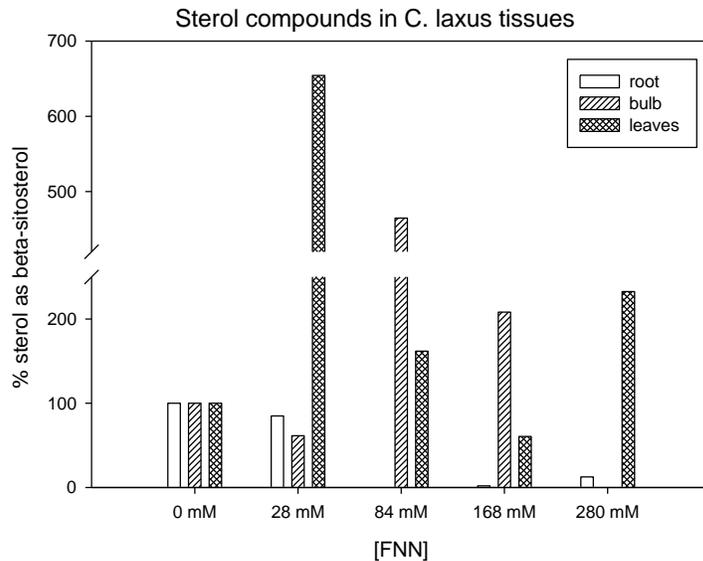


**Figura 41.** Evidencia de la presencia de pelos radicales en el tejido de raíz de *C. laxus* en las plantas control y su ausencia de los sistemas con tratamiento con FNN

Siendo que la pared celular es el primer contacto del fenantreno con la célula vegetal, el aumento en la concentración de los ácidos grasos que la constituyen podría estar formando una barrera para el paso directo del hidrocarburo al tejido, modificando características fisicoquímicas de la célula importantes para la vida de la planta (Kunst & Samuels, 2003). Dadas las características no polares de ambos compuestos (fenantreno-ácido graso) es posible una solubilización del hidrocarburo en la parte externa de las células de la epidermis, para que una vez solubilizado y localizado pudiera ser metabolizado vía enzimática o química por metabolitos propios de *C. laxus*, tales como peroxidasas, fenol oxidasas o compuestos fenólicos y así comenzar el proceso de fitorremoción (Rivera-Casado, 2009).

#### **9.2.6 Efecto del fenantreno sobre el contenido de otros lípidos en plantas de *C. laxus* cultivadas *in vitro***

En los análisis de ácidos grasos mediante GC-MS se detectó la presencia de lípidos. Se pudieron identificar alcaloides del tipo de fenantridinas y fitoesteroles como campesterol, estigmasterol, sitosterol y ergostaesterol (Figura 42). Cabe resaltar, que bajo la presencia de FNN, se observó una disminución paulatina en el contenido de fitoesteroles en el tejido radical, mientras que en bulbo el porcentaje aumentó de dos a cuatro veces más respecto al control en presencia de 168 y 84 mM de FNN respectivamente. Para el caso de la hoja, se observaron incrementos en estas moléculas desde 1.5 hasta 6 veces respecto al control.. El perfil de compuestos lipídicos evaluados en CG-MS sugirió al estigmasterol como el fitoesterol más común en esta especie vegetal (datos no mostrados).



**Figura 42.** Cambios en el contenido de fitoesteroles en los tejidos de *C. laxus* bajo la presencia de FNN (expresado como  $\beta$ -sitosterol)

En resumen, de estos experimentos *in vitro* se observaron incrementos considerables en la cantidad de ácidos grasos en tejido de raíz y hoja, con un aumento considerable en el contenido de ácidos grasos de C20-C24 en todos los órganos de la planta (Figura 39). Estos resultados en combinación con lo reportado previamente para plantas de *Cyperus laxus* crecidas en sistemas de fitorremediación a nivel de invernadero (Rivera-Casado *et al.*, 2013), sugieren que bajo la presencia de HPA, *C. laxus* es capaz de dirigir los flujos metabólicos hacía la producción ácidos grasos que podrían ser parte de estructuras celulares que tiene por objeto el salvaguardar la integridad vegetal, como es la membrana, la cutina, la suberina y las ceras, produciendo así cambios a nivel bioquímico y fisiológico de la planta. Estos cambios metabólicos, según los principios de ingeniería metabólica de (Stephanopoulos *et al.*, 1998), podrían estar autorregulados a través de nódulos metabólicos flexibles o puntos de bifurcación involucrados en la compleja arquitectura bioquímica de la planta.

## **9.2.7 Estudio del sistema enzima-mediador-HPA (EMX)**

### **9.2.7.1 Efecto del periodo de cultivo sobre el contenido de proteína en plantas de *C. laxus* de los sistemas de fitorremediación contra las cultivadas *in vitro* con fenantreno**

Para las primeras cuantificaciones de proteína en tejido de *C. laxus* crecidos en suelo SSR en el 2008, el promedio de la cantidad de proteína fue de 127 µg/mL para tejido de raíz-cormo y 439 µg/mL para hoja. Mientras que para el año 2011, se cuantificó 94.5 µg/mL (0.353 µg/mg PF) en raíz-cormo y 92.8 µg/mL (0.36 µg/mg PF) en hoja y finalmente para el 2012 la cantidad de proteína disminuyó hasta 20 µg/mL en hoja.

Por otro lado, el promedio de la cantidad de proteína en los cultivos *in vitro* en los cultivos control fue de 77, 72, 54, 104 y 30 µg/mL (69,20, 46, 62 y 5 µg/mg PF) en el extracto de raíz-cormo durante la 1ra a la 5ta semana de vida respectivamente. Para el caso de la hoja, la cantidad de proteína fue mayor que en raíz-cormo alcanzando valores de 150, 143, 138, 117 y 164 µg/mL (94, 52, 25, 23 y 75 µg/mg PF) para el mismo lapso de semanas de cultivo. Sin embargo, para los cultivos *in vitro* de plántulas crecidas bajo diferentes concentraciones de FNN, la cantidad de proteína tanto en raíz-cormo y hoja se incrementó durante las semanas 2-4 disminuyendo para la 5ta (Tabla 11, 12). A diferencia de los cultivos *in vitro* control y las plantas maduras crecidas en invernadero bajo diferentes cargas de HTP, la concentración de proteína en plántulas germinadas *in vitro* con FNN fue mayor en raíces que en hoja, siendo más evidente a las concentraciones más elevadas de FNN y durante las primeras 3 semanas de crecimiento.

Con estos resultados, se observó que tanto los cultivos en invernadero con HTP y las plantas control cultivadas *in vitro*, la cantidad de proteína fue mayor en el tejido de hoja que en raíz-cormo y ésta tendencia se mantuvo durante cualquier edad de la planta. Sin embargo, en cultivos *in vitro* con FNN la mayor cantidad de proteína se detectó durante las etapas iniciales de germinación y crecimiento especialmente en el tejido de raíz. La disminución paulatina de la concentración de proteína

respecto al tiempo podría estar relacionada con la cantidad residual de FNN en el medio, ya que para la semana 36 se tuvo el 80% de remoción del hidrocarburo. Tal y como sucedió con los sistemas de fitorremediación en invernadero donde la concentración de proteína en el tejido de *Cyperus* disminuye conforme la carga de hidrocarburo en el sitio también disminuye indicando la recuperación paulatina del sitio.

**Tabla 11.** Cantidad de proteína ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  PF) de raíz-cormo de *C. laxus* germinados en diversas concentraciones de FNN (mM)

SEMANA	FNN [mM]						
	0.01	0.1	0.5	1	3	5	10
1	nd	24.10	<b>16.81</b>	4.70	<b>46.21</b>	nd	<b>56.04</b>
2	4.70	14.53	3.30	8.93	12.68	<b>56.13</b>	27.37
3	2.13	<b>37.22</b>	4.98	<b>32.85</b>	<b>46.20</b>	44.82	2.42
4	<b>17.72</b>	13.23	8.82	11.36	12.40	11.96	21.44
5	1.24	3.69	0.41	1.54	1.86	2.55	0.64

**Tabla 12.** Cantidad de proteína ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  PF) de hoja de *C. laxus* germinados en diversas concentraciones de FNN (mM)

SEMANA	0.01	0.1	0.5	1	3	5	10
1	1.10	3.81	<b>20.95</b>	9.80	6.77	13.41	<b>58.23</b>
2	0.47	<b>16.07</b>	nd	<b>32.41</b>	<b>57.26</b>	25.43	27.93
3	3.55	6.65	11.92	14.39	4.38	<b>39.83</b>	16.58
4	<b>4.46</b>	4.36	4.34	6.03	6.21	3.59	<b>45.98</b>
5	0.33	0.41	nd	0.30	0.38	0.34	0.62

Finalmente, y retomando las observaciones en el perfil de fenoles en plantas de invernadero, la disminución de la cantidad de proteína en los órganos de *C. laxus* del 2008 al 2012 indica que el metabolismo de la planta se ha modificado, como respuesta al estrés del medio; probablemente modificando la capacidad oxidativa del tejido para enfrentar la presencia y toxicidad de los hidrocarburo. En la siguiente sección se presentan los resultados sobre la investigación de esta hipótesis.

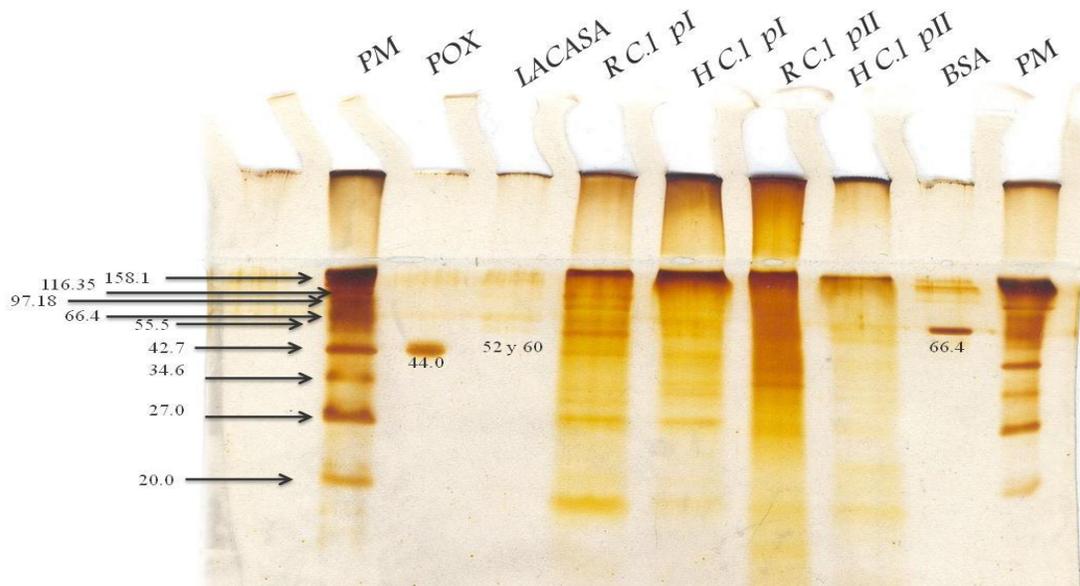
### **9.3 Efecto de la presencia de hidrocarburos sobre la actividad enzimática oxidativa de plantas de *C. laxus* de los sistemas de fitorremediación contra las cultivadas *in vitro* con fenantreno**

En estudios previos (Rivera Casado, *et al.*, 2010) se evidenció la actividad de peroxidasas, fenoloxidasas y lacasas en extractos de raíz-cormo y hoja de *C. laxus* crecidos en invernadero en suelos con elevadas concentraciones de HTP mediante la evaluación de su actividad específica. En el presente trabajo se presentan los resultados del análisis SDS-PAGE y PAGE de extractos proteicos de órganos de plantas de la población I (pl) y población II (PII) desarrolladas en los sistemas de fitorremediación de suelo del sitio SSR y que demuestran el potencial oxidativo de los órganos de esta planta.

En el gel SDS PAGE (Figura 43) se observó una banda de 44 KDA correspondiente al estándar de la enzima POX. Como se observa, una banda similar también estuvo presente en las muestras raíz-cormo (R C.I pl) y hoja (H C.I pl) de plantas de la población I, y en las de raíz-cormo (R C.I.pII) de las plantas de la población II. Para el caso de la muestra de raíz-cormo de *C. laxus pII* se presentó un barrido, lo que podría indicar la degradación de la muestra, por lo que no se puede definir la presencia real de la banda a 44 KD. De igual forma, una banda para una enzima lacasa (LAC) comercial, cuyo PM es de 55KDa, se observa de forma muy tenue en el carril 3, así como en las muestras R C.I pl, H C.I pl y R C.I.pII. Estos resultados indicaron que posiblemente en el extracto proteico vegetal se encontraban presentes al menos estos dos tipos de enzimas oxidativas, dependientes y no

dependientes de peróxido (POX y LAC), lo que concuerda con lo reportado en estudios previos (Rivera Casado, *et al.*, 2010).

