

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESPECIALIDAD EN CIENCIAS AMBIENTALES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

**EFFECTO DEL ENDOSULFÁN SOBRE LA ACTIVIDAD DE
GLUTATIÓN S-TRANSFERASA DE *OCIMUM BASILICUM*
L.**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
EN EL AREA DE CIENCIAS AMBIENTALES**

**PRESENTA
Maricela Ramirez Sandoval**

TEPIC, NAYARIT; MAYO 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
ÁREA DE CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS Y PESQUERA
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

CBAP/133/13

Xalisco, Nayarit; 29 de mayo de 2013

Ing. Alfredo González Jáuregui
Director de Administración Escolar
Presente.

Con base al oficio de fecha 07 de mayo de 2013, enviado por los CC. Dr. Jesús Bernardino Velázquez Fernández, Dra Sae Muñoz Hernández, Dra. Abril Bernardette Martínez Rizo, Dra. Verónica Alejandra Mondragón jaimes y M. en C. Adela Yolanda Bueno Durán, donde se nos indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha cumplido con los demás requisitos que pide el Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nayarit, se autoriza a la C. Maricela Ramírez Sandoval, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de Maestría.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

"Por lo Nuestro a lo Universal"



Dr. J. Diego García Paredes
Coordinador del Posgrado

C.c.p.-Expediente.

JDGP/inf.

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Bioquímica Toxicológica a cargo del Dr. Jesús Bernardino Velázquez Fernández y fue parcialmente financiado por el proyecto "Capacidad de biotransformación de plaguicidas organoclorados por plantas típicas del estado de Nayarit con fines de biorremediación" cuyo responsable es el Dr. Jesús Bernardino Velázquez Fernández, financiado por PROMEP.

CONACyT apoyó con la beca para formación de recursos humanos para posgrados PNPC (posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias y Pesqueras) a la estudiante Maricela Ramírez Sandoval con registro 373688 y matrícula 10600086.

Todo lo que sabemos es infinitamente
menos que lo que ignoramos.

William Harvey

Dedicatorias

Dedico este trabajo a aquel que me sostuvo y me amó desde el principio. Al que ama mi alma, a quien me cñó con poder para enderezar mis pasos y me hizo sacar del pozo de desesperación, a quien me rodeó de tantos amigos, quienes fueron como mis hermanos en tiempo de angustia. Gracias, Dios, por tu amor y fortaleza, porque siempre estuviste conmigo cuando pensaba que no lo estabas, Abba Padre gracias!

A mi hijo Uziel, quien siempre estará en mi mente y en mi corazón..... Querido hijo aún más que perderte me duelen más los años que ya no estaré a tu lado, quisiera correr hacia ti, enseñarte lo que he logrado. Hubiera deseado un día más contigo pasar y aunque ya no estés aquí solo espero un día volver a verte.....¡Te veo en el cielo, querido Hijo!

A mi esposo, mi gran amor con patas. Compartimos el mismo dolor pero siempre fuiste fuerte para hacerme fuerte, no puedo ni imaginarme que sería de mí si no estuvieras a mi lado. Gracias por abrazarme, consolarme y apoyarme incondicionalmente en todo el tiempo de la maestría. Son 21 años y aún sigues a mi lado. Te amo cariño, Gracias por tu amor!

A Kim, Asaf y a Derek, los amo profundamente y agradezco a Dios por sus vidas. Son los hijos más maravillosos que Dios me ha dado. Me siento afortunada por sus vidas y por tenerlos a mi lado.

A mi madre Josefina Sandoval por sus oraciones y apoyo en esta etapa de mi vida. A mis hermanos: Rubi, Yesenia (quien me bendice desde el cielo), Saúl, Josué, Raquel y Jhany gracias por creer en mí y animarme.

Agradecimientos

A través de este espacio deseo expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda moral, espiritual y económica han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial al Dr. Jesús Bernardino Velázquez Fernández director de esta investigación, por la orientación y el tiempo aportado a este trabajo.

Mi reconocimiento a la Dra. y amiga Saé Muñoz Hernández por su hospitalidad, paciencia, su gran calidad humana al observar este trabajo y las sugerencias recibidas con la que me encuentro en deuda por el ánimo infundido y la confianza en mí depositada. ¡Dios te haga mil veces más de lo que eres!

También me gustaría agradecer a mis sinodales: Dra. Adelita Bueno, Dra. Verónica Mondragón J. y la Dra. Abril B. Martínez R. por enriquecer con sus observaciones y sus atinadas correcciones el proceso de elaboración del presente trabajo.

Agradezco a la Dra. Delia Domínguez Ojeda por todo su amor y apoyo en los momentos más difíciles de mi vida, gracias por ponerse en mis zapatos, por tratar de animarme, sus oraciones y sus consejos me animaron cuando ni yo misma podía creer en mí. Dios la puso en mi camino y fue la amiga en tiempo de angustia.

Agradezco a Cristina Ornelas Gómez y a su esposo por su amistad incondicional, ¡Gracias Cristy por animarme y escucharme siempre! Valoro en verdad tus invitaciones al café y tus llamadas por teléfono para preguntarme como estaba. Soy muy afortunada de tenerte como amiga.

Agradezco a mis amigos y compañeros de trabajo: Maricela (mi hermanita que siempre me motivó y me retó para terminar lo que creí que nunca lograría), David (quien se preocupaba por darme terapias para que me sintiera mejor), Isabel me escuchabas y me animabas tanto. Dr. Bernabé, Dr. Filipini, Dr. Romero, por su compañerismo y por recibirnos en la sala de maestros como si siempre nos hubieran conocido. A mi Coordinador, Dr. Fernando Cortés por confiar y darme la mano para seguir trabajando, le debo mucho. A la Dra. Leticia Mónica, Alejandrina, Rosy y maestra Juanita, gracias a por todo su apoyo, paciencia y sus consejos.

Agradezco Al Dr. J. Diego García Paredes por su apoyo y paciencia para la culminación de este proyecto. A Rosa E. Fermín quien amablemente me ayudó a agilizar y gestionar los trámites. Gracias amiga!

También agradezco a las siguientes instituciones por apoyarme al proporcionar los espacios para realizar este proyecto de maestría:

Al laboratorio de Bioquímica Toxicológica de la Universidad Autónoma de Nayarit por brindarme la oportunidad de realizar el presente trabajo de investigación.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo y patrocinio para la realización y culminación de esta maestría.

Al Instituto Nacional de Cancerología y a la Universidad Nacional Autónoma de México, por la estancia de investigación que me permitieron realizar en sus espacios.

Al CBAP y a todos mis maestros, por brindarme la oportunidad de realizar esta maestría en sus instalaciones y regalarme de sus conocimientos.

A todos ellos, muchas gracias.

