

EFFECTO DE ALGUNOS AGENTES AGROQUÍMICOS SOBRE LA REACCIÓN DE PEROXIDACIÓN DEL LUMINOL CATALIZADA POR LA PEROXIDASA DE RÁBANO

Anna ILYNA¹, Blanca Hortencia LÓPEZ-LUJÁN¹, José Luis MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ¹,
Jorge ROMERO-GARCÍA² y Jesús RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ¹

¹Depto. de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Blvd. V. Carranza e Ing. J. Cárdenas V., Col. República, Apdo. Postal 935, Saltillo 25000 Coahuila. Fax: (84)15 95 34; correo electrónico: ailina@alpha1.sal.uadec.mx

²Depto. de Biopolímeros, Centro de Investigación en Química Aplicada. Blvd. Ing. Enrique Reyna Hermosillo 140, Saltillo 25100 Coahuila

(Recibido en junio de 1998, aceptado en mayo de 1999)

Palabras clave: quimioluminiscencia, peroxidasa, sustancias agroquímicas

RESUMEN

En este trabajo se describen los efectos de la preincubación de diversas sustancias agroquímicas con la peroxidasa de rábano (HRP) antes del ensayo quimioluminiscente en la solución. Una variedad de sustancias fue investigada para determinar su influencia sobre la emisión de luz. La preincubación de herbicida, detergente, fenol y bactericida con HRP tuvo efectos inhibitorios sobre la subsecuente actividad. La preincubación de algunos insecticidas con la HRP provocó el aumento de la intensidad quimioluminiscente. Al emplear soluciones estándar se obtuvieron curvas de calibración con el objeto de cuantificar la concentración de algunos agentes agroquímicos. Se demostró que la emisión de luz en la reacción quimioluminiscente de peroxidación del luminol, catalizada por la peroxidasa en presencia de un promotor (*para*-yodofenol), es modificada por varias sustancias y por consiguiente este ensayo puede ser adaptado para la evaluación de la calidad del agua.

ABSTRACT

In this work the effects of preincubation of certain agrochemical substances with horseradish peroxidase (HRP) prior to chemiluminescent assay is reported. A wide range of chemicals have been investigated to determine if they influence on enhanced light emission. Preincubation of herbicide, detergent, phenol and bactericide with HRP prior to chemiluminescent assay had an inhibitory effect on the enzyme activity. Preincubation of some insecticides with HRP increased the chemiluminescent intensity. Using standard solutions, calibration plots were obtained and quantification of the pollutant concentration was possible. It was demonstrated that light emission from the peroxidase catalyzed enhanced chemiluminescent reaction can be modified by various chemicals allowing a qualitative monitoring of the water.

INTRODUCCIÓN

Según su origen, la contaminación del agua se puede clasificar en dos tipos: puntual y dispersa. En México, como en otros países, se han realizado avances considerables dirigidos hacia el control y la normatividad de la contaminación puntual

(Arévila *et al.* 1997). De esta manera, la Norma Oficial Mexicana (CNA 1997) de carácter obligatorio regula los límites máximos permitidos de contaminantes en las descargas de aguas residuales provenientes de la industria, de los servicios, etc. a los sistemas de drenaje y alcantarillado urbano o municipal. Sin embargo, las acciones emprendidas para el control de la

contaminación dispersa (agua de retornos agrícolas, excedentes industriales, lixiviaciones de basureros, etc.) han sido escasas debido principalmente a su desconocimiento (Duda 1993). Según los datos publicados por Arévilá y colaboradores (1997), en México los retornos agrícolas constituyen el 46 % del total de las descargas y equivalen a un caudal de 282 m³/s y, consecuentemente, a casi el 77 % del agua extraída. Estos datos hacen indispensable una reflexión sobre la importancia y la necesidad de desarrollar nuevos métodos para el control y el monitoreo de la contaminación del agua con agentes agroquímicos.

Se consideran como agentes agroquímicos al conjunto de compuestos químicos (Arévilá *et al.* 1997), generalmente de origen sintético, que se aplican en los campos de cultivo para incrementar la producción. Los más relevantes son los fertilizantes (N, P y K) y los mejoradores de suelo que en materia de riesgo se caracterizan por tener un impacto sensiblemente menor ya que no son acumulativos y por ello más fácilmente eliminados en la naturaleza. Por el contrario, los plaguicidas (bactericidas, herbicidas, insecticidas, etc.) que han influido en el desarrollo agrícola controlando insectos, hierbas y otras plagas, son agentes cuyo uso indiscriminado ha provocado problemas de salud pública y ha alterado el equilibrio de los ecosistemas debido a la dificultad para ser degradados en el ambiente.