Muestras	µg/mL
RI	561
HI	349
RII	1025
HII	388
POX	247

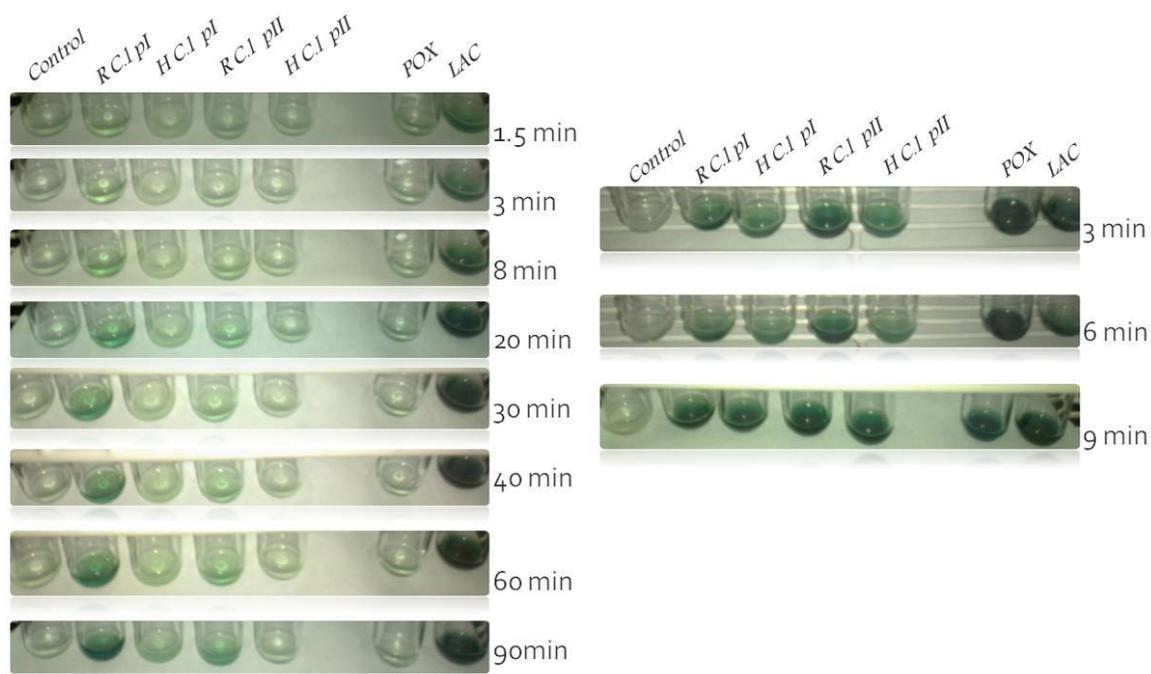


**Figura 43.** SDS PAGE 15%; 60 min; 200 V; 8µg/pozo de muestra; 0.58µg/pozo de POX, LAC comercial, BSA

Para determinar la actividad enzimática no dependiente de peróxido, se confrontaron los extractos proteicos contra ABTS en ausencia de peróxido. En la Figura 44A se observa que los extractos de raíz mostraron la mayor actividad enzimática no dependiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; aunque a partir de los 60 min también se observó una ligera actividad en los extractos de hoja de *C. laxus* pI siendo que en hoja de *C. laxus* pII no se observó reacción hasta los 90 min. Esto puede indicar que existe una diferencia en el metabolismo de estas dos poblaciones de *Cyperus*.

Por otro lado, para determinar la capacidad oxidativa dependientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se realizaron la confrontación de los extractos proteicos en presencia de este

compuesto (Figura 44B). Como se observa, la velocidad de reacción fue más rápida, además de que a diferencia de los resultados anteriores, en este caso se detectó tanto en raíz como en hoja. De estos resultados, para los experimentos sobre mediadores metabólicos, se estableció que el modelo de estudio del complejo enzima-mediador-xenobiótico debiera involucrar en su mayoría enzimas oxidativas dependientes de peróxido.

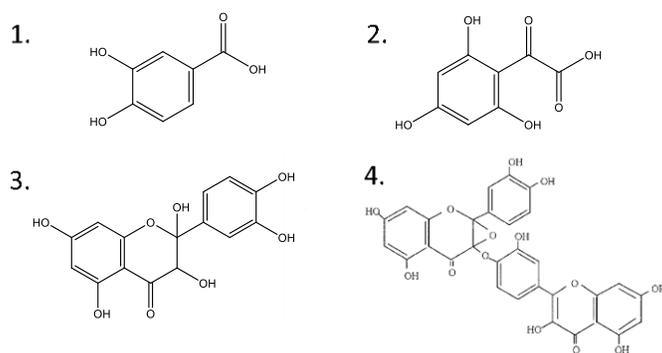


**Figura 44.** Ensayos cualitativos de la actividad enzimática utilizando ABTS como sustrato. A) ensayos en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. B) en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 9.3.1 Oxidación de QTN por acción de la peroxidasa como preludeo para la investigación Enzima-Mediador-Hidrocarburo

Dado que la presencia de QTN fue evidente en los perfiles de compuestos fenólicos tanto de cultivos de invernadero como *in vitro*, así como fue notable el incremento de este flavonoide en cultivos adicionados con hidrocarburos, se consideró a este flavonoide como una molécula modelo de estudios para los ensayos del sistema enzima-mediador-xenobióticos, además de que por sus características químicas posee un elevado valor antioxidante.

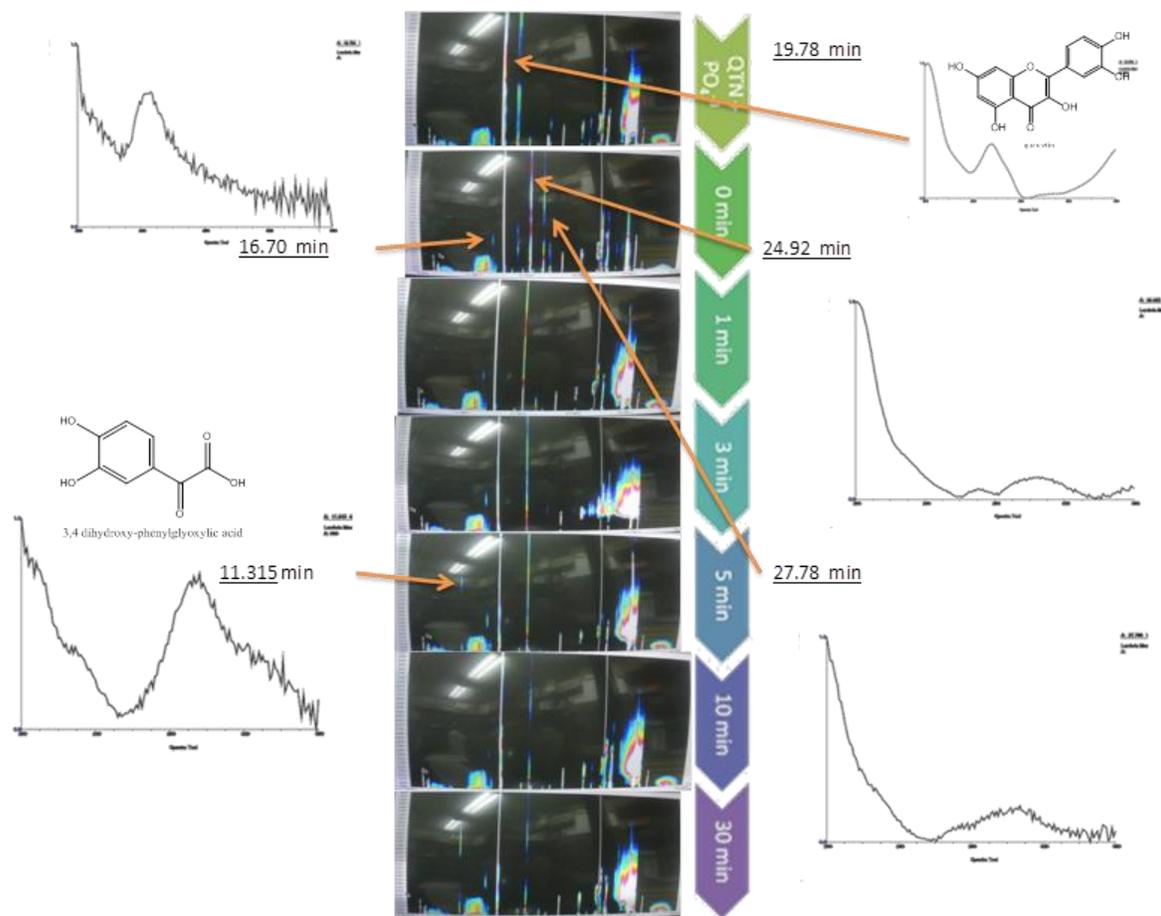
De esta forma, dentro de algunos de los productos de oxidación de quercetina en presencia de peroxidasa (Takahama *et al.* 2002) destacan el ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido 2,4,6 trihidroxifenilgioxílico, 2,3,5,7,3', 4' hexahidroxi flavonona así como dímeros y trímeros de quercetina (Figura 45). De estos, el compuesto 3 se considera el primer producto de oxidación estable mientras que los dos primeros son productos de degradación derivados de la oxidación más profunda que produce el rompimiento de la estructura básica de las flavonas (2-FNNyl-1,4-benzopyrone).



**Figura 45.** Algunos productos de la oxidación de QTN por POX.1. ácido 3,4.dihidroxibenzoico. 2. Ácido 2,4,6-trihidroxifenilgioxílico 3.2,3,5,7,3',4' hexahidroxi flavanona. 4. 2,3-epoxy-2-(3,4-dihidroxifenil)-3-[4O-[2-(3-hidroxifenil)-3,5,7]-trididroxi-4H-1-benzopirano-4-onil]-5,7-dihidroxil-4H-1-benzopirano-4-ona] (Takahama *et al.*, 2002)

Los resultados de la oxidación *in vitro* de quercetina (Figura 46) mostraron que los productos de oxidación se generan inmediatamente después de la adición de la enzima y agitación de la mezcla de reacción. Mediante HPLC, se detectó que a un tiempo  $\approx t= 0$  min se tuvo la presencia de metabolitos a los 16.7 min, 24.92 min y 27.7 min de elución. Así mismo, se observó un producto de oxidación a los 5 minutos de reacción con un tiempo de retención de 11.3 min cuyo espectro de absorción presentó semejanzas con el ácido 3,4 dihidroxi-fenilgioxílico. Sin embargo, no se

encontraron reportados espectros de absorción semejantes a los que se obtuvieron en otros reportes.



**Figura 46.** Gráficas isocromáticas de los cromatogramas y análisis espectral UV de los productos de oxidación de QTN por peroxidasa de rábano a varios tiempos de reacción en comparación con la mezcla de reacción sin enzima. Se muestran los espectros correspondientes a algunos de los productos. El tiempo cero se considera después de adicionar la enzima, agitar la mezcla de reacción y adicionar el solvente para detener la reacción y extraer los productos de la mezcla.

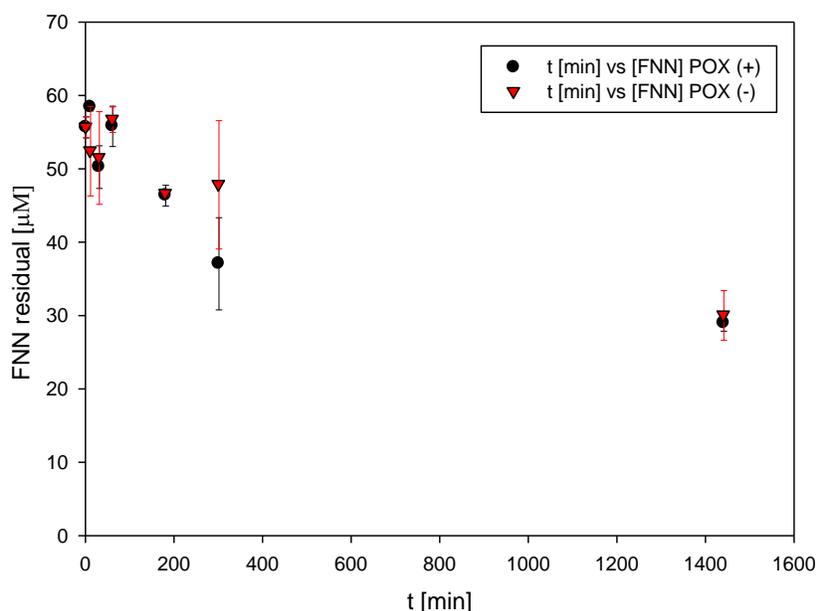
Si bien, no se pudieron identificar con certeza los productos de oxidación de QTN por acción de POX mediante la comparación de los espectros de absorción, la información anterior sugiere la oxidación de QTN debido a la generación de metabolitos inestables, con lo cual se consideró que las condiciones de reacción y

el método de separación fueron adecuados para poder continuar con las actividades para investigar la oxidación de FNN catalizada por POX-QTN

#### **9.4 REACCIONES IN VITRO ENZIMA-MEDIADOR-HIDROCARBURO PARA LA OXIDACIÓN DE FENANTRENO**

La concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H) se estableció en base a reportes sobre la concentración natural de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en tejido vegetal (0.6 a 10 µmol/g PF ) según lo reportado por Cheeseman (2006), mientras que el contenido de QTN fue en base a reportes de trabajos previos para los órganos de plantas de *C. laxus* (6 nmol/g PF en hoja y 350 nmol/g PF en bulbo) crecidas en sistemas de fitorremediación. Debe aclararse que estos valores de QTN de *C. laxus* pueden diferir considerablemente de lo reportado para otras plantas tropicales que pueden contener entre 2-5 nmol/g PF (Miean & Mohamed, 2001; Perr *et al.*, 2001; Rivera-Casado *et al.*, 2010).