Índice general

| | Pág. |
|--|------|
| 1.- Introducción | 1 |
| 2.- Marco teórico | 1 |
| 2.1 La fitorremediación | 1 |
| 2.2 La planta <i>Ocimum basilicum</i> como biorremediadora | 5 |
| 2.3 El plaguicida organoclorado endosulfán | 6 |
| 2.4 La enzima de biotransformación glutatión S-transferasa | 8 |
| 3. Planteamiento del problema | 10 |
| 4. Justificación | 10 |
| 5. Hipótesis | 11 |
| 6. Objetivos | 12 |
| 6.1 Objetivo general | 12 |
| 6.2 Objetivo específico | 12 |
| 7. Material y Métodos | 12 |
| 7.1 Reactivos | 12 |
| 7.2 Exposición de <i>O. basilicum</i> al plaguicida | 12 |
| 7.3 Extracto enzimático | 13 |
| 7.3.1 Extracto de la planta | 13 |
| 7.3.2 Muestra del consorcio bacteriano de la rizósfera | 13 |
| 7.4 Actividad de la GST | 14 |
| 7.5 Determinación de proteínas totales | 14 |
| 7.6 Análisis estadístico | 15 |
| 8. Resultados | 16 |
| 9. Discusión | 19 |
| 10. Conclusiones | 24 |
| 11. Prospectivas | 24 |
| 12. Bibliografía | 25 |

Índice de tablas

| | Pág. |
|---|------|
| Tabla 1. Comparación de ventajas y desventajas de algunas técnicas de remediación ambiental. | 3 |
| Tabla 2. Fases de biotransformación de contaminantes | 8 |
| Tabla 3. Actividad de GST en <i>O. basilicum</i> L. y su rizósfera | 21 |

Índice de figuras

| | Pág. |
|---|------|
| Fig. 1. Modelo de una planta fitorremediadora y sus posibles mecanismos | 4 |
| Fig. 2. Estructura química del endosulfán | 6 |
| Fig. 3. Modelos de reacciones catalizadas por GST | 9 |
| Fig. 4. Actividad de GST en hojas de <i>O. basilicum</i> L. expuesta a endosulfán | 16 |
| Fig. 5. Actividad de GST en raíz de <i>O. basilicum</i> L. expuesta a endosulfán | 17 |
| Fig. 6. Actividad de GST en tallo de <i>O. basilicum</i> L. expuesta a endosulfán | 18 |
| Fig. 7. Actividad de GST en la planta <i>O. basilicum</i> L. expuesta a endosulfán | 18 |
| Fig. 8. Actividad de GST en rizósfera de <i>O. basilicum</i> L. expuesta a endosulfán | 19 |

RESUMEN

La fitorremediación es una estrategia para eliminar o disminuir los efectos indeseables de los contaminantes en el ambiente. Esta tecnología puede potenciarse si se conocen los mecanismos por la que ocurre. Previamente en nuestro laboratorio, hemos encontrado que la planta *Ocimum basilicum* L. tiene un efecto fitorremediador de endosulfán, un plaguicida tóxico persistente en el ambiente. Para optimizar la fitorremediación de endosulfán por *O. basilicum* L. nos proponemos estudiar uno de los posibles mecanismos involucrados, la actividad de la enzima Glutación S-Transferasa (GST). Se ha descrito que GST está involucrada como parte de la defensa de las plantas hacia compuestos exógenos. De esta manera, estudiamos la posible variación de la actividad de la GST en las partes de la planta: rizósfera, raíz, tallo y hoja. Para evaluar lo anterior, se expusieron experimentalmente plántulas de *O. basilicum* a diferentes concentraciones de endosulfán (0, 10, 100 ó 1,000 mg/Kg de suelo). Los resultados nos sugieren que la actividad de GST se encuentra involucrada en la respuesta de la planta y probablemente en el mecanismo fitorremediador de *O. basilicum* hacia endosulfán. Esta respuesta depende del órgano estudiado y de la concentración del endosulfán.

1. Introducción

A aquellos compuestos o agentes que alteran la homeostasis del ambiente, y que ponen en riesgo la salud o bienestar del ecosistema, se les denomina contaminantes (Williams, 2001). Algunos desequilibrios de los ecosistemas como la quema de bosques y pastizales, pueden ser resueltos de manera natural. Sin embargo, cuando el deterioro es extenso, como por ejemplo cuando ocurren los derrames de petróleo o intenso como el rápido incremento de plaguicidas moderadamente persistentes o recalcitrantes, estos deterioros ambientales no son naturalmente superados en los tiempos de vida del humano (Alexander, 1999). En estos casos, es posible utilizar ciertas tecnologías que ayuden a disminuir los efectos de los contaminantes. Entre estas tecnologías se encuentra la fitorremediación, que utiliza plantas para remediar el ambiente. Las plantas utilizan diversos mecanismos para hacerlo, entre ellos, se encuentran sus respuestas bioquímicas, fisiológicas o ecológicas. Entre éstas se puede mencionar, el incremento de enzimas de biotransformación que contienen con los contaminantes o el confinamiento de los mismos en las vacuolas de las hojas o la estimulación de los organismos del suelo por los nutrientes contenidos en los exudados de la raíz de la planta. En nuestro laboratorio, hemos encontrado que la albahaca (*Ocimum basilicum* L.) tiene la capacidad de biorremediar al plaguicida organoclorado endosulfán. El mecanismo fitorremediador falta por elucidarse. Durante el desarrollo del presente trabajo se investigaron dos posibles mecanismos biorremediadores: por un lado, la posible inducción de la enzima de biotransformación denominada Glutatión S-Transferasa en la planta y, por otro, la posible fitoestimulación de la planta sobre los microorganismos del suelo.

2. Marco teórico

2.1 La fitorremediación

La fitorremediación es una estrategia de remediación ambiental en donde se utilizan plantas para disminuir o eliminar los efectos indeseados de los

contaminantes en el ambiente (Velázquez-Fernández y col., 2012). Se considera como una tecnología sustentable ya que es económicamente viable, eficaz en el rango de meses y compatible con el ambiente, lo cual le ha otorgado mayores ventajas con respecto a otras técnicas de Ingeniería de remediación (Frick y col., 1999, EPA, 2012). La fitorremediación inició su desarrollo como tecnología en los 70's, cuando se utilizó para la purificación de los suelos y agua contaminados, principalmente en la recuperación de suelos de yacimientos mineros abandonados. En la década de los 90's, surge el concepto de fitorremediación y es entonces reconocido como nueva tecnología (Barceló y Poschenrieder, 2003; Williamson y Johnson, 1981). Ya se han observado varios ejemplos del uso de la fitorremediación, por lo que la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (EPA) la ha recomendado como una tecnología adecuada para la remediación ambiental (EPA, 2012). Se ha mostrado la capacidad de las plantas para biorremediar contaminantes como plaguicidas (Germaine y col., 2006) y metales (Lone y col., 2008). Debido a esta versatilidad y a las características de las plantas, la fitorremediación presenta ventajas y desventajas. Una de las principales desventajas es que pueden poner en riesgo la cadena alimenticia si se utilizan plantas que sean de uso comercial. Sin embargo, y como se ha sugerido (Yadav y col., 2010), se podrían utilizar plantas modificadas genéticamente lo que podría subsanar algunas desventajas y aprovechar los beneficios. De esta manera, la fitorremediación presenta más ventajas que otras tecnologías de remediación como las fisicoquímicas (tabla 1).

La fitorremediación conduce a la transformación, degradación, volatilización o inmovilización del contaminante (Velázquez-Fernández y col., 2012). Esto puede ocurrir por la acción de la planta misma o de los microorganismos que se encuentran adheridos a sus raíces. Al microecosistema asociado a las raíces de las plantas se le llama rizósfera (Walker y col., 2003). Tanto ésta como la planta pueden intervenir en la fitorremediación, es decir, la fitorremediación ocurre por la acción de la planta, su rizósfera o la combinación de ellas. Se considera que los mecanismos de la fitorremediación son aquéllos que ocurren a través de los procesos fisiológicos o bioquímicos realizados por las plantas y su rizósfera. El

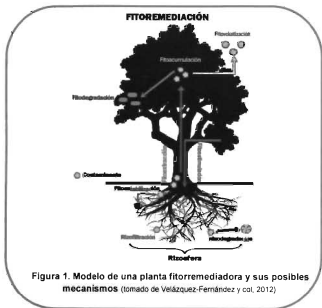
confinamiento en vacuolas, la rizoestimulación o fitoestimulación, la fitovolatilización, la fitoestabilización, la rizofiltración y la fitoextracción (Fig. 1) son algunos de los procesos fisiológicos que pueden llevar a un efecto fitoremediatorio sobre contaminantes.