En este trabajo se presentan algunos avances en el desarrollo de un método quimioluminiscente para la detección de contaminantes agrícolas que puede ser útil en la toma de decisiones para el control, el manejo y la prevención de la contaminación de los recursos hídricos. Cabe mencionar que el sistema de oxidación del luminol por hidroperóxido catalizado con la peroxidasa es uno de los sistemas quimioluminiscentes prospectivos para fines analíticos. La quimioluminiscencia proporciona valores altos y seguros de la señal detectada y al mismo tiempo evita el peligro de exposición a sustancias tóxicas comúnmente empleadas en varios métodos analíticos; además, el empleo de la enzima, como regla, permite aumentar la sensibilidad del análisis disminuyendo significativamente su tiempo de ejecución y muchas veces evitando la realización de un tratamiento previo de la muestra. Este sistema encontró una aplicación amplia en el análisis inmunoenzimático (Ugarova *et al.* 1986, Egorov *et al.* 1993), en la detección de algunas sustancias fisiológicamente importantes (acetilcolina, cisteamina, etc.) mediante la determinación de hidroperóxido como producto de la transformación de éstas (Nakamura *et al.* 1986, Kamidate *et al.* 1994, Ternaux y Chamoin 1994), así como en el diseño de métodos para la detección de algunos radicales, antioxidantes o inhibidores, en diferentes muestras biológicas y de interés industrial (Kim *et al.* 1990, Candy *et al.* 1991, Huang *et al.* 1992, Pascual y Romay 1992, Pascual *et al.* 1992, Whitehead *et al.* 1992). El objetivo del presente estudio consistió en demostrar que la reacción quimioluminiscente de peroxidación del luminol catalizada por la enzima peroxidasa puede ser utilizada como una herramienta analítica para el monitoreo y la indicación de contaminación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y equipo

Los reactivos: peroxidasa (VI A) de rábano picante, Trizma-base, ácido clorhídrico, luminol, *p*-yodofenol, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), hidroperóxido e hidróxido de sodio fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Las sustancias empleadas en los experimentos como posibles contaminantes fueron detergente (marca Ariel), fenol (Sigma) y plaguicidas proporcionados por Grupo Bioquímico Mexicano, S.A. de C.V. (Saltillo, Coahuila, México): Agrimicin, bactericida que contiene estreptomycin y oxitetraciclina como principios activos; Paraquat, herbicida y los insecticidas Rugby (cadusafos), Velfurán (carbofuran), Pounce (permetrina), Lucathion 50 (malatión), Folvel M72 (paratión metílico) y Dominex (afametrina). Las mediciones de la intensidad quimioluminiscente se realizaron en un luminómetro portátil EMILETE EL 1003 (Rusia). En todas las soluciones se utilizó agua bidestilada. Las soluciones patrón de luminol (1.2 mM) y *p*-yodofenol (0.8 mM) se hicieron utilizando la solución de NaOH 1 M (50 µl) y posteriormente la solución amortiguadora de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5. Las soluciones patrón fueron almacenadas en frascos ámbar a 4 °C.

Estudio del sistema de peroxidación del luminol

Para encontrar las concentraciones adecuadas de luminol, *p*-yodofenol, enzima e hidroperóxido, bajo las cuales no se presenta inhibición del proceso quimioluminiscente y que permitan observar cambios graduales de la intensidad, se procedió a estudiar el sistema de peroxidación del luminol variando las concentraciones de estos reactivos. Para llevar a cabo dicha reacción, en la celda del luminómetro se adicionaron 0.80 ml de una solución amortiguadora (Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5, sin o con EDTA 2 mM), 100 µl de una solución de luminol, 100 µl de *p*-yodofenol y 10 µl de H₂O₂. Se determinó el perfil de intensidad de la quimioluminiscencia en el blanco y después se añadieron 10 µl de enzima para iniciar la reacción enzimática detectando nuevamente la intensidad quimioluminiscente en función del tiempo de la reacción. De las curvas obtenidas se determinó el valor que corresponde al pico de la señal detectada, intensidad máxima de quimioluminiscencia (I_{max}), que es proporcional a la velocidad de la reacción.

Además, se estudió la estabilidad de la enzima peroxidasa en solución acuosa, estimando de la misma manera la intensidad máxima de quimioluminiscencia durante el almacenamiento de la solución de peroxidasa (45 ng/ml) a temperatura ambiente y a 4 °C.

Efecto de diferentes agentes agroquímicos sobre la intensidad quimioluminiscente de la reacción de peroxidación del luminol catalizada por la peroxidasa de rábano picante en presencia de *p*-yodofenol como promotor de la reacción

Las condiciones establecidas en la etapa anterior fueron utilizadas para el estudio de los efectos de los agentes agroquímicos mencionados sobre la reacción de interés.

El procedimiento seguido fue esencialmente el mismo al descrito anteriormente, pero antes de llevar a cabo la reacción enzimática, se mezclaron 20 μl de una solución de peroxidasa (45 ng/ml) con 20 μl de la solución de cada uno de los agentes mencionados. La mezcla se incubó 1 minuto a temperatura ambiente y posteriormente se aplicaron 20 μl de ésta en la reacción de peroxidación del luminol. Muestras testigo fueron corridas utilizando agua bidestilada en lugar de la solución del preparado químico. De esta manera, se detectaron los perfiles de quimioluminiscencia (intensidad vs. tiempo) en ausencia y en presencia de las sustancias. La intensidad máxima determinada a partir de los perfiles de quimioluminiscencia se graficó en función de la concentración de cada uno de los agentes agroquímicos empleados en un intervalo de 1.25 hasta 10 mg/ml. Cada medición se hizo por triplicado, como también cada uno de los ensayos.