La cinética para el consumo de FNN utilizando el sistema EMX (Figura 47) muestra una reducción de hasta el 50% de FNN en 24h de reacción. La velocidad de desaparición en las primeras 5h fue de 0.047 µM/min. Interesantemente, el comportamiento de la curva de desaparición después de 400 minutos fue similar en presencia (POX +) y ausencia (POX-) de la enzima. Esto sugiere que la presencia de la enzima no es determinante para la remoción, sólo en tiempos muy cortos de reacción o que cataliza la transformación de algún sustrato sólo al inicio.



**Figura 47.** Fenantreno residual en la mezcla de reacción utilizando QTN como mediador natural y 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en presencia ( $\bullet$ ) y en ausencia de POX ( $\Delta$ )

Este razonamiento es congruente con la observación de un cambio de color detectado sólo en los primeros instantes de la reacción, donde sólo el 30% de la quercetina adicionada se detectó y el resto disminuyó gradualmente a una velocidades de  $-0.2027 \mu\text{M}/\text{min}$  durante las primeras 3h y de  $-0.0006 \mu\text{M QTN}/\text{min}$  en el resto del tiempo (Tabla 13). Después de 24h de reacción la cantidad de mediador estimada fue del 41% respecto de la cantidad inicial. Debe mencionarse que después de una búsqueda en la literatura, parece que éste es el primer experimento donde se evaluó la variación de la concentración de un mediador en sistemas enzimático de oxidación de xenobióticos mediante la formación del complejo EMX. Los resultados sugieren que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  podría ser el compuesto limitante para la reacción, por lo que se decidió evaluar el efecto de los niveles de este compuesto en la reacción.

**Tabla 13.** Concentración de QTN durante la cinética de transformación de FNN bajo un sistema EMX utilizando HRP

tiempo (min)	POX (+)		POX (-)	
	QTN [ $\mu$ M]	D.E	QTN [ $\mu$ M]	D.E.
0	43.8	9.7	44.5	7.0
10	47.8	2.7	40.5	1.1
30	30.4	16.8	31.4	7.8
60	43.8	6.5	45.2	1.9
180	24.0	5.5	29.1	1.7
300	20.8	2.8	31.3	8.1
1440	25.5	5.5	26.0	0.7

#### **9.4.1 Efecto de la concentración de peróxido sobre las reacciones in vitro Enzima-Mediador-Hidrocarburo para la oxidación de fenantreno**

Las concentraciones de  $H_2O_2$  se establecieron en función de la concentración de QTN a una relación de 0.01, 0.1, 1, 10, 100 [ $H_2O_2$ /QTN]. Los resultados muestran que en el intervalo de 0.1-10 [ $H_2O_2$ /QTN] se mantiene la mejor velocidad remoción (Tabla 14 ). Además de la mezcla de reacción completa (EMXH) se incluyeron los tratamientos controles E-MXH (ausencia de enzima), EM-XH (ausencia del mediador QTN) y E-M-XH (ausencia de enzima y QTN). El cambio en la velocidad de transformación del FNN en función de la concentración de  $H_2O_2$  muestra que la presencia de  $H_2O_2$  hasta una concentración de 3000  $\mu$ M en general, afecta positivamente la transformación de FNN llegando a valores de velocidad de desaparición de 0.02  $\mu$ M FNN/min; sin embargo, se observa un efecto negativo a una concentraciones excesivas de 30000  $\mu$ M. Interesantemente, en ausencia de enzima ( $E^-$ ), la velocidad de desaparición de FNN a concentraciones bajas de peróxido muestra valores similares a los máximos alcanzados en la mezcla de reacción completa y disminuye gradualmente con el aumento en la cantidad de  $H_2O_2$ . Sin embargo en ausencia del mediador QTN ( $M^-$ ), la velocidad se incrementa o mantiene casi constante a concentraciones de peróxido menores a 30000  $\mu$ M. Este comportamiento demuestra que en presencia de cantidades pequeñas de peróxido, probablemente a relaciones  $H_2O_2$ /QTN menores a 0.01, la QTN puede oxidarse parcialmente a formas químicas capaces de promover la remoción de FNN

sin la participación de enzimas. Esto implicaría que en la mezcla completa (EMXH) la E podría utilizar el peróxido preferentemente para oxidar QTN, así en ausencia de QTN la enzima puede dirige su actividad oxidativa hacia el FNN. En otras palabras, en el sistema experimental utilizado, la transformación del FNN depende de la presencia del mediador (quercetina) o de la enzima, no de los dos. Así, en congruencia con lo sugerido en la literatura para otros sistemas (Yamasaki *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 2008), se sugiere que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede actuar como sustrato para la enzima o como generador de radicales libres de quercetina mediante la interacción con las especies reactivas de oxígeno.

**Tabla 14.** Velocidad de desaparición del FNN en función de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0-720min de reacción)

[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] μM	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / QTN]	V [μMFNN/min]			
		EMXH	E <sup>-</sup> MXH	EM <sup>-</sup> XH	E <sup>-</sup> M <sup>-</sup> XH
3	0.01	-0.011	-0.022	-0.016	-0.018
30	0.1	-0.025	-0.021	-0.017	-0.014
300	1	-0.016	-0.016	-0.033	-0.002
3000	10	-0.022	-0.009	-0.023	-0.013
30000	100	-0.012	-0.014	-0.013	-0.016

Ahora bien, para el caso de los tratamientos enzimáticos los parámetros cinéticos V<sub>max</sub> y K<sub>m</sub> (Tabla 15) indicaron que las velocidades máximas de transformación de FNN por la enzima fueron similares tanto en ausencia como en presencia de QTN como mediador. Sin embargo, el valor de K<sub>m</sub> indica que la afinidad de la enzima por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es mayor cuando no se incluye a la QTN en la mezcla de reacción, sugiriendo que se produce una oxidación directa del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la QTN.

**Tabla 15.** Constantes cinéticas para los tratamientos EMXH y EM<sup>-</sup>XH

Tratamiento	V <sub>max</sub> [FNN]/min	K <sub>m</sub> [μM]
EMXH	-0.017	1.841
EM <sup>-</sup> XH	-0.020	0.652

Interesantemente, se observó la formación de dos productos de reacción derivados de la interacción EMXH (Figura 48: P1, P2) y uno para la interacción MXH (Figura 48:P2), los cuales se detectaron en la fase acuosa derivada de las extracción con cloroformo, a partir del inicio de la reacción (t=0) en las relaciones 1,

10 y 100 de [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/QTN] (Figura 48). La presencia de P1 y ausencia de P2 en el tratamiento con 300 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la presencia mayoritaria de P2 a concentraciones de 3000 μM y 3000 μM, sugiere a P1 como posible precursor de P2, observable solo cuando las concentraciones de peróxido son semejantes a las de la QTN en la mezcla de reacción. Cabe mencionar que los espectros UV/VIS para P1 y P2 (Figura 48) no han sido reportados, ni en trabajos donde se ha evaluado la oxidación de QTN por peroxidasas ni como metabolitos oxidados del fenantreno en sistemas bacterianos. De estos resultados, se propone la formación de molécula conjugadas de fenantreno oxidado y quercetina oxidada.

La transformación química del FNN se podría estar llevando a cabo de acuerdo a la siguiente reacción (1)



Considerando:

si  $k1 < k2$  y  $k1=k2$  no será podrá detectar el radial de QTN y,

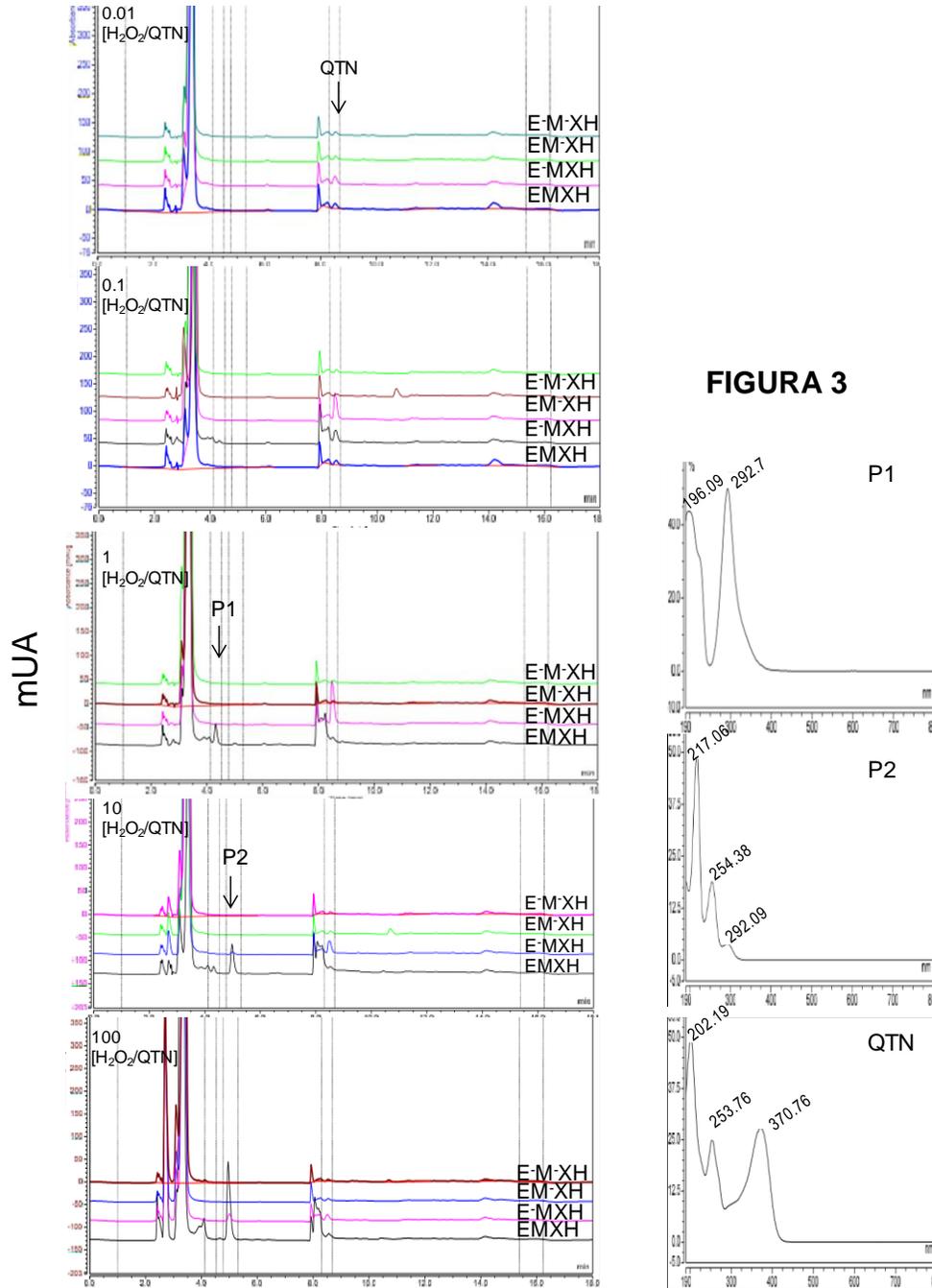
si  $k1 > k2$  se podrá detectar QTNrad

De la reacción y consideraciones anteriores, la velocidad de oxidación de FNN (k3) estará regulada por la oxidación de QTN y generación de radicales (k1). En este punto, la oxidación de QTN también podría llevarse a cabo por las especies reactivas de oxígeno: radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ) y radical superóxido ( $O_2^-$ ) (Dhaouadi *et al.*, 2009). Es importante considerar que k2 deberá ser un parámetro variable que dependerá del tipo de radical libre formado y la rapidez de síntesis de moléculas estables del mediador (quercetin o-quinona) (Awad *et al.*, 2000; Zhou & Sadik, 2008).

Esto último es congruente con los resultados experimentales donde el análisis estequiométrico de la reacción, lo que implicaría que para 300μM de QTN y 30μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se obtendría el 100% de transformación de FNN y la oxidación completa de la QTN. Sin embargo, dado la cantidad de residual de QTN libre, se sugiere que el peróxido no actúa directamente sobre el mediador, lo que disminuye la producción

de QTNrad y por lo tanto la oxidación del FNN. Mientras que la oxidación del resto de QTN se pudo haber llevado a cabo por la presencia de moléculas QTNrad que promueven la generación de otra molécula QTNrad.

En resumen, estos resultados indican que la transformación de FNN bajo la presencia de un mediador metabólico como la QTN, no es necesaria la participación de la enzima, ya que tan solo la presencia del peróxido de hidrógeno (H) puede promover la oxidación del mediador y éste a su vez la oxidación del hidrocarburo.



**Figura 48.** (izquierda). Metabolitos derivados de la oxidación de FNN bajo la interacción EMXH y MXH a 30 minutos de reacción. Los tiempos de retención fueron: P1= 4.36 min, P2 = 5.06 min y QTN = 8.53 min (abajo). Espectro de absorción UV/VIS de los productos de reacción P1 y P2, así como de la quercetina libre (QTN).

