

OXIDACION DE *p*-CRESOL CON ABTS PREVIAMENTE OXIDADO CON LACASA

Myrna Solís¹, Mariano García-Garibay¹, Eduardo Bárzana², Gustavo Viniegra-Gonzalez¹. ¹Departamento de Biotecnología, UAM Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, 09340, México D.F., fax 01 55 58 04 64 07, ²Departamento de Alimentos y Biotecnología, Fac de Química UNAM, México, D.F. e-mail moba@xanum.uam.mx.

palabras clave: *p*-cresol, lacasa, ABTS.

Introducción. Los fenoles frecuentemente son sustancias tóxicas, se encuentran en desechos de industrias como la papelera, de pesticidas, tratamiento de madera, química y petroquímica, entre otras (1). Su oxidación es un tema de mucho interés por sus implicaciones ambientales; así, se han probado varios métodos para tratar efluentes industriales contaminados, como son el uso de hipoclorito de sodio, aunque éste tiene el inconveniente que favorece la formación de policlorobencenos, que son carcinogénicos; otro método es con peróxido de hidrógeno (2). También se ha propuesto usar enzimas como peroxidasa y lacasa; ésta última tiene la ventaja de usar oxígeno en lugar de H₂O₂ como aceptor de electrones, pero a veces requiere el uso de mediadores químicos, como el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) o el hidroxibenzotriazol (HBT) (3).

Sin embargo, se sabe poco de la acción de éstos mediadores sobre los sustratos finales, por lo que el objetivo del presente trabajo fue estudiar la oxidación del *p*-cresol con el ABTS oxidado enzimáticamente, en ausencia de la enzima

Metodología. La lacasa, de *Myceliophthora thermophila* expresada en *Aspergillus oryzae* se purificó precipitándola con acetona y se inmovilizó en silicato para obtener ABTS oxidado libre de enzima. Se incubaron diferentes colorantes con ABTS oxidado, sin enzima, y se monitorearon espectro fotométricamente y con cromatografía en placa fina para ver la existencia de reacción química; se usaron placas de sílica 60F₂₅₄ y fase móvil con 35 partes de butanol - 5 partes de etanol y 10 partes de agua. La cinética, estequiometría y seguimiento de la reacción se determinó en el espectrofotómetro a 25 °C.

Resultados y discusión. Inmovilizando la enzima se obtiene una mezcla acuosa de ABTS oxidado y reducido en proporción 40: 60 respectivamente. De la prueba de oxidación de los colorantes, se observó que no sufrieron cambio espectral el amaranto, naranja II, rojo cresol, rojo 4 y trapeolin. Donde sí hubo cambios fue en: *p*-cresol, con el que se forma un compuesto que absorbe a longitud de onda diferente; con el índigo se observa decoloración y desaparición de un pico en el espectro de absorción y con azul coomassie se desplaza el pico de absorción máxima hacia una longitud de onda mayor; se reafirmó que hay reacción usando cromatoplasas. Por conveniencia experimental se eligió al *p*-cresol para ahondar en la cinética del ABTS oxidado. Este compuesto fenólico con ABTS oxidado da origen al menos a dos productos coloridos, uno de ellos es el 4a, 9b-dihidro-8, 9b-dimetil- 3(4H)-

dibenzo furanona (4). Esta reacción no se produce con *p*-cresol y lacasa, ni con *p*-cresol y peróxido de hidrógeno con ácido fosfotúngstico. Al hacer barridos del progreso de la reacción se observó que con *p*-cresol y ABTS oxidado, se consume todo el ABTS oxidado y aumenta el pico en la longitud de onda del ABTS reducido, (figura 1). Si se adiciona 0.5 U/ml de enzima libre, no se consume todo el ABTS oxidado y además hay un incremento de 4 veces en la velocidad de formación de productos, comparado con el sistema sin enzima.

La cinética de consumo de ABTS oxidado con *p*-cresol sigue el modelo: $V_0 = 0.081M^{-0.36} \text{ seg}^{-1} [\text{ABTS ox}] [p\text{-cresol}]^{0.36}$ y la estequiometría es 2 mol de ABTS por mol de *p*-cresol

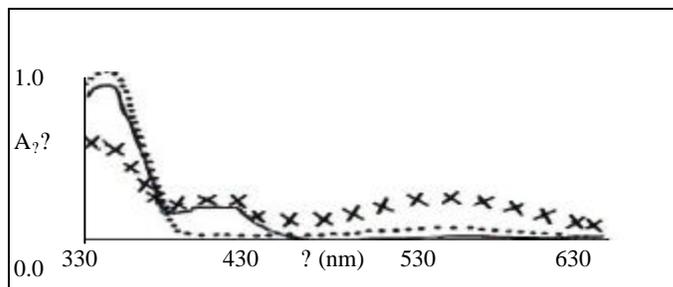


Fig. 1. Espectros de absorción de luz: a) Mezcla de ABTS reducido y oxidado(—) b) *p*-cresol con ABTS oxidado (---) c) *p*-cresol con ABTS oxidado y lacasa (x x x)

Conclusiones. El ABTS oxidado es una especie estable capaz de actuar por sí sola como oxidante. Una ventaja de ello sería el uso del ABTS oxidado en presencia de agentes desnaturizantes de la lacasa. Así además se podría ampliar el espectro de compuestos oxidables por la lacasa. Estos resultados sirven para entender mejor el proceso complejo de oxidación de fenoles catalizado por lacasa usando mediadores; además, esto podría tomarse en cuenta para futuros estudios del reciclamiento del ABTS.

Agradecimiento. A Novo Nordisk por la donación de la enzima lacasa. A CONACyT por la beca número 160303

Bibliografía.

1. Luke, K, Burton, S. (2001). A novel application for *Neurospora crassa*: Progress from batch culture to a membrane bioreactor for the bioremediation of phenols. *Enzyme Microb Tech.* 29 (6-7): 348-356.

2. United States Environmental Protection Agency. (1997). The pulp and paper industry the pulping process, and pollutant releases to the environment. EPA-821-F97-011.
3. Lante, A, Crapisi, A, Krastanov, A, Spettoli P. (2000). Biodegradation of phenols by laccase immobilised in a membrane reactor. *Process Biochem.* 36 (1-2): 51-58.
4. Lloyd, R., Celik, A, Cullis, P, Sangar, R, (2001). Engineering the active site of ascorbate peroxidase. *Biochem Soc.* 29 (2): 105- 110.