RESULTADOS

Estudio del sistema de peroxidación del luminol

En la primera etapa de investigación se realizó un análisis preliminar de la conducta del sistema empleando el amortiguador Tris-HCl 0.1 M a un pH 8.5 ya que algunos autores (Cercek *et al.* 1994; Motsenbocker y Kondo 1994) describen que la emisión de luz en el sistema de interés está influenciada por el tipo de amortiguador utilizado, además de la pureza y de la concentración de sustratos y enzima. Al emplear la solución amortiguadora mencionada, en los blancos se detectó quimioluminiscencia, tanto en ausencia del hidroperóxido como de la enzima, aunque los valores detectados de intensidad máxima fueron significativamente menores que en el caso de la mezcla completa de reacción. Al utilizar la solución amortiguadora Tris-HCl 0.1 M que contenía EDTA 2 mM, no se observó emisión de luz en los blancos lo que permitió simplificar el procedimiento de determinación de la intensidad máxima en el sistema completo evitando la necesidad de detectar y restar los valores de intensidad que corresponden al proceso quimioluminiscente de oxidación del luminol «per se» en el blanco sin enzima. Además, se demostró que la presencia del EDTA no ocasiona inhibición de la reacción de peroxidación del luminol catalizada por peroxidasa. En los siguientes experimentos se utilizó la solución amortiguadora con EDTA.

Se procedió al estudio de la intensidad máxima de quimioluminiscencia en función de la concentración de la peroxidasa. La **figura 1** indica que a concentraciones relativamente bajas, menores de 9 ng/ml, no existe una relación lineal, pero a medida que se incrementa la concentración de enzima aparece una correlación lineal entre ambos parámetros. Estos resultados concuerdan con los publicados por Motsenbocker y Kondo (1994). Además se observó que cuando se usan concentraciones bajas de la enzima (< 45 ng/ml), se detecta un periodo de retraso en el perfil de la quimioluminiscencia, mientras que a concentraciones altas se nota un cambio drástico de la señal. En ambos casos, se dificulta la valoración de la

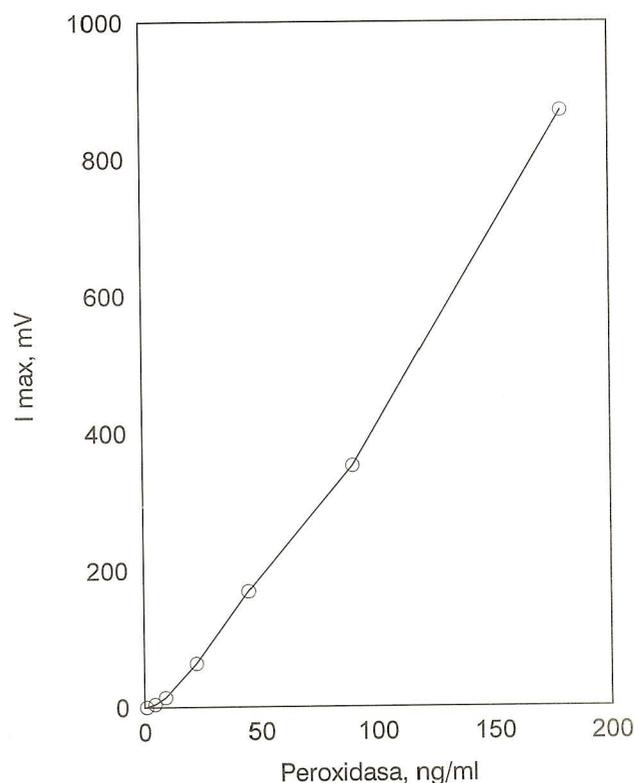


Fig. 1. Intensidad máxima de la quimioluminiscencia del sistema de peroxidación del luminol en función de la concentración de peroxidasa de rábano picante

intensidad máxima de quimioluminiscencia. En los siguientes experimentos se empleó la enzima a una concentración de 45 ng/ml (dilución inicial 5 U/ml) que resultó adecuada en diferentes detecciones realizadas.

El uso del sistema enzimático en un método analítico requiere de información sobre la estabilidad de éste en solución acuosa, lo que permite aproximar el tiempo de su uso y planear adecuadamente su aplicación. Al emplear la solución de la enzima de 45 ng/ml, se demostró que la enzima almacenada bajo temperatura ambiente, después de 10 días, se inactiva casi totalmente, mientras que a 4 °C ésta conserva hasta el 60 % de su actividad inicial (**Figura 2**). Se observó que las soluciones patrón de p-yodofenol y luminol pueden ser utilizadas hasta por un período de 45 días cuando se almacenan a temperatura de 4 °C.