## 10 DISCUSIÓN GENERAL

*C. laxus* es una planta capaz de germinar, crecer y desarrollarse en suelos contaminados con cargas de hidrocarburo de hasta 325 000 ppm de HTP. Los resultados del presente trabajo demuestran que bajo la presencia de hidrocarburos se generan cambios sustanciales en las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de la planta, lo que le confiere la capacidad de sobrevivir a los ambientes de estrés producidos por la toxicidad de esos compuestos. De los órganos de esta planta, parece ser que la estructura subterránea llamada cormo, permite el almacenamiento de metabolitos primarios y producción de metabolitos secundarios como una estrategia tanto para la sobrevivencia como para la propagación de esta especie vegetal.

Uno de los principales cambios en el metabolismo primario de *C. laxus* debidos a la presencia de hidrocarburos se dio a nivel de síntesis y composición de los ácidos grasos (Figura 25 y 39). Los cambios en el metabolismo primario de ácidos grasos fueron evidentes debido a la presencia de diferentes concentraciones hidrocarburo en el medio de cultivo, tanto en cantidad como en tipo y a su vez a nivel de órgano y de planta completa. Para poder considerar la variabilidad de cada uno de los factores involucrados, se analizaron los resultados de diseños experimentales anidados, lo que permitió establecer la variabilidad debida a factores que por sus características intrínsecas no pueden manejarse experimentalmente como bloques aleatorios. Particularmente para este caso, la variabilidad en la cantidad de ácidos grasos evaluada como metil-ácidos grasos (FAME), dependió directamente del tipo de órgano a partir del cual se obtiene el extracto, la cual a su vez dependió de la planta de origen, ya que cada planta es considerada un ser único e independiente, al igual que los órganos de cada planta. Por otra parte, el contenido de FAME en cada planta estuvo directamente relacionado con la cantidad de hidrocarburo en el sistema en que se desarrolló, por lo que este fue un factor principal en el modelo experimental. Así, el modelo estadístico para este diseño anidado en los sistemas de fitorremediación de suelos de sitios contaminados fue:

[Contenido de ácidos grasos = Sitio + Órgano(Sitio) + FAME(Órgano) + FAME(Órgano(Sitio))]

Y para el sistema de estudio del efecto del FNN en cultivos *in vitro* fue:

[Contenido de ácidos grasos = [FNN] + Órgano([FNN]) + FAME(Órgano) + FAME(Órgano([FNN]))]

Para el caso del cultivo *in vitro*, se determinó que la cantidad total de ácidos grasos fue afectado significativamente ( $F=1.62$ ) por la cantidad de FNN independientemente del tipo de órgano. Sin embargo la mayor variabilidad en la cantidad de ácido graso total se presentó en función del órgano de estudio ( $F=3.2$ ). No así para el caso de los sistemas de fitorremediación en invernadero donde la mayor variabilidad se presentó en función de la cantidad de HTP en suelo ( $F=39.6$ ), seguida de aquella debida al tipo de órgano ( $F=27.1$ ).

Por otro lado, en ambos sistemas se observó que la variabilidad en el contenido de ácidos grasos siempre fue mayor en hoja ( $F_{h-in vitro}=1.3$ ;  $F_{h-invernadero}=6.6$ ) que en los otros órganos en todos los tratamientos. No obstante, la variabilidad en corno y hoja de los sistemas de fitorremediación fueron muy similares ( $F_{c-invernadero}=6.5$ ) y superiores a los de raíz ( $F_{r-invernadero}=2.5$ ), mientras que en los sistemas *in vitro* la variabilidad en raíz y corno fue muy similar ( $F_{r-in vitro}=0.6$ ,  $F_{c-invernadero}=0.6$ ) y menor respecto a la hoja del mismo sistema.

Estos resultados demuestran por primera vez que existe una respuesta específica de la planta en función del contaminante o conjunto de contaminantes presentes en el medio ambiente. Es evidente que la planta intenta mantener un flujo metabólico sistémico, donde el corno parece ser un órgano clave para mantener el flujo tanto de metabolitos como de nutrientes entre el tejido aéreo y la raíz (Figura 25 y 39). El cambio en el tipo y cantidad de ácidos grasos sugieren que la presencia de hidrocarburos en el sitio pudiera estar afectando el flujo y transporte de nutrientes del suelo a la planta a través de la raíz. Esto limitaría la capacidad de obtener los metabolitos de suelo necesarios para la síntesis y elongación de los ácidos grasos en los órganos aéreos. Sin embargo, aún queda por aclarar si el proceso de

traslocación de compuestos y carbohidratos desde el tejido fotosintético al tejido de raíz fue afectado, por lo tanto el incremento de los niveles de ácidos grasos en raíz debido a la presencia de hidrocarburos necesita más estudios. A este respecto, es importante considerar que diversos autores han demostrado daños en la actividad fotosintética en plantas sometidas a estrés debido a la formación de radicales libres (Alkio, et al. 2005). También ha sido reportado que la síntesis de novo de ácidos grasos depende de la capacidad del metabolismo vegetal tanto para la síntesis como para la utilización de algunos metabolitos citosólicos, lo que a su vez depende de la especie vegetal (Rawsthorne 2002). Esto soporta los resultados de que *Cyperus laxus* fue capaz de mantener en equilibrio su flujo metabólico para tolerar la presencia de hidrocarburos, tal como se mencionó anteriormente.

Si bien es cierto, que no se pudo cuantificar el efecto de los hidrocarburos en el sistema fotosintético de *Cyperus*, si fue posible correlacionarlo con los cambios morfológicos y fisiológicos observados. Estos efectos fueron resultado del tipo y cantidad de hidrocarburo.. Por ejemplo, en los sistemas de fitorremediación donde la cantidad de HPT fue desde 16 000 hasta 325 000ppm, las hojas de *Cyperus* solo disminuyeron en talla pero no presentaron cambios notorios en la coloración, forma o espesor. Sin embargo, en los sistemas *in vitro* a elevadas concentraciones de FNN (50 g/L) hubo clara evidencia de clorosis en hojas en un lapso de 7 días. De igual forma, Navarro-Morales *et al.*, (2014), reportó que para plantas de *Cyperus laxus* germinadas y crecidas *in vitro* bajo contenidos de 0.110 mM de FNN, se mantuvo la cantidad de clorofila, observándose la coloración verde típica en las hojas. Pero no fue así en los tratamientos con FNN > 10mM, donde la clorosis fue evidente a los 15 días de germinación. Los efectos del FNN también fueron evidentes a nivel de morfología de la planta. Se observaron cambios notables en la forma y grosor de las hojas crecidas en cantidades de FNN >3 mM. Estas hojas poseían coloración verde típica, pero espesor de 2 a 3 veces mayor respecto a la planta control e interesantemente una forma acarelada. Estas observaciones fueron generales para plantas crecidas bajo la presencia de FNN pero no para cuando se crecieron en presencia de otros hidrocarburos como antraceno o queroseno. No hay reportes en la literatura para otras plantas sobre resultados semejantes a la

respuesta morfológica de las hojas de *Cyperus* ante la presencia de FNN, por consiguiente se requiere de más estudios dirigidos a explicar este fenómeno.

Bajo esta misma línea, aún quedan varias preguntas sin respuestas. Por ejemplo, ¿por qué *C. laxus* es capaz de crecer en sitios intemperizados y con tan altos contenidos de hidrocarburos después de haber sido impactados por derrames de petróleo crudo? ¿existe una relación entre el patrón de crecimiento y las características bioquímicas de una planta C18:3? ¿Qué ventajas aportan las características propias del cormo en comparación con otros órganos de reserva subterráneos en la supervivencia y propagación de las plantas de *Cyperus* en los sitios contaminados?. Se ha reportado que la mayoría de las plantas de la familia *Cyperaceae* poseen anatomía Kranz relacionada con la fotosíntesis C4 y la producción de órganos de reserva (Bryson & Carter, 2008; Dominy *et al.*, 2008). Sin embargo, está reportado que *C. laxus* no presenta las características de la anatomía Kranz en hojas de plantas C4 (Martins & Scatena, 2013; Bruhl & Wilson, 2007), pero en este trabajo se encontró que produce cormos (Figura 17) además, de acuerdo a la proporción C16:3/C18:3 en el tejido de raíz es una planta C18:3. Es importante hacer notar que en la literatura no se encontraron reportes ni evidencias sobre estas dos características para *Cyperus laxus*. Así, debido a que algunas especies vegetales con fotosíntesis C4 no presentan claramente la anatomía Kranz (Martins & Alves, 2009; Lundgren *et al.*, 2014), se necesitan investigaciones donde se evalúe si *C. laxus* utiliza el sistema fotosintético C4 para crecer en los sitios impactados por petróleo.

Por supuesto, los cambios en la morfología de las plantas crecidas en presencia de hidrocarburos también pudieran estar relacionados con los cambios en cantidad y tipo de ácido graso en los diferentes órganos. Diversos autores, como (Zhan *et al.*, 2013), han referido que la facilidad con la que una especie vegetal pueda absorber, adsorber y translocar el xenobiótico del medio a sus tejidos, puede depender principalmente de la composición lipídica de la raíz y no así de las características morfológicas de la misma; como longitud, grosor, área superficial. De esta manera, los resultados obtenidos evidenciaron que los cambios observados en el perfil de ácidos grasos dependieron tanto de la cantidad de hidrocarburos como de la

habilidad de *C. laxus* para adaptar el metabolismo lipídico de las células de cada órgano en respuesta a los cambios ambientales, tal como ha sido reportado para otras especies vegetales crecidas bajo otras condiciones de estrés (Kolattukudy, 1970; Kroumova *et al.*, 1994).

Por lo tanto, mientras que para plantas crecidas en los sistemas de fitorremediación de suelo contaminado fue notable el incremento del contenido de ácidos grasos en raíz en asociación con un decremento concomitante del contenido de ácidos grasos totales en cormo y hoja; para los sistemas *in vitro* con fenantreno se observó, de manera sistémica, un incremento de la cantidad de estos compuestos, sugiriendo primeramente, que la respuesta a la presencia de hidrocarburos se manifiesta en todos los órganos de la planta, ya sea mediante un proceso específico de señalización desde la raíz a la hoja o bien por el transporte del hidrocarburo libre, transformado o conjugado, de célula a célula a vía del apoplasto (Figura 38); lo que concuerda con lo reportado por diversos autores para el fenantreno (Wild *et al.*, 2005; Yu-Hong & Yong-Guan., 2007). En el estudio de Yu-Hong & Yong-Guan. (2007), se describe que el proceso de adsorción de fenantreno en raíz de arroz se ajusta al modelo de Langmuir, en donde una molécula o partícula (adsorbato) se acerca a una superficie adsorbente sólida (adsorbente) que contiene sitios específicos donde el adsorbato puede ser adsorbido por unión a sitios específicos del adsorbente formando un complejo adsorbato-adsorbente. Este modelo, aplicado a los tratamientos donde se creció *Cyperus* en presencia de hidrocarburos, indica que se produce una interacción en monocapa entre el hidrocarburo y la pared celular del apoplasto de las raíces de la planta como se propone en la Figura 49. En consecuencia, sería conveniente realizar un estudio de adsorción de FNN en tejido de raíz de *Cyperus*, para corroborar si se lleva a cabo este fenómeno. Bajo esta premisa, e independientemente de la forma de transporte del hidrocarburo a los tejidos de *Cyperus*, en los sistemas de fitorremediación *in vitro* fue posible evidenciar la presencia de fenantreno libre y de sus metabolitos de oxidación en los tres órganos principales de la planta después de 21 días de cultivo. Estos resultados demuestran que esta planta es capaz tanto de absorber, transportar y transformar el FNN en todos los tejidos de la planta, lo que concuerda con lo reportado para

*Arabidopsis*, maíz y trigo (Wild *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009). Debe notarse que esta conclusión difícilmente podría haberse obtenido a partir de los sistemas de fitorremediación en invernadero, principalmente debido a que en un suelo contaminado con petróleo crudo, además de contener una mezcla muy compleja de hidrocarburos, también influye la participación de microorganismos y demás componentes de la microflora que puede producir compuestos similares.

*Cyperus* resistió la presencia de grandes cantidades de hidrocarburos aromáticos. Si bien es cierto que diversas especies vegetales llevan a cabo procesos de fitorremediación de hidrocarburos poliaromáticos (Sicillano & Germida, 1998; Liu *et al.*, 2008), *Cyperus laxus* fue capaz de sobrevivir y desarrollarse en cantidades mayores hasta 100 veces lo reportado para otras especies, como *Arabidopsis* 1.25 mM (Liu *et al.*, 2008) o 1.5 mM (Wild *et al.*, 2005). Esto debido a diversas adaptaciones metabólicas, en este caso reflejado en un incremento diferencial en la producción de ácidos grasos de cadenas largas y de cadenas impares o con un gran número de insaturaciones. Los ácidos grasos de cadenas largas (C20-C34) son compuestos comunes que favorecen la formación de estructuras celulares como membranas más rígidas, cutícula, suberina y ceras, proporcionando al tejido que los produce una mayor resistencia a la presencia de xenobióticos hidrofóbicos (Kolattukudy, 1970; Lessire *et al.*, 1982; Kunst & Samuels, 2003).