Tabla 1. Comparación de ventajas y desventajas de algunas técnicas de remediación ambiental.

| | | Remediación físicoquímica y térmica | Microbio-remediación | Fito-remediación |
|--|---|-------------------------------------|----------------------|------------------|
| Ventajas/Desventajas | | | | |
| | Costo | Alto | Bajo | Bajo |
| | Relación beneficio/costo | Bajo | Alto | Alto |
| | Amigable con el ambiente | No | Si | Si |
| | Estético | No | A veces | Si |
| | Sostenible | No | Si | Si |
| | Gasto energético | Si | Bajo | Bajo |
| | Depende del tipo de organismo biorremediador y sus características | NA | Si | Si |
| | Usa el metabolismo de varios organismos. | No | A veces | Si |
| Puede ser usado para biorremediar | | | | |
| | Suelo | Si | Si | Si |
| | Agua | Si | Si | Si |
| | Aire | NK | Si | Si |
| Requerimientos | | | | |
| | Infraestructura específica | Si | A veces | No |
| | Se requieren tratamientos posteriores a los residuos | Si | No | No |
| | Se requiere control biológico o disposición de los microorganismos | No | Si | No |
| | Tiempos | Cortos | Mediano | Largo |
| | Se requiere investigación de los organismos biorremediadores | NA | Si | Si |
| | Se puede aplicar in situ | A veces | A veces | Si |
| Puntos clave | | | | |
| | Debe evitarse bioaumentación | No | Si | Si |
| | Se debe volver aplicar o se debe evitar posteriores producciones de contaminantes | Si | A veces | No |
| | Se requiere añadir sustrato | NA | A veces | No |
| | Se debe cuidar la oxigenación | A veces | A veces | No |
| | Se debe ajustar según el tipo de contaminantes | A veces | Si | Si |

(EPA, 2000; Agudelo y col., 2005; Núñez y col., 2004; Sauer y Trevors, 2008; Delgado-López y col., 2011; Velázquez-Fernández y col., 2012)

La acción de enzimas de biotransformación sobre los contaminantes son los principales agentes encargados de los mecanismos bioquímicos en la fitorremediación. Esta biotransformación puede provenir del metabolismo vegetal o el microbiano. Así, la fitoacumulación y la fitodegradación se basan en la acción de una o varias enzimas de la planta, por otra parte la rizodegradación es llevada a cabo por la rizósfera. La capacidad de biotransformación o biodegradación, varían con la planta pues cada especie tiene su bioquímica y fisiología característica. Si bien hay ciertas generalidades que se comparten entre todas las plantas, las capacidades de biotransformación o biorremediación son diferentes según sea la planta utilizada y el contaminante al que podrían hacer frente.



2.2 La planta *Ocimum basilicum* como biorremediadora

En estudios previos en nuestro laboratorio, observamos que *Ocimum basilicum* L. (albahaca), disminuye en un 37% la concentración de endosulfán cuando éste se expone al contaminante por espacio de 30 días (Ramírez-Sandoval y col., 2011). Se estudió la planta albahaca debido a que presenta características que se podría esperar de un agente biorremediador. Un buen candidato para biorremediador sería aquél capaz de crecer en suelo contaminado y que no altere la homeostasis ecológica. Esto es, que el agente no represente una amenaza a otros organismos o provoque un deterioro al ambiente. Es por eso que las plantas resultan candidatas adecuadas, sobre todo aquéllas que se encuentren presentes en el ecosistema, porque ello significa que el ecosistema ya regula la población y el impacto de la planta. Es decir, se debe evitar la bioaumentación, en otras palabras, se debe evitar agregar especies nuevas al ecosistema puesto que dichas especies podrían resultar una amenaza al ambiente. *Ocimum basilicum* cumple con estas características, ya que se adapta fácilmente al ambiente, no se reproduce agresivamente y tiene efectos repelentes para algunos insectos (Zheljazkov y col. 2008).

Ocimum basilicum L., mejor conocida como albahaca de hoja grande es una hierba aromática anual de la familia de las *Lamiaceae*, nativa de Irán, India y otras regiones tropicales de Asia, donde es cultivada hace más de 5.000 años. La albahaca fue introducida a México durante la época colonial, para después extenderse de manera silvestre por casi toda la República (Melchor, 2009). Es cultivada como especie perenne en climas tropicales y de crecimiento bajo (entre 30-130 cm). Las hojas se ubican de forma opuesta, con tonalidad de un verde intenso al frente y verde grisáceo por el envés, son ovales, dentadas y de textura sedosa; una planta puede medir entre 3 y 11 cm de largo por 1 - 6 cm de ancho, son plantas muy sensibles a las heladas. Emite espigas florales terminales, con flores tubulares de color blanco o violáceo las cuales, a diferencia del resto de las *lamiáceas*, tienen los cuatro estambres y el pistilo apoyados sobre el labio inferior de la corola.

Como se mencionó anteriormente, se sabe que *O. basilicum* L. puede repeler a algunas especies de insectos, por lo que se estima que podría tener alguna propiedad plaguicida, esto resulta interesante ya que plantas que crecen a su alrededor son beneficiadas por sus propiedades, lo que contribuiría al proceso de biorremediación. La albahaca es muy fácil de cultivar, además de ser económica y reproducible; en invernadero crece todo el año y las condiciones climáticas del estado de Nayarit benefician considerablemente su desarrollo. Lo anterior convierte a la *Ocimum basilicum* L. en una excelente candidata para biorremediar al plaguicida organoclorado, endosulfán, que es ampliamente utilizado en el estado.

2.3 El plaguicida organoclorado endosulfán

El endosulfán es un plaguicida organoclorado, que pertenece al grupo de los ciclodienos. Su fórmula empírica es $C_9H_6Cl_6O_3S$ y el peso molecular de 406.95 g/mol. El producto técnico final es mezcla de dos isómeros, alfa y beta, en relación aproximada 70:30 (ATSDR, 2004) (Fig. 2). El endosulfán se utiliza ampliamente para fines agrícolas sobre una gran variedad de cultivos como café, té, cereales, algodón, oleaginosas, hortalizas, cítricos, frutas, ornamentales y tabaco, para el control de áfidos, escarabajos, gorgojos, mosca tse-tse, saltahojas, pulgas, perforadores y ácaros, entre otros (Harikrishnan y Usha, 2004).

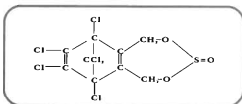


Fig. 2. Estructura química del endosulfán.