Para escoger las concentraciones adecuadas de luminol y para-yodofenol, se probaron hasta 0.1 mM y 0.04 mM, respectivamente. En las **figuras 3a** y **4a** se muestran los resultados obtenidos, en donde la intensidad máxima de quimioluminiscencia se grafica versus la concentración de estos cosustratos. Las curvas obtenidas siguen el comportamiento de la ecuación de Michaelis-Menten. La representación de éstas en coordenadas inversas da lugar a una serie de líneas rectas paralelas (**Figuras 3b** y **4b**) a partir de las cuales es posible calcular los valores de $I_{\text{max app}} (\sim V_{\text{max}})$ y $K_{\text{m app}}$. Como

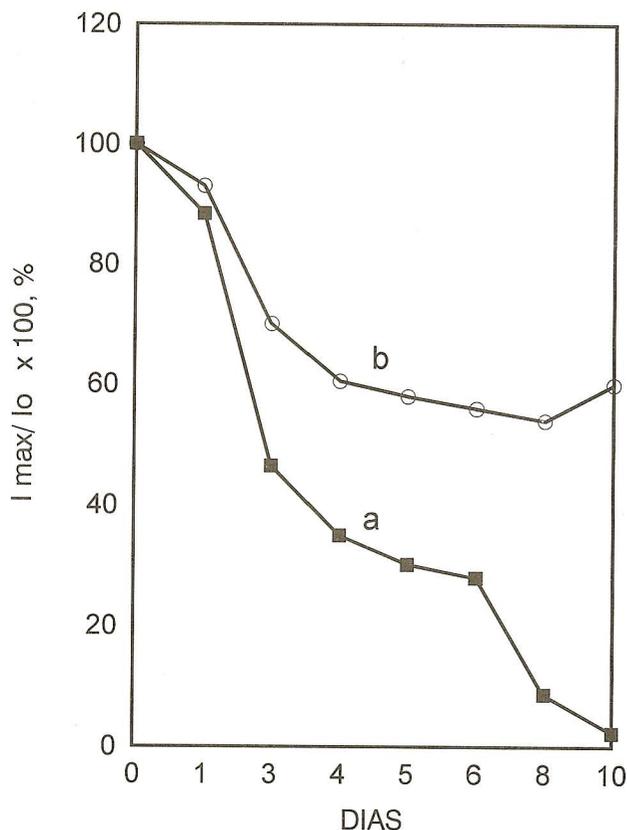


Fig. 2. Porcentaje de actividad de la peroxidasa en función del tiempo de almacenamiento de la solución de enzima (5 U/ml) bajo la temperatura ambiente (a) y 4 °C (b)

se aprecia en las figuras 3b y 4b, estos parámetros, determinados para diferentes concentraciones de cosustratos, se caracterizan por un cambio simultáneo proporcionando los valores constantes de $I_{\max \text{ app}}/K_{m \text{ app}}$. Se consideran a 0.03 mM y 0.01 mM como las concentraciones adecuadas de para *p*-yodofenol y luminol, respectivamente, ya que permiten obtener valores altos y seguros de intensidad máxima de quimioluminiscencia.

En la figura 5 se presenta la intensidad máxima de quimioluminiscencia en función de la concentración de hidroperóxido. A concentraciones menores o iguales a 0.015% de este sustrato, el comportamiento puede ser descrito mediante la ecuación de Michaelis-Menten. Concentraciones superiores a este valor actúan inhibiendo la reacción quimioluminiscente. Para llevar a cabo la peroxidación del luminol catalizada por la enzima peroxidasa, en los siguientes experimentos el hidroperóxido se utilizó a concentración de 0.015 %.

Efecto de diferentes agentes agroquímicos sobre la intensidad quimioluminiscente de la reacción de peroxidación del luminol catalizada por la peroxidasa de rábano picante

Se estudió el efecto de diversos agentes agroquímicos sobre la intensidad quimioluminiscente de la reacción catalizada por la peroxidasa. De acuerdo con la respuesta

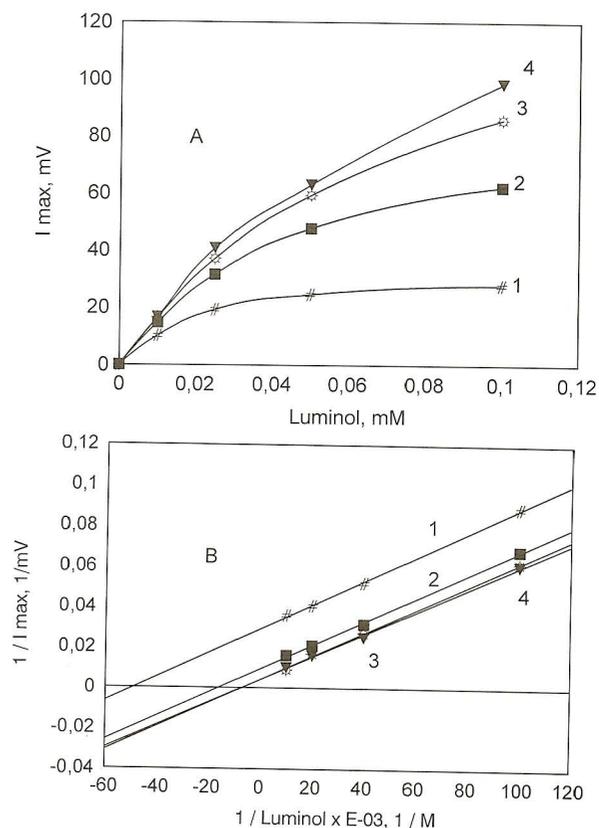


Fig. 3. Intensidad máxima de quimioluminiscencia de la reacción, catalizada por la peroxidasa de rábano picante: A, en función de la concentración de luminol en presencia de diferentes concentraciones de *p*-yodofenol: 1, 0.01 mM; 2, 0.02 mM; 3, 0.04 mM; 4, 0.08 mM; B, linealización de las curvas obtenidas en coordenadas inversas ($I_{\max \text{ app}}/K_{m \text{ app}} = 1.67 \text{ mV}/\mu\text{M}$)

obtenida bajo las condiciones probadas (concentración y tiempo de incubación), éstos pueden ser clasificados en tres grupos principales: 1. Los que ocasionan la disminución de la señal quimioluminiscente, 2. Los que originan aumento de la señal quimioluminiscente y 3. Los responsables de un efecto no uniforme.