La presencia de hidrocarburos también incrementó el contenido de otros lípidos. En los órganos de plantas *in vitro* crecidas en FNN, fue notable un incremento de esteroides, en su mayoría del tipo campesterol, estigmasterol, sitosterol y ergostaesterol, principalmente en tejido de bulbo y hoja. Estos resultados concuerdan con lo reportado para jitomate sometido a la presencia de FNN y pireno (0- 300mM) en cultivos hidropónicos (Ahammed *et al.*, 2012). En este estudio, verificaron que la presencia de un esteroide (brasinosteroide) en tejido de hoja y raíz, favorecía por un lado, la capacidad fotosintética en hoja únicamente bajo la presencia del contaminante, así como la elongación de la raíz y el incremento en la actividad de enzimas oxidativas.

La relación que existe entre la producción de cierto tipo de esteroides en los tejidos de *C. laxus* y los cambios bioquímicos y enzimáticos desencadenados por la presencia de hidrocarburos poliaromáticos amerita una investigación más detallada. Se deben hacer estudios también para investigar la relación entre la producción de esteroides y el perfil de ácidos grasos con los cambios en la morfología de hoja y el incremento en la actividad enzimática oxidativa en los diferentes órganos de *C. laxus*, que pudieran estar involucrados dentro de la compleja estrategia de la planta durante el proceso de fitorremediación.

Otra de las estrategias que utiliza *Cyperus* cuando se encuentra en contacto con FNN, es la modificación del tipo y cantidad de compuestos fenólicos a todos los niveles de la planta. No obstante se debe investigar por qué fue en el cormo donde se encontró la mayor cantidad y variedad de compuestos fenólicos del tipo de ácidos benzoicos y cumarinas, así como de metabolitos secundarios como alcaloides, terpenos y flavonoides. Estos resultados concuerdan con lo reportado para otras Cyperaceas (Harris & Hartley, 1980) y para los órganos subterráneos de las mismas como tubérculos y rizomas (Parker *et al.*, 2000; Jeong *et al.*, 2000; Sahu *et al.*, 2010), sin embargo para los tejidos foliares de *Cyperus* no se encontró información. Los principales cambios observados en el perfil de compuestos fenólicos están relacionados con la síntesis de flavonoides del tipo quercetina y quercetrina, incrementándose tanto en tejidos de plantas crecidas bajo la presencia de FNN como en los sistemas de fitorremediación. La síntesis de metabolitos en plantas sometidas a situaciones de estrés ha sido reportada por diversos autores y está directamente relacionada con el mecanismo de defensa de la planta. Bajo esta línea, resultó de interés la síntesis de mayor concentración de quercetina en plantas crecidas en sitios contaminados con cargas elevadas de hidrocarburos, no así en los sistemas control ni en aquellos donde el sistema de fitorremediación había trabajado durante años y por lo tanto la carga de hidrocarburo fue baja. En estos últimos sistemas, fue interesante la presencia mayoritaria de flavonoides con menor poder antioxidante como la epicatequina y vitexina (Figura 21). Esto podría ser el resultado de los cambios en las características del suelo donde se desarrolló *C.*

*laxus*, el cual fue modificándose con el tiempo, disminuyendo el nivel de estrés para la planta por la disminución gradual de la carga de hidrocarburo y la recuperación paulatina del suelo. Es decir, después de cierto tiempo de fitorremediación parecería que la planta ya no necesitara la síntesis de moléculas con alto poder antioxidante como la QTN para contrarrestar el efecto del estrés por la presencia del hidrocarburo.

La presencia de hidrocarburos también aumentó la síntesis de fenilpropanoides (Figura 20, 21), los cuales participan en la formación de estructuras de soporte para la planta como la lignina, cutina o suberina. Estas estructuras de soporte suelen proteger a la planta de cambios bruscos en el entorno (Gorshkova *et al.*, 2000; Chen & Schnoor, 2009; Thomas *et al.*, 2007; Pollard *et al.*, 2008) y también forman parte del tejido de órganos subterráneos y de hoja (Pollard *et al.*, 2005). De esta forma, Mientras que los fenoles que forman parte de la estructura de la pared celular, los flavonoides como la quercetina en este tejido, pudieran estar promoviendo la oxidación de los hidrocarburos debido a su alto poder antioxidante.

La interacción aparente entre la quercetina e hidrocarburos poliaromáticos en las partes más externas del tejido vegetal pudiera estar dando lugar a la formación de las moléculas conjugadas fenol-HPA, como un mecanismo de *C. laxus* para la remoción de este tipo de xenobióticos. Debe notarse que la conjugación con flavonoides produce un cambio en la polaridad de la molécula de hidrocarburo volviéndola más biodisponible y susceptible ataques enzimáticos, y por lo tanto a la incorporación al metabolismo vegetal. De ello, la importancia del estudio de la formación de los complejos enzima-mediador-xenobiótico. Según los estudios de Coleman *et al.*, (1997), sería justamente durante la Fase I donde la participación de los complejos EMXH y MXH pudieran estar favoreciendo la oxidación del hidrocarburo. La localización de flavonoides como la QTN y peroxidasas en la membrana como de pared celular así como de las especies reactivas de oxígeno cuando la célula vegetal se ha expuesto a diversas condiciones de estrés (Perr *et al.*, 2001; Alkio *et al.*, 2005), sugieren que una vez que el FNN se ha acercado a la célula vegetal, las peroxidasas pueden utilizar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato para oxidar los

flavonoides generando radicales libres capaces de iniciar la oxidación del FNN. O bien, el flavonoide puede ser oxidado directamente por las especies reactivas de oxígeno presentes y generar radicales libres para la posterior oxidación de FNN, tal y como se propone en la figura 49.

Cabe resaltar, que en estudios previos se reportó que la actividad de diversas enzimas oxidativas como fenoloxidasas, peroxidasas y lacasas en los órganos de *C. laxus* se incrementa conforme la carga de hidrocarburo en el sitio se incrementa (Rivera-Casado *et al.*, 2010, Morales-Navarro *et al.*, 2015). Aunque de manera general, el contenido total de proteína tanto en plantas crecidas en los sistemas de fitorremediación como en cultivos *in vitro* bajo la presencia de FNN disminuyó conforme el hidrocarburo se removía del sitio., Fue interesante el hecho de que la actividad de las enzimas oxidativas dependientes de peróxido parece tener una mayor velocidad respecto a aquellas no dependientes de peróxido, por lo que la participación de enzimas oxidativas en el sistema enzima-mediador-HPA debiera ser fundamental durante el proceso de defensa y transformación del HPA por la especie vegetal.

### **10.1 Propuesta de fitorremediación de FNN por *C. laxus***

Conjuntando los resultados de los sistemas de fitorremediación nivel invernadero con los de los experimentos con cultivos *in vitro*, se proponen algunas estrategias que pudiera estar llevando a cabo *C. laxus* durante el proceso de remoción de hidrocarburos (Figura 49). Se resalta la importancia de la participación de moléculas antioxidantes fungiendo como mediadores metabólicos en el proceso de oxidación, e indicando su repercusión a nivel bioquímico, enzimático y morfológico en la planta.

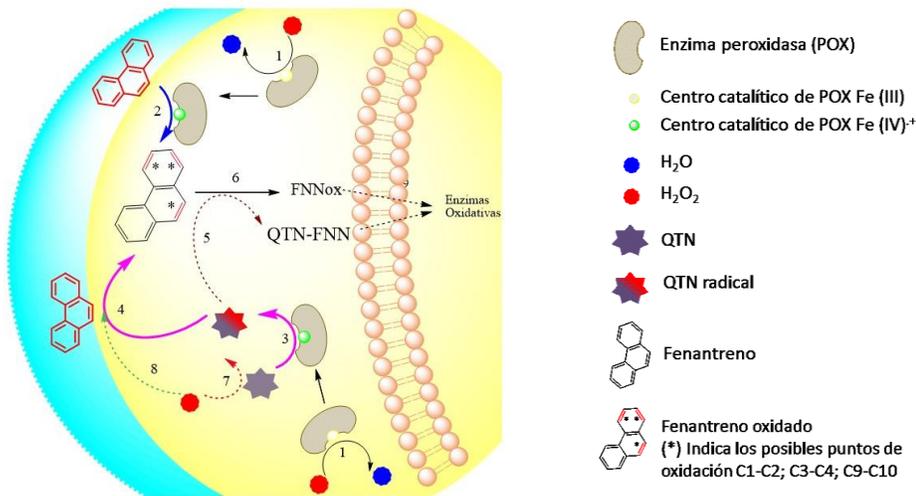
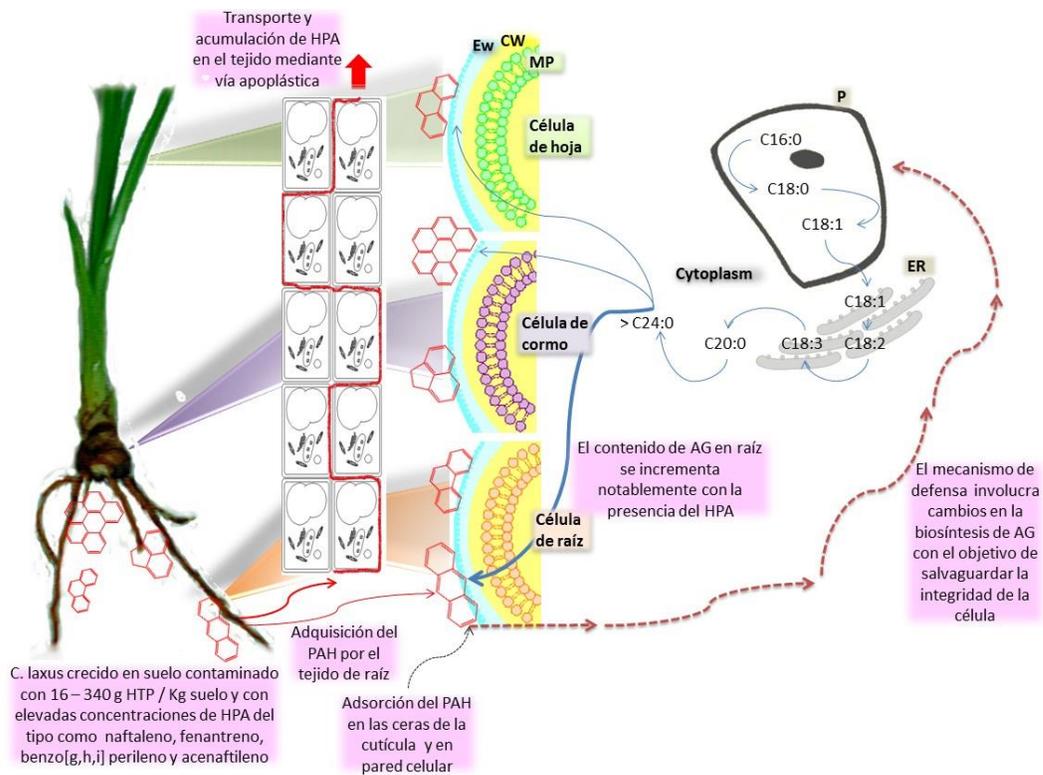
El transporte de algunos HPA a través de los órganos de la planta pueden llevarse vía del apoplasto promoviendo un incremento generalizada en el contenido de ácidos grasos (C18 y C20-C24), principalmente en el tejido de raíz, afectando negativamente el proceso de traslocación o transporte de micronutrientes desde la raíz al cormo y a la hoja. En hoja y raíz la presencia de hidrocarburos no involucra cambios significativos en el flujo de carbono en las rutas de procariota y eucariota

de síntesis de ácidos grasos. De forma generalizada, se promovió mayor cantidad de ácidos grasos C18 con una disminución de C16, sugiriendo que esta especie de *Cyperus* promueve el flujo metabólico de ácidos grasos para reforzar estructuras como membrana plasmática, cutina, suberina y epicutícula para proteger la integridad de toda la planta. Estos cambios en el flujo metabólicos de ácidos grasos involucran ajustes importantes a nivel bioquímico y fisiológico de las plantas en respuesta a la presencia de hidrocarburos. Estos ajustes son generalmente auto-regulados mediante nódulos metabólicos flexibles del mapa metabólico de la planta.

El mecanismo de defensa vegetal promueve principalmente que se refuerce la pared celular, la lignificación y la producción de especies reactivas de oxígeno? (ROS), de éstos últimos el radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y  $H_2O_2$  son producidos a nivel de pared celular. Diversos mecanismos enzimáticos contribuyen a la producción de ROS en la región apoplástica, principalmente los sistemas definir (POX) clase III, los cuales también están involucrados en la oxidación de sustratos, polimerización de los componentes de la pared celular, regular el crecimiento celular, lignificación y suberización siendo estos últimos procesos  $H_2O_2$ -dependiente (Almagro *et al.*, 2009; Kärkönen & Kuchitsu, 2015). Por otro lado, los flavonoides son parte del mecanismo de defensa de la planta a estrés biótico y abiótico ya que su capacidad antioxidante le confiere la capacidad de atrapar radicales libres y evitar el daño celular. Particularmente la quercetina es un flavonoide con alto poder antioxidante que se sintetiza principalmente en cloroplasto, sin embargo es transportada a la región apoplástica debido a que es insoluble en agua (Winkel-Shirley, 2002; Zhao & Dixon, 2009).