En abril del 2011, el endosulfán fue incluido oficialmente en la Convención de Estocolmo dentro de los contaminantes orgánicos persistentes, porque es tóxico, persistente, bioacumulativo y se mueve ambientalmente grandes distancias (POPS, 2012). El endosulfán se ha encontrado en suero humano, en muestras ambientales de agua, en organismos y áreas agrícolas de diversos países durante la última década (Carreño y col., 2007; Chopra y col., 2010; Liu y col., 2010). Particularmente en el caso del estado de Nayarit, se ha utilizado para control de plagas en cultivos de arroz y su venta al público es libre (SAGARPA, 2004). El endosulfán puede permanecer por años en el ambiente y presenta movilidad ambiental. Se ha observado en los grandes lagos de Canadá, muy lejos de cualquier sitio de contaminación industrial o urbana. De esta manera, no resulta extraño que se le haya encontrado en distintas muestras ambientales de Nayarit, tanto en agua de esteros y ríos, como en organismos acuáticos (Robledo y col., 2011).

El endosulfán provoca efectos dañinos en insectos que son sus organismos diana pero también en otros animales (POPS, 2011). En mamíferos, afecta el sistema nervioso central, hígado, riñón y sistema inmune (Silva y Beauvais, 2010; Harikrishnan y col., 2004; ATSDR, 2004). En el humano, causa desórdenes físicos congénitos, retraso mental y muerte (POPS, 2011).

Se conoce poco sobre la biodegradabilidad del endosulfán y aún menos, sobre las enzimas relacionadas con su biotransformación y de los plaguicidas organoclorados en general. En buena parte, la recalcitrancia del endosulfán y de los plaguicidas organohalogenados se debe a la presencia misma de los átomos de halógenos en la molécula. Cuando éstos átomos son separados de la molécula generan radicales libres, ácidos halogenado que resultan dañinos para las enzimas que los puedan degradar. Entre las enzimas que tienen la capacidad de conducir a la deshalogenación de compuestos organoclorados se encuentra la Glutatión S-transferasa (GST), cuya participación en la respuesta a plaguicidas ha sido reportada para muchos organismos (Hatton y col., 1999; Labrou y col., 2004; Scarponi y col., 2006; Schröder y col., 2007; Velázquez-Fernández y col. 2012).

2.4 La enzima de biotransformación glutatión S-transferasa

Las enzimas de biotransformación juegan un papel central en los mecanismos bioquímicos involucrados en la fitorremediación (Dixon y cols, 2002; Frova C, 2003). Tradicionalmente, las fases de la biotransformación se han dividido en tres (tabla 2) de acuerdo al proceso bioquímico que se lleva a cabo y en los que participan diferentes enzimas. La Glutatión S-Transferasa es uno de los pocos ejemplos de enzimas que pueden verse involucradas en las tres fases. Lo cual resulta muy interesante, en especial porque esta enzima se encuentra evolutivamente conservada (Frova, 2003; Sawicki y col., 2003).

Tabla 2. Fases de biotransformación de contaminantes

| Fase | Proceso bioquímico involucrado |
|----------|---|
| Fase I | Conversión de grupos funcionales: (deshalogenación, oxidación, reducción, hidrólisis) |
| Fase II | Conjugación con grupos (por ejemplo, glutatión, azúcares, aminoácidos) |
| Fase III | Compartmentalización (usualmente de conjugados) |

Las Glutation S-Transferasas ó GSTs, desempeñan un papel clave en la fase II de desintoxicación enzimática (Habig y Jakoby, 1981). Las GSTs son proteínas dimericas multifuncionales que catalizan la transferencia de glutatión (GSH) a compuestos electrofilicos. Esto puede generar un producto que sea un conjugado (denominado GSX) de GSH con el compuesto, o una porción de él (Dixon y col, 2002). De esta manera, la acción enzimática de la GST puede conducir a una reacción de alquilación, deshalogenación (Fig. 3) e incluso actividad de peroxidasa (Velázquez-Fernández y col., 2012).

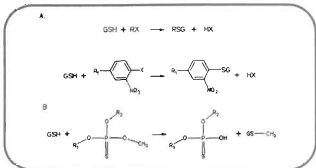


Fig. 3. Modelos de reacciones catalizadas por GST. Se muestran las reacciones de deshalogenación (A) y O-dealquilación (B). (Tomado de Velázquez-Fernández y col., 2012).

Las GSTs son proteínas que se encuentran conservadas en los diferentes reinos: animal, vegetal y fungi. Se han descrito varias clases de GSTs: α (alfa), δ (delta), μ (mu), κ (kappa), θ (teta), ζ (zeta), π (pi), τ (tau), ω (omega) y microsomal. Las clases zeta, teta y omega es posible encontrarlas en animales y plantas, mientras que las clases pi y tau son exclusivas de las plantas (Labrou y col., 2004). La clase pi presenta actividad enzimática de desintoxicación de herbicidas, mientras que tau puede ser inducida por ataque de patógenos, metales pesados, daño oxidativo y estrés térmico (Frova, 2003).

En los animales, donde ha sido más estudiada la GST, se considera que su función principal es desintoxicar compuestos exógenos. Sin embargo, en plantas su función está principalmente relacionada a la regulación hormonal y al metabolismo secundario de antocianinas, aunque también participa en la desintoxicación de herbicidas (Marrs, 1996; Dixon y col., 2002). De esta manera,

en plantas, la GST es parte del mecanismo de respuesta a varios estímulos como el estrés oxidativo, el ataque de patógenos y la toxicidad de metales pesados y plaguicidas (Dixon y cols., 2002). Por ejemplo, en maíz y trigo, se determinó un incremento en la actividad de GST después del tratamiento con los herbicidas butacloro y terbutilazina (Scarponi y col., 2006). Además, se ha demostrado que algunos GSX son transportados a las vacuolas para confinamiento de xenobióticos (Dietz y Schnoor, 2001). Tomando en cuenta todo lo anterior, GST parece jugar un papel en los mecanismos bioquímicos involucrados en la biorremediación.

3. Planteamiento del problema

El endosulfán es un plaguicida persistente en el ambiente y puede provocar daños físicos, mentales e incluso la muerte. Esto, aunado a que el plaguicida puede movilizarse en el ambiente, convierte al plaguicida en un peligro a la salud y al ambiente (POPS, 2011).

En Nayarit, como en el resto del país, actualmente no existe restricción sobre el uso de endosulfán a pesar de su toxicidad y persistencia ambiental. Es preocupante el hecho que dentro del grupo de los pesticidas organoclorados, el endosulfán ocupa el primer lugar de ventas en el estado de Nayarit (González, 2008), lo cual ocasiona una disponibilidad elevada en el ambiente y como resultado se genera una alta exposición de la población al mismo. Por su toxicidad, su presencia en el ambiente y la falta de restricción para su uso, se deben establecer estrategias para su remediación. En este trabajo, nosotros proponemos el proceso de fitorremediación como una probable estrategia de destoxificación de suelos contaminados con endosulfán.

4. Justificación

La fitorremediación posee un papel significativo dentro de los mecanismos de desintoxicación de contaminantes en el ambiente. A nivel internacional se ha hecho un llamado para implementar estrategias viables y sustentables que contrarresten, disminuyan o eliminen contaminantes de uso cotidiano, tales como el endosulfán.

En un estudio previo, nosotros determinamos la capacidad de *Ocimum basilicum* L. para disminuir la concentración de endosulfán en suelo en periodos de tiempos cortos; sin embargo, no fue posible determinar el mecanismo fitorremediador. El conocer dichos mecanismos permitiría, posteriormente, potenciar el efecto fitorremediador o bien, reducir el tiempo de descontaminación utilizado por la planta.