En el primer grupo se encuentran: fenol (que fue empleado considerando que es precursor de algunos plaguicidas), herbicida, detergente (frecuente contaminante del agua) y bactericida. Cada una de estas sustancias empleada a concentración de 5 mg/ml mostró un cambio específico en el perfil de quimioluminiscencia (Figura 6). El fenol, el detergente y el bactericida disminuyeron la intensidad máxima sin un cambio en la tangente de la parte inicial del perfil, mientras que en el caso del herbicida, además de la modificación en la intensidad máxima de quimioluminiscencia, se observó un cambio significativo en la tangente. Para cada una de las sustancias mencionadas se obtuvo una gráfica que caracteriza la dependencia de la intensidad máxima en función de la concentración de estos productos químicos dentro de un intervalo de 0

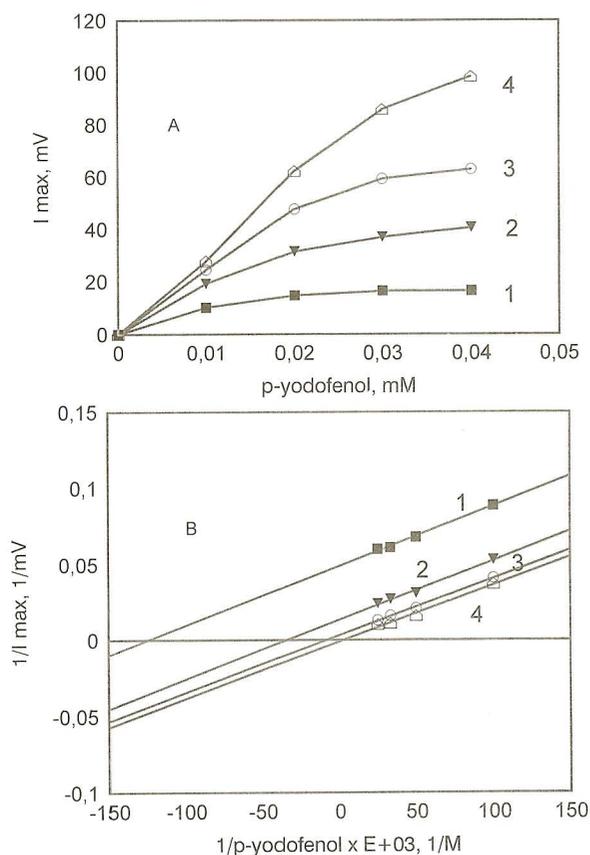


Fig. 4. Intensidad máxima de quimioluminiscencia de la reacción, catalizada por la peroxidasa de rábano picante: A, en función de la concentración de p-yodofenol en presencia de diferentes concentraciones de luminol: 1, 0.01 mM; 0.025 mM; 0.05 mM; 0.1 mM; B, linealización de las curvas obtenidas en coordenadas inversas ($I_{\max \text{ app}} / K_{\text{m app}} = 2.50 \text{ mV}/\mu\text{M}$)

(testigo) hasta 10 mg/ml. Dentro de este intervalo de concentración, se presentaron funciones lineales para el herbicida, el detergente y el bactericida (Figura 7), mientras que en el caso de fenol la curva no fue lineal, permitiendo una detección cuantitativa hasta la concentración de 5 mg/ml (Figura 7).

En la figura 8 se aprecia que la incubación previa de la peroxidasa con las soluciones de algunos insecticidas (Rugby, Pounce, Donimex), indujo el aumento en la señal quimioluminiscente. El aumento de la señal no fue significativo en el intervalo de concentraciones y tiempos de incubación empleados. La dependencia de la intensidad máxima de la concentración de estas sustancias no tuvo comportamiento lineal.

Otras sustancias utilizadas en esta etapa de trabajo no tuvieron efectos bien definidos sobre el sistema quimioluminiscente de peroxidación de luminol. Lucathion 50, Velfurán y Folvel M72, a concentraciones menores a 5 mg/ml, produjeron aumentos en la intensidad máxima de quimioluminiscencia, pero concentraciones superiores a ese valor, inhibieron la reacción (Figura 9).