De esta manera, sería en la región apoplástica (cutícula-pared celular) donde podría llevarse a cabo el inicio de la oxidación del FNN (X). Se sugiere que enzimas (E) ubicadas a nivel de CW pudieran reaccionar con el peróxido de hidrógeno (H) presente (1) y con ello generar el intermediario oxo-ferril que posee un potencial redox lo suficientemente elevado ( $>1V$ ) para oxidar tanto compuestos no fenólicos como FNN (2) y fenólicos como la QTN (3) para finalmente obtener metabolitos de FNN con puntos de oxidación probables en C1-C2, C3-C4 y C9-C10 (6). En el caso

de la oxidación de QTN se involucraría como paso intermedio la formación de un radical (o-semiquinona) (3) el cual es capaz de promover la oxidación del FNN fuera del sitio catalítico de la enzima (4) fungiendo como mediador (M). A su vez, el radical de QTN también puede interactuar con la molécula de FNNox (5) para formar una molécula conjugada QTN-FNN, ambos productos son susceptibles a la actividad de otras enzimas oxidativas del metabolismo vegetal favoreciendo la transformación del hidrocarburo. Adicionalmente, el alto potencial redox de  $H_2O_2$  le permite llevar a cabo la oxidación directa tanto de la QTN (7) y continuar vía  $4 \rightarrow 6$  ó 5, así como del FNN ( $8 \rightarrow 6$ ). Los resultados de este trabajo sugieren que la formación del complejo EMXH es una estrategia bioquímica y químicamente viable para llevar a cabo la oxidación de hidrocarburos a nivel de la región apoplástica de la célula específicamente en CW, así como que la participación de cada uno de sus elementos está directamente relacionado con la concentración de especies reactivas de oxígeno en esa región de la célula.



**Figura 49.** Propuesta sobre las estrategias que pudiera estar llevando a cabo *C. laxus* durante el proceso de remoción de hidrocarburos. Se resalta la importancia de los cambios en el perfil de ácidos grasos (arriba), y el papel de las enzimas oxidativas y, compuestos fenólicos y ROS (abajo).

## 11 CONCLUSIONES

- De acuerdo con el balance de ácidos grasos C16:3/C18:3 en el tejido de hoja, se demostró por primera vez que *C. laxus* es una planta C18:3
- La presencia de una estructura subterránea como el cormo, permite el almacenamiento de metabolitos necesarios tanto para la sobrevivencia como para la propagación de *C. laxus* crecidos en sitios contaminados con hidrocarburos
- La propagación y establecimiento de cultivos *in vitro* de *C. laxus* en presencia de HPA permitió conocer la participación única del sistema vegetal durante la remoción del contaminante, siendo la primera evidencia de que el metabolismo de esta planta es capaz de llevar a cabo el proceso de fitorremediación
- La presencia de hidrocarburos poliaromáticos promueve cambios en la morfología de *C. laxus* dados principalmente por el tipo de hidrocarburo y su concentración en el medio, siendo los más evidentes la disminución tanto de la talla general de la planta, como en el tamaño de raíz y en la presencia de pelos radicales. En el caso particular del fenantreno se tuvo un efecto de engrosamiento y ondulado en la estructura de hoja
- Los cambios observados en el perfil de ácidos grasos dependieron tanto de la cantidad de hidrocarburos como de la habilidad de *C. laxus* para adaptar el metabolismo lipídico de las células de cada órgano como respuesta a los cambios ambientales, observándose ácidos grasos poco comunes como los de cadenas impares e insaturados además de un incremento generalizado de

- ácidos grasos de cadenas >C<sub>20</sub>, sugiriendo cambios estructurales a nivel de membrana y pared celular que posiblemente favorecen la adquisición y transformación del hidrocarburo por el tejido durante el proceso de fitorremoción
- En sistemas de fitorremediación en invernadero, los hidrocarburos afectan negativamente el contenido de ácidos grasos en hoja y cormo pero positivamente en raíz, mientras que en cultivos *in vitro*, la presencia de fenantreno afecta negativamente tan solo al contenido de ácidos grasos en cormo pero positivamente en raíz y hoja
  - El metabolismo de *C. laxus* promovió la remoción del 69% de FNN en un sistema de fitorremediación *in vitro* durante un periodo de 21 días, detectando tanto moléculas libres de fenantreno en todos los órganos de la planta como moléculas oxidadas del hidrocarburo cuyas características espectrales fueron similares a estructuras previamente reportadas únicamente para sistemas de biorremediación por hongo: fenantreno *trans* 3,4 dihidrodiol y 9-fenantril-glucopiranosido
  - En presencia de hidrocarburos, el metabolismo de *C.laxus* promueve la síntesis de fenilpropanoides del tipo ácidos benzóicos, cinámicos y coumarinas, así como de flavonoides del tipo quercetina.
  - Los resultados con el sistema *in vitro* usado en este trabajo permiten sugerir que dentro de los mecanismos que las plantas de *C. laxus* utilizan en los sistemas de fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos recalcitrantes, está la formación enzimática de conjugados de los xenobióticos con sus metabolitos fenólicos a través de la formación del complejo EMXH. No obstante, el proceso de remoción también puede involucrar la

formación de los complejos MXH sin la intervención de enzimas, siempre y cuando la concentración de especies reactivas de oxígeno en el sitio sea suficiente para promover la oxidación del xenobiótico

## 12 RECOMENDACIONES PARA INVESTIGACIONES FUTURAS

Desde el punto de vista,

### Químico

- ✓ Estudiar la estructura del conjugado quercetina-fenantreno formado a partir de las reacciones *in vitro* del complejo EMX y MX en presencia de peroxidasa, quercetina y peróxido de hidrógeno y de esta manera dilucidar la forma en que interactúan cada uno de los elementos
- ✓ Identificar en tejido de *C. laxus* crecidos en sistemas de fitorremediación *in vitro*, los metabolitos de oxidación de fenantreno, así como dilucidar su estructura química con el fin de establecer una ruta de degradación del hidrocarburo por esta planta, así como sugerir los mecanismos de transporte del fenantreno y sus metabolitos a través de tejido de la planta

### Bioquímico

- ✓ Verificar la presencia de la estructura Kranz en el tejido de hoja de *Cyperus laxus* y con ello clasificar a la planta en función del tipo de sistema fotosintético: C3 o C4
- ✓ Evaluar el efecto de fenantreno sobre el ondulamiento de la hoja de *C. laxus*: concentraciones, condiciones y mecanismos involucrados

### Microbiológico

- ✓ Establecer sistemas de fitorremediación involucrando la participación de bacteria y planta en cultivos *in vitro*, con el fin de evaluar la participación de cada una de las partes durante el procesos de remoción, así como la viabilidad y efectividad del complejo EMX o MX en estos sistemas.

## 13 PRESENTACIONES EN CONGRESOS

❖ **Fitotratamiento de Suelos Impactados por Derrames de Petróleo: Interacción Entre Hidrocarburos Poli aromático, Fenoles y Enzimas Oxidativas.**

15 Congreso Científico Internacional CNIC 2010  
Del 28 de junio al 1 de julio del 2010 en La Habana, Cuba

Modalidad Oral

❖ **Phenolic metabolites of *Cyperus laxus* might act as chemical mediator in the phytoremediation process of oil spill impacted-sites**

International Symposium on Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies (BATELLE)  
Del 27 al 30 de junio del 2011 en Reno, Nevada

Modalidad Cartel

❖ **Phenolic metabolites, oxidative enzymes and microbial activity in the rizosphere of *Cyperus laxus* in phytoremediation of oil spill impacted-sites process**

Environmental Microbiology & Biotechnology (EMB)  
Del 10 al 12 de abril del 2012 en Bologna, Italia

Modalidad Cartel

❖ **Fenoles y Enzimas oxidativas de *Cyperus laxus* como mediadores metabólicos en sistemas de fitorremediación de suelos impactados con petróleo crudo**

VII Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica  
XVIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica  
Del 28 al 30 de marzo del 2012 en Ixtapa Zihuatanejo, Guerrero México

Modalidad Oral

❖ **Changes In Fatty Acid Composition of *C. laxus* In a Phytotreatment System Of Petroleum-Contaminated Soil**

International Symposium on Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies (BATELLE)  
Del 10 al 13 de junio del 2013 en Jacksonville, Florida

Modalidad Oral

❖ **Perfil y distribución de ácidos grasos en plantas de *Cyperus laxus* cultivadas *in vitro* en presencia de fenantreno**

VIII Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica  
XIX Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica  
Del 9 al 11 de abril del 2014 en Mazatlán, Sinaloa, México

Modalidad Cartel  
Primer Lugar en la presentación de carteles del Área Tecnología Ambiental

❖ **Oxidative Biotransformation of Phenanthrene using Quercetin as Natural Metabolic Mediator**

Environmental Biotechnology and Engineering-2014 (4ISEBE)  
Del 9 al 12 de septiembre del 2014 en México D.F, México

Modalidad Oral

## 14 DIFUSIÓN

Rivera-Casado, N. A., M. C. Montes-Horcasitas, F. J. Esparza-Garcia, A. Ariza-Castolo, O. Gómez-Guzmán, J. Pérez-Vargas and G. Calva-Calva (2010). "Fitotratamiento de suelos impactados por derrames de petróleo: interacción entre hidrocarburos poliaromáticos, fenoles y enzimas oxidativas." CENIC. Ciencias Químicas 41: 1-11.

Rivera Casado, N. A., M. d. C. Montes Horcasitas, R. Rodríguez Vázquez, F. J. Esparza García and A. Ariza Castolo (2013). Changes in fatty acid composition of *C. laxus* in a phytotreatment system of petroleum-contaminated soil. Sirabian RR, Darlington R, editors. Second International Symposium on Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies. Columbus OH: Battelle Memorial Institute: A-72.

Rivera-Casado, N. A., M. C. Montes-Horcasitas, R. Rodríguez-Vázquez, F. J. Esparza-Garcia, A. Ariza-Castolo, O. Gómez-Guzmán, J. Pérez-Vargas and G. Calva-Calva (2012). "Phenolic Metabolites, oxidative enzymes and microbial activity in the rizosphere of *Cyperus laxus* in phytoremediationoil spill impacted-sites process" Phytoremediation and mycoremediation Session. Environmental Engineering and Management Journal. 11: 3 suplement S47

Morales-Navarro, Sarahí Itzel; Rivera-Casado, Noemí Araceli, Calva-Calva, Gracian. "Efecto del antraceno, fenantreno y queroseno sobre la germinación, sobrevivencia, crecimiento y perfil de ácidos grasos y fenoles en plantas de *Cyperuslaxus* cultivadas *in vitro*". Tesis de Licenciatura Químico Farmacéutico Biotecnólogo. UVM campus Coyoacán. Marzo 2015

Rivera-Casado, N. A., M. C. Montes-Horcasitas, R. Rodríguez-Vázquez, F. J. Esparza-Garcia, A. Ariza-Castolo, O. Gómez-Guzmán, R. Ferrera-Cerrato, J. Pérez-Vargas and G. Calva-Calva (2015). "The Fatty Acid Profile Analysis of *Cyperus laxus* Used for Phytoremediation of Soils from Aged Oil Spill.Impacted Sites Revealed that This Is a C18:3 Plant Species". PLOS ONE. DOI: 10.1371/journal.pone.0140103

## 15 REFERENCIAS

- Ahammed, G.J., Yuan, H.L., Ogwen, J.O., Zhou, Y.H., Xia, X.J., Mao, W.H., Shi, K. & Yu, J.Q. (2012). "Brassinosteroid alleviates phenanthrene and pyrene phytotoxicity by increasing detoxification activity and photosynthesis in tomato." *Chemosphere* 86(5): 546-555.
- Alkio, M., Tabuchi, T.M., Wang, X. & Colón-Carmona, A. (2005). "Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in Arabidopsis include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms." *Journal of Experimental Botany* 56(421): 2983-2994.
- Almagro, L., Ros, L.V.G., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Barcelo, A.R. & Pedreno, M.A. (2009). "Class III peroxidases in plant defence reactions." *Journal of Experimental Botany* 60(2): 377-390.
- Arafat, S.M., Gaafar, A.M., Basuny, A.M. & Nassef, S.L. (2009). "Chufa tubers (*Cyperus esculentus* L.) : As a new source of food." *World Applied Sciences Journal* 7(2): 151-156.
- Awad, H.M., Boersma, M.G., Vervoort, J. & Rietjens, I.M.C.M. (2000). "Peroxidase-catalyzed formation of quercetin quinone methide-glutathione adducts." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 378(2): 224-233.
- Baiocco, P., Barreca, A.M., Fabbrini, M., Galli, C. & Gentili, P. (2003). "Promoting laccase activity towards non-phenolic substrates: a mechanistic investigation with some laccase-mediator systems." *Org Biomol Chem* 1(1): 191-197.
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). "A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION." *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37(8): 911-917.
- Bogucka-Kocka, A. & Janyszek, M. (2010). "Fatty acids composition of fruits of selected Central European sedges, *Carex* L. (Cyperaceae)." *Grasas Y Aceites* 61(2): 165-170.
- Bruhl, J.J. & Wilson, K.L. (2007). Towards a comprehensive survey of C3 and C4 photosynthetic pathways in Cyperaceae. *A Journal of Systematic and Evolutionary Botany*, Aliso. 23: 99-148.
- Bryson, C.T. & Carter, R. (2008). The significance of Cyperaceae as weeds. Sedges, uses, diversity, and systematic of the Cyperaceae, Missouri, Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. .15-101
- Burja, A.M., Armenta, R.E., Radianingtyas, H. & Barrow, C.J. (2007). "Evaluation of Fatty Acid Extraction Methods for *Thraustochytrium* sp. ONC-T18." *Journal of Agriculture Food Chemistry* 55: 4795-4801.