La biodegradación enzimática mediada por plantas constituye una herramienta útil para la investigación sobre fitorremediación. Se sabe que tanto las plantas como los organismos de la rizósfera poseen actividad de GST y es probable que la capacidad fitorremediadora de *O. basilicum* L. se deba a la acción de éstas enzimas. Debido a lo anterior, nos interesa estudiar en *O. basilicum* L. la actividad de GST de la planta y su rizósfera, para elucidar los mecanismos de fitorremediación contra el endosulfán.

5. Hipótesis

La actividad de la enzima Glutación S Transferasa en *Ocimum basilicum* L. y en su rizósfera cuando se expone a suelo contaminado con endosulfán es responsable del mecanismo fitorremediador vía confinamiento del plaguicida.

5. Objetivos

6.1 Objetivo general

Estudiar la actividad de la enzima Glutación S-Transferasa en la planta *Ocimum basilicum* L. y su rizósfera en suelo contaminado con endosulfán.

6.2 Objetivo específico

1. Determinar la actividad de la Glutación S-Transferasa en hojas, tallo y raíz y consorcios microbianos de la rizósfera de la planta *Ocimum basilicum* L. experimentalmente contaminada con endosulfán.

7. Material y Métodos

7.1 Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico, el endosulfán se obtuvo en una casa comercial bajo el registro de Thiodan®BAYER (de libre venta en Nayarit), 1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno (CDNB) (#Cat. 136630) y L-glutatión reducido (GSH, #Cat. G4251) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. El estándar de proteínas Albúmina sérica bovina (BSA, fracción V, Cohn modificado, pH 5.2, #Cat 12660) fue adquirido de Calbiochem.

7.2 Exposición de *O. basilicum* al plaguicida

Con base en el principio activo (35%) de endosulfán (Thiodan® Bayer), se calculó el volumen para obtener concentraciones de 10, 100 y 1000 mg. Las concentraciones de endosulfán se emplearon para pre-tratar la tierra y prepararla para su uso experimental. La tierra en la que se cultivó *O. basilicum* L. se pretrató a diferentes concentraciones de endosulfán: 0, 10, 100 y 1000 mg de endosulfán/kg de tierra. Cabe mencionar que de éstas, la de 10 mg/kg de tierra es semejante a las concentraciones que se alcanzan en el uso agrícola del insecticida. La de 100 mg/kg se utiliza para ensayos de biorremediación en plaguicidas, y utilizamos la de 1000 mg/kg para lograr un efecto de sobrecarga o saturación del plaguicida sobre el microecosistema en el suelo. Posterior a la adición del endosulfán, se homogeneizó y se procedió a plantar los ejemplares con 5 días de crecimiento y menores a 2 cm de altura. Los cultivos se mantuvieron en invernadero a temperatura ambiente (con malla sombra) por 15 días. El tiempo de exposición de las plantas al suelo con endosulfán fue de 15 días. Al término de esta temporada se colectaron las muestras para los ensayos de GST.

7.3 Extracto enzimático

7.3.1 Extracto de la planta

La extracción de la GST se realizó mediante una modificación de la técnica de Scarponi y col., (2006). Brevemente, se pesaron 6gr de *O. basilicum* L. (se utilizó de manera independiente tallo, raíz, hoja), se pulverizaron en un mortero con nitrógeno líquido, el polvo se suspendió con 30 mL de buffer intermediario de la extracción, para generar un homogenizado (1:5 w/v; Tris 100 mM pH 7.5, EDTA 2 mM, DTT 1 mM y PVP 15 g/L). Posteriormente se filtró dos veces con dos capas de muselina, el homogenizado se centrifugó a 7,000 rpm por 50 min. A partir de aquí, a este sobrenadante se le llamará extracto enzimático. Este extracto se mantuvo en refrigeración hasta la determinación de la actividad enzimática de GST.

7.3.2 Muestra del consorcio microbiano de la rizósfera

Después del crecimiento de la planta, ésta se separó del suelo, se tomaron 5 g de suelo adherido a la raíz y se inocularon en 10 mL de caldo Luria Bertani, el cultivo se incubó a 37° C por 24 horas. De este medio de cultivo se tomó directamente la muestra para la determinación de la actividad de la Glutation S-Transferasa. Los experimentos se realizaron por triplicado.

7.4 Actividad de la GST

La determinación de la actividad de GST se realizó según el procedimiento de Scarponi y col., (2006); se tomó como sustrato estándar al CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno). La determinación fue previamente estandarizada por nuestro grupo de trabajo (Cota, 2010). Este ensayo mide el cambio de absorbancia del producto CDNB al ser conjugado con GSH por la enzima GST para la formación del tioéster, en donde el pico máximo de absorbancia se presenta a 340 nm. Para la reacción se agregaron: 25 µL de CDNB 40 mM, 900 µL del amortiguador $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.1 M (pH 6.5), 50 µL GSH 0.1 M (pH 7.0). Se midió la

absorbancia (basal) cada minuto durante 3 min. Posteriormente, se añadieron 40 μL del extracto enzimático o el cultivo bacteriano y se midió el cambio de absorbancia cada minuto durante tres minutos a 340 nm. De dichos datos se calcula el promedio del cambio de absorbancia por minuto con y sin la enzima. Al cambio de absorbancia con la muestra enzimática se le restó el cambio de absorbancia basal. A partir de dicho dato se calculó la actividad enzimática utilizando el coeficiente de extinción molecular del producto ($9,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Habig y Jakoby, 1981). La actividad enzimática está expresada en nmoles de producto/(min·mg de proteína total del extracto).

7.5 Determinación de proteínas totales

Para esta determinación se utilizan tres soluciones: solución A (NaOH 2 g, Na_2CO_3 10 g, tartrato de sodio y potasio 0.134 g, aforado a 500 mL con agua), solución B (Sulfato cúprico al 0.5%) y solución de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich). La determinación de la proteína total, se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu. La concentración de proteína se calcula a partir de una curva estándar con BSA a diferentes concentraciones conocidas que van desde 0.001 a 1.5 mg/mL. La concentración de proteína en la muestra se calcula a partir de la interpolación de la absorbancia observada a 750 nm de la muestra en la curva estándar. En microplacas de 96 pocillos se hicieron reaccionar 40 μL de muestra (o estándar) con 200 μL del reactivo de Lowry (preparado de partes iguales de la sol. A y la sol. B) y se agitó. Después de incubar por 10 min a temperatura ambiente, se agregaron 20 μL del reactivo Folin-Ciocalteu. Se incubó por 30 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 750 nm en el lector para microplacas μQuant Biotek. Cada determinación se realizó por duplicado para cada muestra de cada tratamiento.

7.6 Análisis estadístico

-

-

Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar (DS). Los ensayos se hicieron por triplicado. Se realizó el análisis por ANOVA de una vía, seguido de un análisis por Bonferroni. Para comparación entre grupos, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como significativo.

8. Resultados

8.1 Actividad de GST en *O. basilicum* L.

La actividad de la GST de las hojas de los ejemplares de *O. basilicum* L. mostró una variabilidad de acuerdo a la concentración de endosulfán (Fig. 4). Se determinó una mayor actividad enzimática a la concentración de exposición de 10 mg/Kg. Por arriba de esta concentración, la actividad de GST en hojas es inversa a la concentración de endosulfán en suelo, esto es, a mayor concentración de endosulfán en suelo, menor actividad de GST.