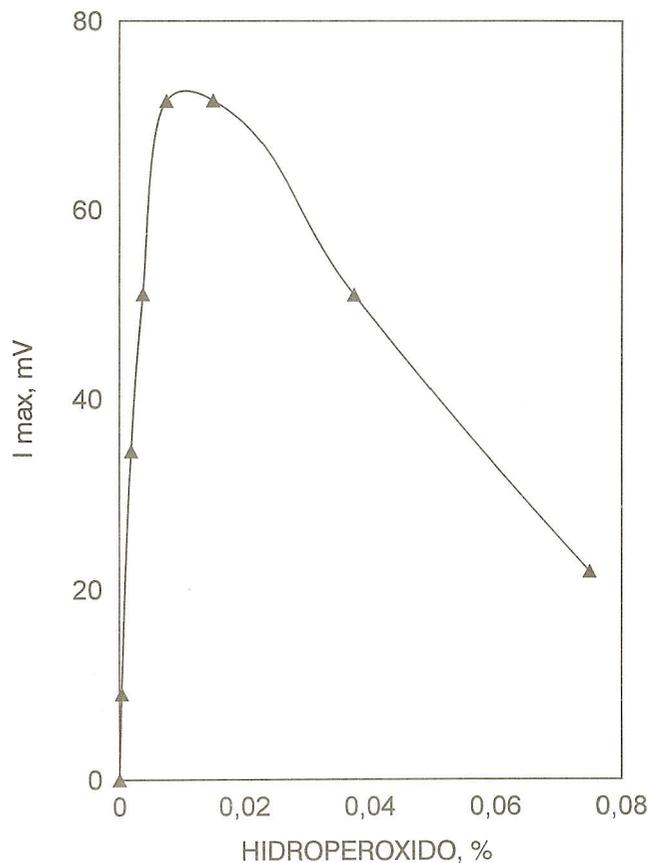


Fig. 5. Intensidad máxima de la quimioluminiscencia catalizada por la peroxidasa de rábano picante en función de la concentración de hidroperóxido

DISCUSIÓN

Actualmente, existe un enorme interés sobre la enzima peroxidasa (EC 1.11.1.7) de rábano picante (HRP) y la reacción quimioluminiscente que está relacionado con las perspectivas de su aplicación en los métodos de análisis y en particular en el inmunoenzimático (Egorov *et al.* 1993). El método quimioluminiscente permite una sensibilidad igual o mayor, aportando mejores resultados analíticos en comparación con otros métodos de detección; en este caso el límite de detección es de 10^{-16} M , mientras que con los métodos electroquímicos es de 10^{-6} M , con los espectrofotométricos es de 10^{-8} M y con los fluorométricos es de 10^{-11} M (Ugarova *et al.* 1986). El estudio de esta reacción con fines analíticos para el monitoreo de la contaminación ambiental puede abrir nuevas perspectivas de su aplicación.

La reacción de peroxidación del luminol es conocida desde los años 60 pero el mecanismo preciso del proceso todavía no se ha entendido completamente. El ciclo catalítico de la reacción de peroxidación del luminol se presenta en la tabla I. Este mecanismo fue propuesto por Thorpe y Kricka (1987) y es

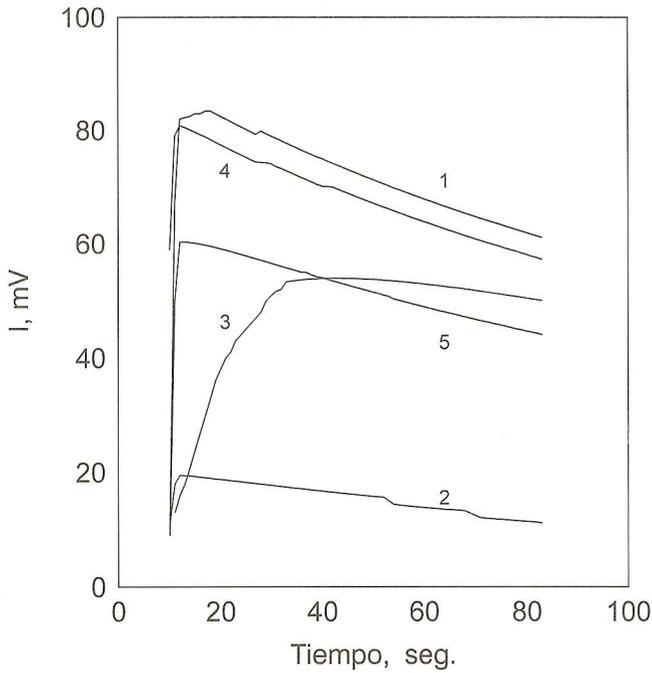


Fig. 6. Perfil de quimioluminiscencia en ausencia de sustancias contaminantes en el agua (1, testigo) y en presencia de: 2, fenol; 3, herbicida; 4, detergente; 5, bactericida