- Camarero, S., Canas, A.I., Nousiainen, P., Record, E., Lomascolo, A., Martinez, M.J. & Martinez, A.T. (2008). "P-hydroxycinnamic acids as natural mediators for laccase oxidation of recalcitrant compounds." *Environ Sci Technol* 42(17): 6703-6709.
- Coleman, J.O.D., Blake-Kalff, M.M.A. & Davies, T.G.E. (1997). "Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation." *Trends in Plant Science* 2: 144-151.
- Cheeseman, J.M. (2006). "Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions." *Journal of Experimental Botany* 57(10): 2435-2444.
- Chen, B.L. & Schnoor, J.L. (2009). "Role of Suberin, Suberan, and Hemicellulose in Phenanthrene Sorption by Root Tissue Fractions of Switchgrass (*Panicum virgatum*) Seedlings." *Environmental Science & Technology* 43(11): 4130-4136.
- Debiane, D., Calonne, M., Fontaine, J., Laruelle, F., Grandmougin-Ferjani, A. & Sahraoui, A.L.H. (2012). "Benzo[a]pyrene induced lipid changes in the monoxenic arbuscular mycorrhizal chicory roots." *Journal of Hazardous Materials* 209: 18-26.
- Dhaouadi, Z., Nsangou, M., Garrab, N., Anouar, E.H., Marakchi, K. & Lahmar, S. (2009). "DFT study of the reaction of quercetin with and radicals." *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 904(1-3): 35-42.
- Dixon, R. & Paiva, N. (1995). "Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism." *Plant Cell* 7(7): 1085-1097.
- Dominy, N.J., Vogel, E.R., Yeakel, J.D., Constantino, P. & Lucas, P.W. (2008). "Mechanical properties of plant underground storage organs and implications for dietary models of early hominins." *Evolutionary Biology* 35(3): 159-175.
- Eteshola, E. & Oraedu, A.C.I. (1996). "Fatty acid compositions of Tigernut tubers (*Cyperus esculentus* L.), baobab seeds (*Adansonia digitata* L.) and their mixture." *JAOCS* 73(2): 255-257.
- Ezeh, O., Gordon, M.H. & Niranjana, K. (2014). "Tiger nut oil (*Cyperus esculentus* L.): A review of its composition and physico-chemical properties." *European Journal of Lipid Science and Technology* 116(7): 783-794.
- Fuentes, R.G., Baltazar, A.M., Merca, F.E., Ismail, A.M. & Johnson, D.E. (2010). "Morphological and physiological responses of lowland purple nutsedge (*Cyperus rotundus* L.) to flooding." *Aob Plants*.
- Glew, R.H., Glew, R.S., Chuang, L.-T., Huang, Y.-S., Millson, M., Constans, D. & Vanderjagt, D.T. (2006). "Amino Acid, Mineral and Fatty Acid Content of Pumpkin Seeds (*Cucurbita* spp) and *Cyperus esculentus* Nuts in the Republic of Niger." *Plants Foods for Human Nutrition* 61: 51-56.
- Gorshkova, T.A., Salnikov, V.V., Pogodina, N.M., Chemikosova, S.B., Yablokova, E.V., Ulanov, A.V., Ageeva, M.V., Van Dam, J.E.G. & Lozovaya, V.V. (2000).

- "Composition and distribution of cell wall phenolic compounds in flax (*Linum usitatissimum* L.) stem tissues." *Annals of Botany* 85(4): 477-486.
- Guo, D., Chen, F., Inoue, K., Blount, J.W. & Dixon, R.A. (2001). "Downregulation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase in transgenic alfalfa: impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin." *The Plant Cell* 13(1): 73-88.
- Harris, P.J. & Hartley, R.D. (1980). "Phenolic Constituents of the Cell-Walls of Monocotyledons." *Biochemical Systematics and Ecology* 8(2): 153-160.
- Hautfenne, A. (1982). "Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, 6th Edition - 1st Supplement .5. (1982) Section-iii - Glycerines - Section-iv - Alkaline Soaps." *Pure and Applied Chemistry* 54(6): 1257-1295.
- Hernandez, C.E.L.R., Werberich, D.S. & D'Elia, E. (2008). "Electroenzymatic oxidation of polyaromatic hydrocarbons using chemical redox mediators in organic media." *Electrochemistry Communications* 10(1): 108-112.
- Jeong, S.J., Miyamoto, T., Inagaki, M., Kim, Y.C. & Higuchi, R. (2000). "Rotundines A-C, three novel sesquiterpene alkaloids from *Cyperus rotundus*." *Journal of Natural Products* 63(5): 673-675.
- Johannes, C. & Majcherczyk, A. (2000). "Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems." *Applied Environmental Microbiology* 66(2): 524-528.
- Karkonen, A. & Kuchitsu, K. (2015). "Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants." *Phytochemistry* 112: 22-32.
- Kilani-Jaziri, S., Neffati, A., Limem, I., Boubaker, J., Skandrani, I., Sghair, M.B., Bouhleb, I., Bhourri, W., Mariotte, A.M., Ghedira, K., Dijoux Franca, M.-G. & Chekir-Ghedira, L. (2009). "Relationship correlation of antioxidant and antiproliferative capacity of *Cyperus rotundus* products towards K562 erythroleukemia cells." *Chemico-Biological Interactions* 181(1): 85-94.
- Kilani, S., Ben Sghaier, M., Limem, I., Bouhleb, I., Boubaker, J., Bhourri, W., Skandrani, I., Neffati, A., Ben Ammar, R., Dijoux-Franca, M.G., Ghedira, K. & Chekir-Ghedira, L. (2008). "In vitro evaluation of antibacterial, antioxidant, cytotoxic and apoptotic activities of the tubers infusion and extracts of *Cyperus rotundus*." *Bioresource Technology* 99(18): 9004-9008.
- Kolattukudy, P.E. (1970). "Biosynthesis of cuticular lipids." *Annu. Rev. Plant Physiol.* 21: 163-192.
- Kroumova, A.B., Xie, Z. & Wagner, G.J. (1994). "A pathway for the biosynthesis of straight and branched, odd- and even-length, medium-chain fatty acids in plants." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91(24): 11437-11441.

- Kunst, L. & Samuels, A.L. (2003). "Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax." *Prog. Lipid Res.* 42: 51-80.
- Lessire, R., Hartmannbouillon, M.A. & Cassagne, C. (1982). "Very Long-Chain Fatty Acids - Occurrence and Biosynthesis in Membrane-Fractions from Etiolated Maize Coleoptiles." *Phytochemistry* 21(1): 55-59.
- Liu, H., Weisman, D., Ye, Y.B., Cui, B., Huang, Y.H., Colon-Carmona, A. & Wang, Z.H. (2009). "An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Science* 176(3): 375-382.
- Longoria, A., Tinoco, R. & Vázquez-Duhalt, R. (2008). "Chloroperoxidase-mediated transformation of highly halogenated monoaromatic compounds." *Chemosphere* 72(3): 485-490.
- Lopez-Cortes, I., Salazar-Garcia, D.C., Malheiro, R., Guardiola, V. & Pereira, J.A. (2013). "Chemometrics as a tool to discriminate geographical origin of *Cyperus esculentus* L. based on chemical composition." *Industrial crops and products* 51: 19-25.
- Lundgren, M.R., Osborne, C.P. & Christin, P.A. (2014). "Deconstructing Kranz anatomy to understand C-4 evolution." *Journal of Experimental Botany* 65(13): 3357-3369.
- Ma, W.C., van Kleunen, A., Immerzeel, J. & de Maagd, P.G.J. (1998). "Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by earthworms: Assessment of equilibrium partitioning theory in in situ studies and water experiments." *Environmental Toxicology and Chemistry* 17(9): 1730-1737.
- Martins, S. & Alves, M. (2009). "Anatomical features of species of Cyperaceae from northeastern Brazil." *Brittonia* 61(2): 189-200.
- Martins, S. & Scatena, V.-L. (2013). "Developmental anatomy of *Cyperus laxus* (non-Kranz) and *Fimbristylis dichotoma* (Kranz) (Cyperaceae, Poales) and tissue continuity." *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 85(2): 605-613.
- Miean, K.H. & Mohamed, S. (2001). "Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(6): 3106-3112.
- Mongrand, S., Bessoule, J.J., Cabantous, F. & Cassagne, C. (1998). "The C-16 : 3/C-18 : 3 fatty acid balance in photosynthetic tissues from 468 plant species." *Phytochemistry* 49(4): 1049-1064.
- Morales-Navarro, S.I., Rivera-Casado, N.A., Gómez-Guzmán, O., Pérez-Vargas, J. & Calva-Calva, G. (2014). Cambios fisiológicos y perfil de compuestos fisiológicos y perfil de compuestos fenólicos en plantas de *Cyperus laxus* cultivadas in vitro en presencia de antraceno y fenantreno. Proceedings of the XIX National Congress of Biochemical Engineering, Mazatlán, Sinaloa

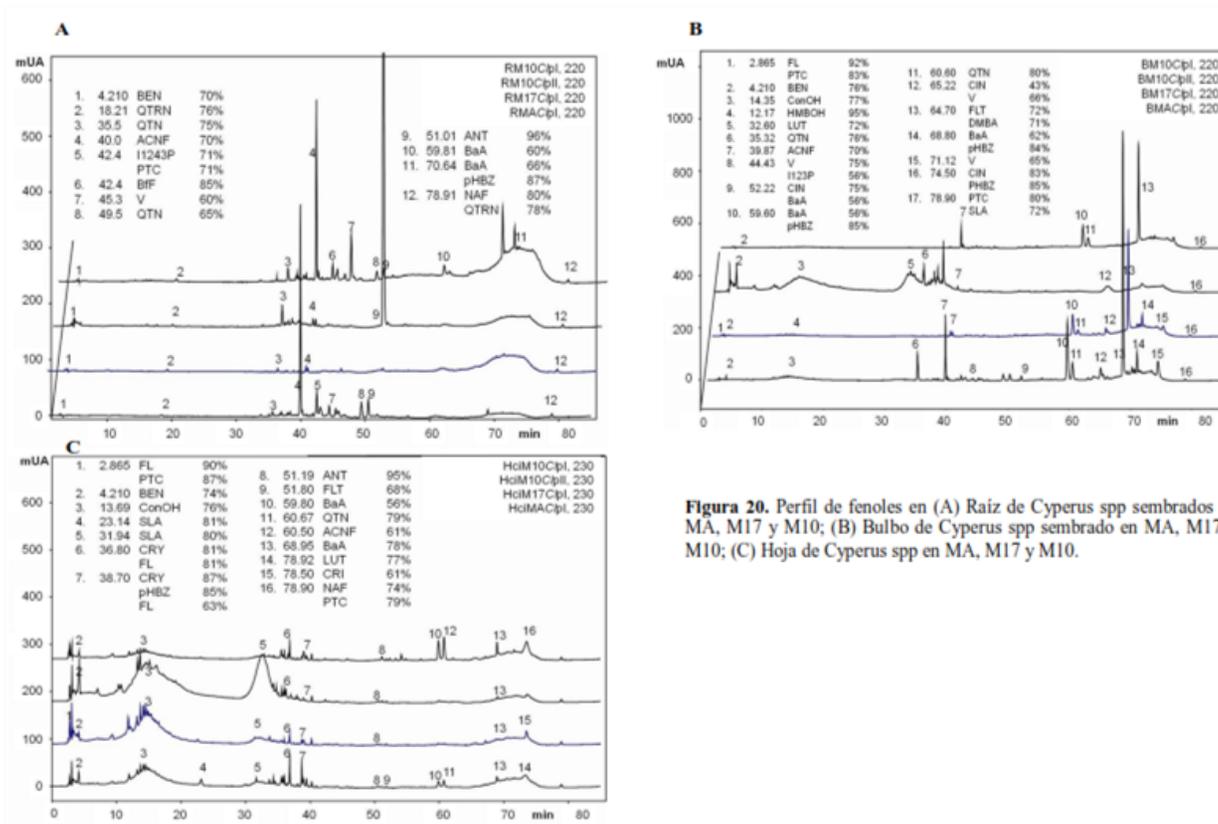
- Narro, M.L., Cerniglia, C.E., Vanbaalen, C. & Gibson, D.T. (1992). "Metabolism of Phenanthrene by the Marine Cyanobacterium *Agmenellum-Quadruplicatum* Pr-6." *Applied and Environmental Microbiology* 58(4): 1351-1359.
- Ohlrogge, J. & Browse, J. (1995). "Lipid Biosynthesis." *The Plant Cell* 7: 957-970.
- Palma-Cruz, F., Esparza-Garcia, F.J., Peña-Cabriales, J.J., Ferrera-Cerrato, R., Poggi-Varaldo, H. & Rodriguez-Vazquez, R. (2004). Changes in the number of plant species in sites from Tabasco, México, chronically polluted with oil. . The First International Meeting on Environmental Biotechnology and Engineering, CINVESTAV, IPN.PAPER IMEBE 152
- Parker, M.L., Ng, A., Smith, A.C. & Waldron, K.W. (2000). "Esterified Phenolics of the Cell Walls of Chufa (*Cyperus esculentus* L.) Tubers and Their Role in Texture." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(12): 6284-6291.
- Pasková, V., Hilscherová, K., Feldmannová, M. & Bláha, L. (2006). "Toxic effects and oxidative stress in higher plants exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and their N-herocyclic derivatives." *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(12): 3238-3245.
- Perr, W.A., Brown, D.e., Tague, B.W., Munday, G.K., Taiz, L. & Murphy, A.S. (2001). "Flavonoid Localization in *Arabidopsis*." *Plant Physiology* 126: 536-548.
- Pollard, M., Beisson, F., Li, Y.H. & Ohlrogge, J.B. (2008). "Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin." *Trends in Plant Science* 13(5): 236-246.
- Prabhu, Y. & Phale, P.S. (2003). "Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation." *Applied Microbiology and Biotechnology* 61(4): 342-351.
- Rawsthorne, S. (2002). "Carbon flux and fatty acid synthesis in plants." *Progress in Lipid Research* 41(2): 182-196.
- Reboreda, R. & Caçador, I. (2008). "Enzymatic activity in the rhizosphere of *Spartina maritima*: Potential contribution for phytoremediation of metals." *Mar. Environ. Res.* 65(1): 77-84.
- Rivera-Casado, N.A. (2009). Relation between phenolic and poliaromatic hydrocarbon profile with oxidative enzymatic activity in the rizosphere of *Cyperus laxus* growth oill-impacted sites Department of Biotechnology and Bioengineering México, CINVESTAV-IPN
- Rivera Casado, N.A., Ariza Castolo, A., Perez Varga, J., Gómez Guzmán, O. & Calva Calva, G. (2014). Oxidative biotransformation of phenanthrene using quercetin as natural metabolic mediator. Fourth International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering, Cinvestav, IPN México D.F, 4ISEBE