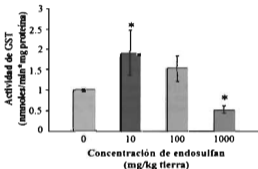


Fig. 4. Actividad de GST en hojas de *O. basilicum* L. expuesta a endosulfán. El pico máximo de actividad de GST en hojas se observa a la concentración de 10 mg/kg de endosulfan en suelo. ANOVA, * $P < 0.05$ respecto al control (0 mg/kg). (n=3)

Cuando la determinación de la actividad de GST se determinó en la raíz de la planta, observamos que de manera similar a la actividad encontrada en hojas: el pico máximo se presenta cuando la exposición se da a la concentración de 10 mg/kg de endosulfan en tierra (fig. 5). A mayores concentraciones no se observaron diferencias en la actividad de GST en raíz con respecto al control, sin exposición a endosulfan.

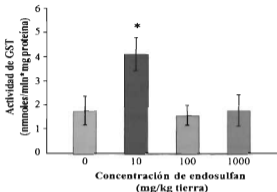


Fig. 5. Actividad de GST en raíz de *O. basilicum* L. expuesta a endosulfán. La actividad máxima de la enzima se observó a la concentración de 10 mg/kg de endosulfan en suelo. ANOVA, * $P < 0.05$ respecto al control (0 mg/kg). (n=3)

La actividad de la GST determinada en el tallo, no muestra diferencia significativas con respecto a la actividad en el control (figura 6).

Con el fin de analizar el comportamiento de GST en cada uno de los componentes de la planta, realizamos un comparativo general de los componentes de la planta y las concentraciones empleadas. En la figura 7 se observa que la mayor actividad de GST se registró en la raíz a una concentración de 10 mg/kg, mientras que a mayor concentración no se observa inducción de la actividad de las GST, en ninguna de las partes analizadas de los ejemplares.

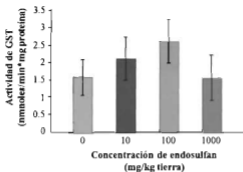


Fig. 6. Actividad de GST en tallo de *O. basilicum* L. expuesta a endosulfán. No se observan diferencias estadísticas en la actividad de GST en tallo de plantas expuestas a una concentración de 10, 100 y 1000 mg/Kg de endosulfán. (n=3).

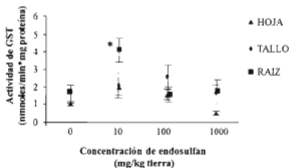


Fig. 7. Actividad de GST en la planta *O. basilicum* L. expuesta al endosulfán. ANOVA, *P> 0.05 respecto al control (0 mg/kg). n = 3

8.3 Actividad de GST en la rizósfera de *O. basilicum* L.

La rizósfera de *Ocimum basilicum* L. expuesta a las diferentes concentraciones de endosulfán trabajadas no reflejó cambios significativos ($p=0.05$) respecto a su control en la actividad de la GST.

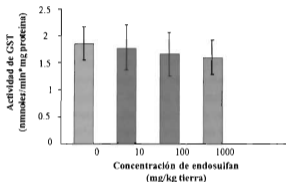


Fig. 8. Actividad de GST en rizósfera de *O. basilicum* L. expuesta a endosulfán. No se observaron diferencias en la actividad de las GST presentes en la rizósfera de *O. basilicum* L. expuestas a las diferentes concentraciones de endosulfan. ANOVA. * $P > 0.05$ respecto al control (0 mg/kg). (n=3).

9. Discusión

En un trabajo previo, nuestro grupo evaluó la capacidad de biorremediación de dos especies de *Ocimum*: *minimum* L. and *basilicum* L. Se analizó la capacidad de las plantas de crecer en suelo contaminado con concentraciones crecientes de dicho compuesto y subsecuentemente con la capacidad de las plantas de disminuir la concentración del contaminante del suelo (Ramírez-Sandoval y col., 2012, Melchor, 2009). La especie que mejor respondió a las condiciones experimentales fue *O. basilicum* L., además disminuyó la concentración de endosulfán en suelo hasta en un 37% (Ramírez-Sandoval y col., 2011). Debido a lo anterior, en el presente trabajo se decidió estudiar la respuesta de GST de *O. basilicum* L. al contaminante. Para ello, se evaluó la actividad de la GST en diferentes componentes de la planta (hoja, tallo y raíz), una vez que esta enzima es parte de la respuesta a xenobióticos y a agentes oxidantes (Dixon y col., 2002). Como primer paso, se estandarizó la técnica de determinación de la actividad de GST en plantas (Cota, 2010). Esta determinación se basó en el método descrito por Scarponi y col. (2006). Nuestros resultados muestran que debido a que la actividad de la GST de planta es pequeña, las desviaciones estándar describen un error de alrededor del 30% derivado del método. Desafortunadamente, hasta donde tenemos conocimiento, no hay ninguna técnica más precisa para la determinación de la actividad de GST en la actualidad.

Nuestros datos de daño oxidativo guardan relación con la actividad de GST que registramos en las plantas. La actividad de GST en hojas de la planta *O. basilicum* L., se incrementa significativamente cuando se expone a una concentración de endosulfán a 10 mg/kg de suelo y se mantiene aproximadamente igual a la concentración de 100 mg/kg. Esto sugiere que la actividad de GST está involucrada en el mecanismo fitorremediador de endosulfán, tal vez mediante su participación en la absorción y almacenamiento del insecticida en hojas, como se ha reportado previamente para otros plaguicidas (Dietz y Schnoor, 2001).

En la fitorremediación, no sólo las plantas participan en los procesos de eliminación de contaminantes, los microorganismos asociados a ellas también contribuyen en la degradación de contaminantes orgánicos a productos inofensivos, o bien, en mineralizarlos hasta CO_2 y H_2O (Velázquez-Fernández, 2012). La evaluación sistemática de la actividad de la GST cuando está expuesta a un contaminante tóxico proporciona información sobre la dinámica de la respuesta de defensa de la planta y la movilización del compuesto contaminante desde el suelo hasta el sitio de degradación final o de confinamiento. En nuestros estudios, la actividad de GST de la rizósfera no se vio modificada. Ello no descarta que otras enzimas o actividades de biodegradación de la rizósfera podrían estar implicadas, pero sugiere que la GST de la rizósfera no participa en el proceso de fitorremediación de endosulfán.

Diferentes estudios han demostrado que, ante una exposición a plaguicidas, las raíces de las plantas utilizan GST y que son capaces de conjugar xenobióticos electrofílicos con GSH xenobióticos electrofílicos (Hatton y col., 1999; Dietz y Schnoor, 2001; Dixon, 2002; Scarponi y col., 2006). Además, un estrés abiótico en la rizósfera induce un mayor número de proteínas de estrés en el ápice de la raíz incluyendo GST (Schröder y col., 2007). Nuestros resultados están en concordancia con los trabajos previos mencionados, debido a que observamos una elevada actividad de GST en la raíz de *O. basilicum* a una concentración de 10 mg/kg de endosulfán en suelo (tabla 3). De la misma manera, la actividad de GST de hojas presenta un comportamiento semejante, esto es, también se incrementa su actividad a 10 mg/Kg. Sin embargo, al incrementar la concentración del contaminante en suelo no hay una mayor inducción de la actividad enzimática, por el contrario la actividad de la GST desciende hasta casi los niveles registrados en las raíces de plantas no expuestas al endosulfán; Es probable que concentraciones superiores saturen los transportadores de la raíz y por ello no se observen cambios con respecto al control. Harvey y cols. (2002), explican que los pentaclorofenoles son absorbidos a concentraciones superiores de 10 mg/kg de

suelo, debido a que concentraciones inferiores son rápidamente degradadas por los microorganismos presentes en el suelo.