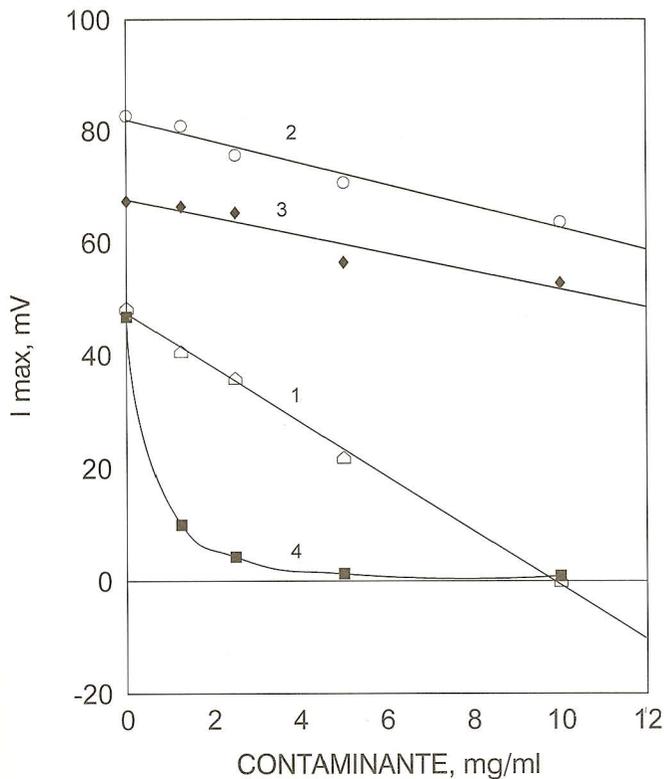


Fig. 7. Intensidad máxima de quimioluminiscencia en función de la concentración de: 1, herbicida; 2, detergente; 3, bactericida; 4, fenol

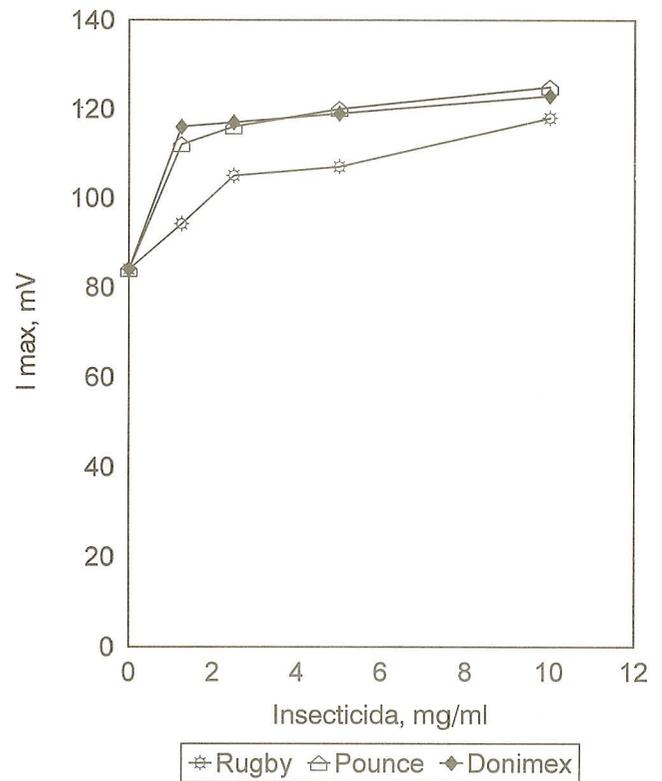


Fig. 8. Intensidad máxima de quimioluminiscencia en función de la concentración de algunos insecticidas que provocan aumento en la señal quimioluminiscente

aceptado actualmente, aunque existen varios trabajos de investigación en donde se discute y se modifica, en particular la Etapa III de éste (Cercek *et al.* 1994).

De esta manera, se puede apreciar que el ciclo comprende tres etapas principales. En la primera, al reaccionar la enzima y el peróxido se forma un compuesto intermedio I (HRP I) que se caracteriza por tener mayor grado de oxidación del hierro en el grupo prostético de la enzima (Thorpe *et al.* 1985).

En la segunda etapa se forman los radicales del promotor de la quimioluminiscencia (p. ej., de p-yodofenol) (Hodgson y Jones 1989) y los radicales del luminol (en caso de ausencia del promotor) (Lundin y Hallander 1987). En esta etapa de la reacción el compuesto intermedio I se transforma en el compuesto intermedio II (HRP II) (con menor grado de oxidación de hierro) y éste último se convierte al estado nativo de la enzima que puede volver a reaccionar con el hidróperóxido.

La tercera etapa se determina por la formación del dianión de 3-aminofalato excitado que es el responsable de la producción de luz en el sistema. En esta etapa tienen lugar varias reacciones con las formas activas del oxígeno (Thorpe y Kricka 1987). En el caso de que en el sistema esté presente el promotor, en esta etapa de la reacción ocurre una mayor formación de radicales de luminol que posteriormente son transformados al dianión de 3-aminofalato. El papel del promotor consiste en activar la formación de radicales de luminol y de este modo