- Rivera Casado, N.A., Montes-Horcasitas, M.C., Esparza-Garcia, F.J., Ariza-Castolo, A., Gómez-Guzmán, O., Pérez-Vargas, J. & Calva-Calva, G. (2010). "Fitotratamiento de suelos impactados por derrames de petróleo: interacción entre hidrocarburos poliaromáticos, fenoles y enzimas oxidativas." *Revista CENIC Ciencias Químicas* 41: 1-11.
- Rivera Casado, N.A., Montes Horcasitas, M.d.C., Rodríguez Vázquez, R., Esparza García, F.J., Ariza Castolo, A., Gómez Guzmán, O. & Pérez Vargas, J. (2013). Changes in fatty acid composition of *C. laxus* in a phytotreatment system of petroleum-contaminated soil. Second International Symposium on Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies, Columbus, OH, Battelle Memorial Institute.A-72
- Robards, K. (2003). "Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables." *J Chromatogr A* 1000(1-2): 657-691.
- Sahu, S., Singh, J. & Kumar, S. (2010). "New terpenoid from the rhizomes of *Cyperus Scariosus*." *International Journal of Chemical* 1(1): 25-30.
- Salazar-Aranda, R., Perez-Lopez, L.A., Lopez-Arroyo, J., Alanis-Garza, B.A. & Waksman de Torres, N. (2009). "Antimicrobial and Antioxidant Activities of Plants from Northeast of Mexico." *Evid Based Complement Alternat Med*.
- Sayed, H.M., Mohamed, M.H., Farag, S.F., Mohamed, G.A., Omobuwajo, O.R.M. & Proksh, P. (2008). "Fructose-amino acid conjugated and other constituents from *Cyperus rotundus* L." *Natural Product Research* 22(17): 1487-1479.
- Semple, K.T., Doick, K.J., Jones, K.C., Burauel, P., Craven, A. & Harms, H. (2004). "Defining Bioavailability and Bioaccessibility of Contaminated Soil and Sediments is complicated." *Environmental Science and Technology* 38: 228A-231A.
- Seo, J.S., Keum, Y.S. & Li, Q.X. (2009). "Bacterial Degradation of Aromatic Compounds." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 6(1): 278-309.
- Shaker, M.A., Ahmed, M.G., Amany, M.B. & Sherren, L.N. (2009). "Chufa tubers (*Cyperus esculentus* L.) : As a new source of food." *World Applied Sciencies Journal* 7(2): 151-156.
- Siciliano, S.D. & Germida, J.J. (1998). "Mechanisms of phytoremediation: biochemical and ecological interactions between plants and bacteria." *Environ. Rev.* 6: 65-79.
- Sivapalan, S.R. & Jeyadevan, P. (2012). "Physico-chemical and phyto-chemical study of rhizome of *Cyperus rotundus* LINN." *International Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Technology* 1(2): 42-46.
- Somerville, C.R., Browse, J., Jaworski, J. & Ohlrogge, J. (2000). *Lipids. Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. B. B. Buchanan, Grissem W., Jones R.L., Rockville, MD, American Society of Plant Physiologist. 10: 456-526.

- Stephanopoulos, G.N., Aristidou, A.A. & Nielsen, J. (1998). *Metabolic Engineering. Principles and Methodologies*. San Diego, Academic Press.
- Stoller, E.W. & Weber, E.J. (1974). "Differential Cold Tolerance, Starch, Sugar, Protein, and Lipid of Yellow and Purple Nutsedge Tubers." *Plant Physiol* 55: 859-863.
- Susarla, S., Medina, V.F. & McCutcheon, S.C. (2002). "Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination." *Ecological Engineering* 18: 647-658.
- Sutherland, J.B., Selby, A.L., Freeman, J.P., Evans, F.E. & Cerniglia, C.E. (1991). "Metabolism of Phenanthrene by *Phanerochaete-Chrysosporium*." *Applied and Environmental Microbiology* 57(11): 3310-3316.
- Takahama, U., Hirota, S., Nishioka, T. & Yoshitama, K. (2002). "Oxidation of quercetin by salivary components I. Salivary Peroxidase-dependent Oxidation of quercetin and characterization of the oxidation products." *Food Sci. Technol. Res* 8(2): 148-153.
- Thomas, R., Fang, X.X., Ranathunge, K., Anderson, T.R., Peterson, C.A. & Bernards, M.A. (2007). "Soybean root suberin: Anatomical distribution, chemical composition, and relationship to partial resistance to *Phytophthora sojae*." *Plant Physiology* 144(1): 299-311.
- Torres-Duarte, C., Roman, R., Tinoco, R. & Vazquez-Duhalt, R. (2009). "Halogenated pesticide transformation by a laccase-mediator system." *Chemosphere* 77(5): 687-692.
- Turesson, H., Marttila, S., Gustavsson, K.-E., Hofvander, P., Olsson, M.E., Bülow, L., Stymne, S. & Carlsson, A.S. (2010). "Characterization of oil and starch accumulation in tubers of *Cyperus esculentus* var. *sativus* (Cyperaceae): A novel model system to study oil reserves in nonseed tissues." *American Journal of Botany* 97(11): 1884-1893.
- Veitch, N.C. (2004). "Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme." *Phytochemistry* 65: 249-259.
- Verdoni, N., Mench, M., Cassagne, C. & Bessoule, J.-J. (2001). "Fatty acid composition of tomato leaves as biomarkers of metal-contaminated soils." *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(2): 382-388.
- Wan, Y.Y., Lu, R., Kazuhiro, A., Tetsuo, M. & Du, Y.M. (2007). "Enzymatic synthesis of bioactive compounds by *Rhus* laccase from Chinese *Rhus vemicifera*." *Science in China Series B-Chemistry* 50(2): 179-182.
- Weng, C.C., Keng, C.L. & Lim, B.P. (2004). "Detection of Insect Juvenil Hormone III and its precursors from in vitro plantlets of *Cyperus aromaticus*." *Journal of Plant Biology* 47(3): 187-193.
- Wild, E., Dent, J., Thomas, G.O. & Jones, K.C. (2005). "Direct Observation of Organic Contaminant Uptake, Storage, and Metabolism within Plant Roots." *Environ. Sci. Technol.* 39(10): 3695-3702.

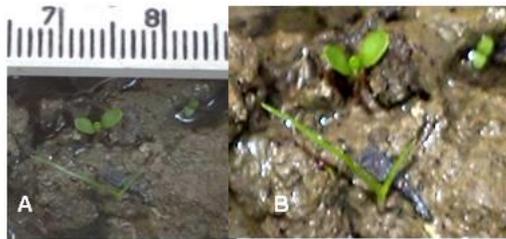
- Winkel-Shirley, B. (2002). "Biosynthesis of flavonoids and effects of stress." *Current Opinion in Plant Biology* 5(3): 218-223.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y. & Ikehara, N. (1997). "Flavonoid-Peroxidase Reaction as a Detoxification Mechanism of Plant Cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>." *Plant Physiology* 115(4): 1405-1412.
- Yan, P.C., Liu, D.Q. & Zheng, B. (2009). "Application of the stepping stress acceleration life test in the product storage life forecast." *Kybernetes* 38(10): 1754-1759.
- Yi, H. & Crowley, D.E. (2007). "Biostimulation of PAH degradation with plants containing high concentrations of linoleic acid." *Environ Sci Technol* 41: 4382-4388.
- Yu-Hong, S. & Yong-Guan, Z. (2007). "Transport mechanism for the uptake of organic compounds by rice (*Oryza sativa*) roots." *Environmental Pollution* 148(1): 94-100.
- YunYang, W., Rong, L., Kazuhiro, A., Tetsuo, M. & YuMin, D. (2007). "Enzymatic synthesis of bioactive compounds by *Rhus* laccase from Chinese *Rhus vernicifera*." *Science in China Series B: Chemistry* 50(2): 179-182.
- Zhan, X.H., Liang, X., Xu, G.H. & Zhou, L.X. (2013). "Influence of plant root morphology and tissue composition on phenanthrene uptake: Stepwise multiple linear regression analysis." *Environmental Pollution* 179: 294-300.
- Zhang, H.Y., Hanna, M.A., Ali, Y. & Nan, L. (1996). "Yellow nut-sedge (*Cyperus esculentus* L.) tuber oil as fuel." *Industrial crops and products* 5: 177-181.
- Zhao, J. & Dixon, R.A. (2009). "MATE Transporters Facilitate Vacuolar Uptake of Epicatechin 3'-O-Glucoside for Proanthocyanidin Biosynthesis in *Medicago truncatula* and *Arabidopsis*." *Plant Cell* 21(8): 2323-2340.
- Zhou, A. & Sadik, O.A. (2008). "Comparative Analysis of Quercetin Oxidation by Electrochemical, Enzymatic, Autoxidation, and Free Radical Generation Techniques: A Mechanistic Study." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(24): 12081-12091.
- Zhu, J., Chen, S., Alvarez, S., Asirvatham, V., Schachtman, D.P., Wu, Y. & Sharp, R.E. (2006). "Cell Wall Proteome in the Maize Primary Root Elongation Zone. I. Extraction and Identification of Water-Soluble and Lightly Ionically Bound Proteins." *Plant Physiol.* 140(1): 311-325.
- Zunino, M.P. & Zygadlo, J.A. (2005). "Changes in the composition of phospholipid fatty acids and sterols of maize root in response to monoterpenes." *Journal of chemical*

**ANEXO 1. Perfil de compuestos fenólicos de *C. laxus* cultivados en suelos contaminados con cargas de 16 000 a 325000 ppm de HTP. Resultados obtenidos en el trabajo de maestría (septiembre 2009)**



**Figura 20.** Perfil de fenoles en (A) Raíz de *Cyperus* spp sembrados en MA, M17 y M10; (B) Bulbo de *Cyperus* spp sembrado en MA, M17 y M10; (C) Hoja de *Cyperus* spp en MA, M17 y M10.

**ANEXO 2. Archivo fotográfico del sistema de fitorremediación de HTP por *C. laxus*. Cultivo en invernadero.**



Plantas germinadas en sitios contaminados S205 y SSR. A partir del banco de semillas traído de Tabasco por Felipe. **(2002-2003)**



Formación biogénica de suelo, propiciada por *Cyperus laxus* (A), *Carex cruz-corvi* (B) y *Cyperus esculentus* (C). Primeras plantas crecidas en suelo contaminado bajo condiciones de invernadero. **(2003 aprox)**

**Plantas crecidas en suelo contaminado con hidrocarburo  
mayo-ago 2008**



Figura 7. Maceta M4 sembrada con *Cyperus esculentus*, *Cyperus laxus*, *Ludwigia peploides* y *Carex Crus-corvi* en suelo de P163 (A). Maceta M13 sembrada con *Cyperus esculentus*, *Cyperus laxus* y *Ludwigia peploides* en suelo de P163 (B). Maceta M9 sembrada con *Cyperus esculentus* y *Cyperus laxus* en suelo de P205 (C). Maceta M23 sembrada con *Cyperus esculentus* y *Carex Crus-corvi* en suelo de P205 (D). Maceta M24 sembrada con *Cyperus esculentus*, *Cyperus laxus*, *Ludwigia peploides* y *Carex Crus-corvi* en suelo de P205 (E). Maceta M26 sembrada con *Cyperus laxus* en suelo de P205 (F). Maceta MA sembrada con *Cyperus laxus* en suelo de jardín cercano a los pozos (G)

# COMPARATIVO PLANTAS S205

2002-2003



MAY 2008



JUN 2011



ENE 2015



# COMPARATIVO PLANTAS SSR

2002-2003



MAY 2008



JUN 2011



ENE 2015



Vista superior de la maceta M17