Tabla 3. Actividad de GST en *D. bacilliforme* L. y su rizósfera.

| Parte de la planta | Actividad de GST (nmoles/min*mg proteína) a diferentes concentraciones de endosulfán en suelo (mg endosulfán/Kg de suelo) (n=3) (entre paréntesis se muestra el incremento en porcentaje relativo a la concentración 0) | | | |
|--------------------|---|--|---|---|
| | 0 | 10 | 100 | 1,000 |
| Rizósfera | 1.859 (0.303) 100% | 1.780 (0.425) ^b -4% | 1.654 (0.412) ^c -11% | 1.600 (0.315) -14% |
| Raíz | 1.750 (0.583) 100% | 4.098 (0.679) ^{a,c} +134%* | 1.558 (0.412) -11% | 1.760 (0.641) -1% |
| Tallo | 1.598 (0.505) 100% | 2.125 (0.623) ^b +33% | 2.618 (0.627) ^{a,b} +64%* | 1.565 (0.523) -2% |
| Hoja | 1.006 (0.039) ^{a,b} 100% | 1.909 (0.548) ^{a,b} +90%* | 1.536 (0.305) ^{a,b,c} +53%* | 0.529 (0.089) ^{a,b,c} -47%* |

*p<0.05 respecto a 0 mg endosulfán/Kg suelo. Se muestran valores promedio (Desviación estándar) en toda la tabla

^a p<0.05 respecto a rizósfera

^b p<0.05 respecto a raíz

^c p<0.05 respecto a tallo

El tallo tiene una función vital como transporte por lo que el flujo de agua y nutrientes es constante. La naturaleza capilar del xilema, las propiedades de cohesión de las moléculas de agua entre sí, la adhesión del agua a las paredes celulares y la tensión desarrollada por diferencias en el potencial hídrico originadas en la transpiración, permiten en conjunto, el movimiento de la columna de agua desde la raíz hasta las hojas (Bidwell, 2002). El tallo constituye la segunda parte por la que un contaminante atraviesa. Resulta interesante que, aunque la actividad de GST de tallo es más baja que en la raíz en tres de las concentraciones probadas en este trabajo, en el caso de la concentración de 100 mg de endosulfán/Kg, la actividad de tallo es la mayor de las actividades de GST (del tallo) y mayor que la observada en la raíz. Desde un punto de vista teleológico, parecería no tener sentido que la GST de tallo también respondiera a bajas concentraciones, pues la primera defensa de la planta –la raíz- ya está diseñada para detener determinada concentración de contaminante y el tallo a concentraciones superiores. En todas las concentraciones de endosulfán probadas, la actividad de GST de tallo fue mayor que la de las hojas. Ambas

partes de la planta responden como un mecanismo de defensa "escalonado" que parece saturarse a diferentes concentraciones. Sin embargo, ambos pueden proteger al órgano de la planta que genera su alimento –la hoja–.

Los resultados del presente trabajo sugieren que la GST es parte del mecanismo fitorremediador de endosulfán, pero como parte de un mecanismo protector de la planta contra el contaminante. El primer mecanismo de defensa sería la raíz. En este, la actividad de GST se incrementa a concentraciones del orden de 10 mg/kg pero que parece saturable y que se disminuye a mayores concentraciones a la mencionada. El segundo mecanismo es el tallo cuya actividad de GST se incrementa a concentraciones de 100 mg/kg y que también disminuye a concentraciones superiores. A concentraciones de 1,000 mg/kg ambas actividades se saturan y la actividad de GST en la hoja disminuye significativamente.

La actividad de GST se encuentra comprometida como un mecanismo de respuesta. La hoja es un órgano con alta actividad metabólica y no resulta extraño que se encuentre involucrada en los procesos de respuesta de la planta al estrés. La GST juega un papel relevante en los mecanismos por los que la planta hace frente a los xenobióticos (Dixon y col., 2002). Hatton y cols. (1999) han mostrado la función de la GST foliar de *Setaria faberi* contra diferentes grupos de herbicidas. Nuestros resultados también sugieren el papel principal de la GST foliar como parte de un mecanismo de respuesta a endosulfán. De hecho, la GST foliar muestra las mayores variaciones de su actividad según sea la concentración de endosulfán respecto al resto de las partes de la planta (tabla 3).

Tomando en cuenta todo lo anterior, podemos concluir que GST es parte del mecanismo de respuesta de la planta que parece estar bien orquestado en dos barreras- la raíz y el tallo- para proteger la parte más sensible de la planta, la hoja. Dado que el endosulfán tiene como organismo diana los insectos y no las plantas, resulta interesante que la planta varíe la actividad de GST al plaguicida en una manera órgano-dependiente. No obstante, es clara la respuesta de la planta al plaguicida mediante las alteraciones de la actividad de GST. Nuestros resultados

señalan que la planta responde al tratamiento con endosulfán y que esta respuesta depende del órgano y de la concentración del insecticida.

10. Conclusiones

- a. La actividad de la GST de la planta varía según la parte de la planta:
 - se incrementó en hojas y raíz de *O. basilicum* expuesta a 10 mg (endosulfán)/Kg (tierra); en tallo, se incrementa a 100 mg/Kg
 - disminuye en hojas expuestas a 1,000 mg endosulfán/Kg;
 - en rizósfera no se ve modificada por la exposición a endosulfán.
- b. La actividad de GST se encuentra involucrada en la respuesta de la planta y probablemente en el mecanismo fitorremediador de *O. basilicum* hacia endosulfán. Esta respuesta depende del órgano estudiado y de la concentración del endosulfán.

11. Prospectivas

La capacidad de las plantas para extraer contaminantes procedentes de suelos contaminados por plaguicidas es bien conocida. La fitoextracción mediada por enzimas propias de la planta (tales como GST) ofrece una respuesta al posible mecanismo fitorremediador de *Ocimum basilicum* L. Dicha estrategia resulta económica y estéticamente agradable, aparte de representar poco riesgo para la salud o el medio ambiente.

Para dar continuación a este trabajo de investigación se sugiere estudiar la capacidad fitoacumuladora de la planta *Ocimum basilicum* L en vacuolas y raíz expuestas a endosulfán.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAHÍA



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

12. Bibliografía

- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades ATSDR (2004). *Reseña Toxicológica del Endosulfán*. Atlanta, GA. Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., Servicio de Salud Pública. <http://www.atsdr.cdc.gov/es/>. Accesada el día 16 de mayo del 2011.
- Agudelo B, Macías M, Suárez M (2005). Fitorremediación: la alternativa para absorber metales pesados de los biosólidos. *Revista Lasallista de investigación*, enero-junio, año/vol. 2 número 001. Corporación Universitaria Lasallista. Colombia. 57-60 pp
- Alexander M (1999). *Biodegradation and Bioremediation*. 2ª edición. Academic Pres. USA: 453 pp
- Barceló J, Poschenrieder C (2003). *Phytoremediation: principles and perspectives*. *Contributions to Science* (publicación de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Bacerlona), 2 (3): 333-344 pp
- Bidwell RGS (2002). *Fisiología vegetal*. AGT Editor S.A. 1ª. edición.
- Carreño J, Rivas A, Granada A, López-Espinosa MJ, Mariscal M, Olea N., Olea-Serrano F (2007). Exposure of young men to organochlorine pesticides in Southern Spain, *Environ. Res.* 103:55–61.
- Chopra AK, Kumar SM, Chamoli S (2010). Bioaccumulation of organochlorine pesticides in aquatic system – an overview, *Environ. Monit. Assess.* 173:905–916.
- Cota R EL (2010). *Determinación de la enzima Glutación S Transferasa en *Ocimum basilicum**. Tesis de licenciatura para QFB, Universidad Autónoma de Nayarit, México. 24 pp.
- Delgadillo-López AE, González-Ramírez CA, Prieto-García F, Villagómez-Ibarra J R, Acevedo-Sandoval O (2011). Phytoremediation: an alternative to eliminate pollution (REVIEW) *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14 597- 612.
- Dietz AC, Schnoor JL. (2001). *Advances in Phytoremediation*. *Environ. Health Perspect.* 109(S1):163-168.

- Dixon DP, Laphorn A, Edwards R (2002). Plant glutathione transferases. Review. *Genome Biology* 3(3), 1-10.
- Environmental Protection Agency EPA (2000). Introduction to Phytoremediation National Risk Management Research Laboratory Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency Cincinnati, Ohio 104 pp
- Environmental Protection Agency EPA (2012). Phytoremediation: a citizen's guide to phytoremediation. EPA 542-F-12-016. Accesible en: http://www.epa.gov/tio/download/citizens/a_citizens_guide_to_phytoremediation.pdf. Accesado 10 de abril, 2013.
- Frick CM, Farrell RE, Germida JJ (1999). Assessment of Phytoremediation as an In-Situ Technique for Cleaning Oil-Contaminated Sites. Department of Soil Science. University of Saskatchewan, 88 pp
- Frova C (2003). The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. *Physiologia plantarum* 119: 469–479 pp
- Germaine KJ, Liu X, Cabellos GG, Hogan JP, Ryan D, Dowling DN (2006). Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *FEMS Microbiol Ecol* 57(2):302-10.
- González A CA (2008). Patrón de venta y uso de plaguicidas en el estado de Nayarit, México. Tesis de Licenciatura (Químico Farmacobiólogo). Universidad Autónoma de Nayarit, 45 pp.
- Habig W H y Jakoby W B (1981). Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol.* 77: 398-405 pp
- Harikrishnan VR, Usha S (2004). Endosulfán. Hoja informativa y respuestas a preguntas frecuentes. IPEN Pesticide Working Group Project-2004. Thanal. Kerala, India. Website: www.Thanal.org. Accesada el 7 de enero del 2010.
- Harvey P, Campanela B, Castro P, Harms H, Lichtfouse E, Schäffner A, Smrcek S, y Werck D (2002). Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 9:29-47.

- Hatton PJ, Cummins I, Cole DJ, Edwards R (1999). Glutathione transferases involved in herbicide detoxification in the leaves of *Setaria faberi* (giant foxtail). *Physiologia Plantarum* 105:9-16.
- Instituto Nacional de Salud Pública de México INSP (2004) Boletín Para El Control Del Tabaco. Departamento de Investigación sobre Tabaco Cuernavaca, México Julio. No 5.
- Labrou NE, Kotzia GA, Clonis YD (2004). Engineering the xenobiotic substrate specificity of maize glutathione S-transferase I. *Protein Engineer. Design & Selection* 17(10):741-748.
- Liu A, Zhang H, Tao M, Yang S, Wang L, Liu Y, Ma D, He Z (2010). Organochlorine pesticides in consumer fish and mollusks of Liaoning province, China: distribution and human exposure implications. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 59: 444–453 pp
- Lone MI, He ZL, Stofella PJ, Yang XE (2008). Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: Progresses and perspectives. *J. Zhejiang Univ. Sci B.* 9(3):210-220
- Marrs KA (1996). The Functions and Regulation of Glutathione S-Transferases in Plants. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:127-58 pp.
- Meichor P GN (2009). Capacidad de biotransformación de plaguicidas organoclorados por *Ocimum minimum* con fines de biorremediación. Tesis de licenciatura (Biología), Universidad Autónoma de Nayarit, México 27 pp.
- Núñez L, Meas Y, Ortega B, Olguin J (2004). Fitorremediación fundamentos y aplicaciones. *Ciencia.* 69-82 pp. Núñez L, Meas Y, Ortega B, Olguin J Fitorremediación fundamentos y aplicaciones. *Ciencia.* 69-82 pp
- POPs Convención de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes (2011). Accesible en: chm.pops.int/DNNADMIN/HiddenModulesforMandeepsPublications/POPsChemicals/Mandeepshiddenmodule/tabid/754/Default.aspx Consultado 2 de abril 2013.
- Ramírez-Sandoval M, Melchor-Partida GN, Muñoz-Hernández S, Girón-Pérez MI, Rojas-García AE, Medina-Díaz M, Robledo-Marengo ML, Velázquez-Fernández

- JB (2011). Phytoremediatory effect and growth of two species of *Ocimum* in endosulfan polluted soil. *J Hazard Material* 192:388–392.
- Robledo M ML, Rojas G AE, Medina DIM, Romero BCA (2011). Plaguicidas en Nayarit. Universidad Autónoma de Nayarit. Cap 2. 31-67 pp.
- Saier M H, Trevors JT (2010). Phytoremediation. *Published Water Air Soil Pollut* (2010) 205 (Suppl 1) 61-63 pp.
- Scarponi L, Quagliarini E, Del Buono D (2006). Induction of wheat and maize glutathione S-transferase by some herbicide safeners and their effect on enzyme activity against butachlor and terbuthylazine. *Pest. Manag. Sci.* 62:927–32 pp.
- Schröder P, Scheer CE, Diekmann F, Stampfl A (2007). How plants cope with foreign compounds. Translocation of xenobiotic glutathione conjugates in roots of barley (*Hordeum vulgare*) *Env. Sci. Pollut. Res.* 14(2):114-122.
- Secretaría de agricultura, Ganadería, desarrollo Rural, Pesca y alimentación SAGARPA (2004). Estrategia De Fortalecimiento A Cadenas Productivas Agroalimentarias www.sagarpa.gob.mx/agricultura/.../SistemaProducto/Lists/.../4/prnay.pdf. (Accesada el 23 de mayo 2011).
- Silva MH, Beauvais SL (2010). Human health risk assessment of endosulfan. I: Toxicology and hazard identification. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 56:4–17.
- Velázquez-Fernández JB, Ramírez-Sandoval M, Dominguez-Ojeda D y Martínez-Rizo AB (2012). Biodegradation and Bioremediation of Organic Pesticides Pesticides / Book 2. InTech Open. Croatia. 272 pp.
- Walker TS, Pal BH, Grotewold E, Vivanco JM (2003). Root Exudation and Rhizosphere Biology. *Plant Physiol.* 132:44-51
- Williams I (2001). *Environmental Chemistry: A modular approach*. Edit. Wiley & sons. Inglaterra. 388 pp.
- Yadav R, Arora P, Kumar S, Chaudhury A (2010). Perspectives for genetic engineering of poplars for enhanced phytoremediation abilities. *Ecotoxicology* 19(8):1574-1588.

Zheljazkov VD, Cantrell CL, Tekwani B, Khan SI (2008). Content, composition, and bioactivity of the essential oils of three basil genotypes as a function of harvesting. *J Agric Food Chem* 56:380-385.