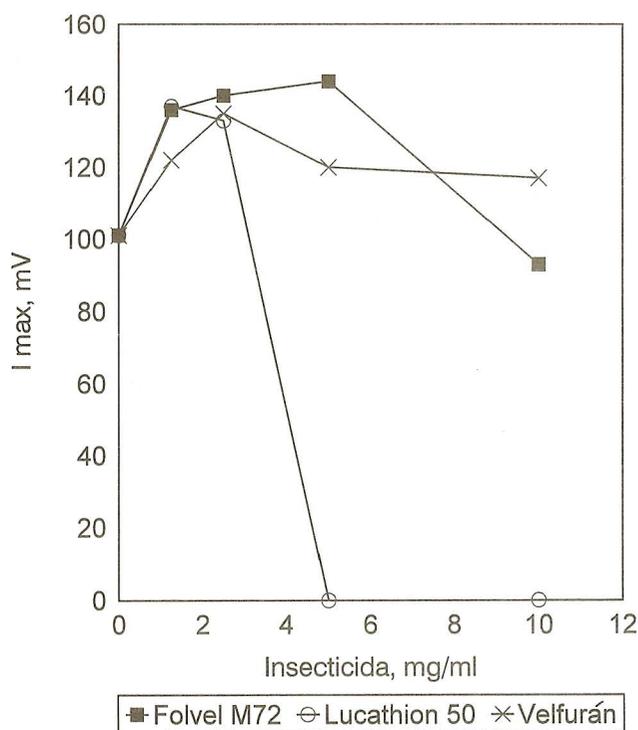


Fig. 9. Intensidad máxima de quimioluminiscencia en función de la concentración de algunos insecticidas que provocan efecto no uniforme sobre la señal quimioluminiscente

umentar la cantidad de luz emitida (Lundin y Hallander 1987). Se propone que las reacciones del ciclo catalítico descrito son reacciones bimoleculares (Lin *et al.* 1993), de esta manera los parámetros cinéticos ($K_{m\text{app}}$ e $I_{m\text{app}} \sim V_{\text{max}}$) tienen carácter formal (Figuras 3 y 4).

Se conoce que en presencia de exceso de hidropéroxido o de radicales de superóxido se forma un compuesto intermedio III (HRP III) que posee menor actividad en la reacción de peroxidación del luminol (Kamidate *et al.* 1994). Esto explica los resultados obtenidos en el presente trabajo con el estudio de la intensidad quimioluminiscente en función de la concentración del hidropéroxido (Figura 5).

Existen varios procesos de la oxidación de luminol que son independientes de la acción enzimática o del hidropéroxido que son catalizados por metal-porfirinas, iones de metales, etc., probablemente mediante formación de perhidroxi-radicales (Henley y Worwood 1994). En este trabajo éstos se consideran como los observados en el blanco que se caracterizan por menor intensidad de luz emitida al compararlos con procesos catalizados por la enzima en presencia de hidropéroxido y que pueden ser omitidos al emplear en el sistema un quelador, como fue demostrado en este trabajo utilizando el EDTA. Probablemente esto se debe a la capacidad queladora del EDTA sobre los iones de metales.

En este trabajo se propuso demostrar que la reacción de peroxidación de luminol catalizada por la enzima peroxidasa puede ser aplicada como herramienta analítica para la detec-

TABLA I. MECANISMO DE REACCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE DE PEROXIDACIÓN DEL LUMINOL PROPUESTO POR THORPE Y KRICKA (1987). (LOS PROCESOS QUE OCURREN EN AUSENCIA DEL PROMOTOR SE MARCAN EN NEGRITAS)

Etapa I



Etapa II



Etapa III



En exceso de H_2O_2 ó de radical de superóxido:



ción y eventualmente la cuantificación de la presencia de agentes agroquímicos (posibles contaminantes) en el agua. De tal manera que la reacción quimioluminiscente por su naturaleza requiere de la participación de radicales (Tabla 1), la intensidad de luminiscencia varía en presencia de inhibidores de la enzima, que actúan en las etapas I y II previniendo la participación de la enzima o compitiendo con el luminol en proceso de formación de los radicales o en presencia de antioxidantes apagadores de los radicales (Kim *et al.* 1990, Candy *et al.* 1991, Huang *et al.* 1992, Pascual y Romay 1992, Pascual *et al.* 1992, Whitehead *et al.* 1992). La actividad inhibitoria de agentes empleados en este estudio se puede ordenar de la manera siguiente (Figuras 6 y 7): fenol > herbicida > bactericida > detergente

Al analizar los resultados obtenidos en este trabajo es posible concluir que la reacción de peroxidación del luminol catalizada por la enzima peroxidasa de rábano picante, puede ser empleada en varios casos para la detección de agentes agroquímicos en el agua, de manera cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa, dependiendo de las condiciones específicas de su aplicación. La técnica de detección es mucho más rápida que otros métodos conocidos y no requiere de tratamientos especiales de la muestra, tales como extracción o concentración de la sustancia contaminante. Además, la mayoría de los métodos conocidos (Waliszewski *et al.* 1996) utilizan equipos que no permiten su aplicación *in situ* es decir no pueden realizarse directamente en el lugar contaminado, por ejemplo en el campo. Con base en la reacción de peroxidación del luminol catalizada por la enzima peroxidasa es posible proponer, para el monitoreo de la presencia de los agentes

agroquímicos (Figs. 7-9) u otros contaminantes, un método que emplea cantidades pequeñas de la enzima (Figura 1), que es bastante estable en solución acuosa (Figura 2) y que detecta los cambios en la señal quimioluminiscente. Éste es rápido y directo, así como portátil y compacto, por lo que el resultado puede ser obtenido *in situ* o en línea y en laboratorio, evitando el problema de transporte y de la conservación de las muestras y proporcionando al mismo tiempo mayor sensibilidad en comparación con los métodos actualmente aceptados por las Normas Oficiales Mexicanas (CNA 1997, Diario Oficial de Federación 1993). Los reactivos y el equipo empleados en el método quimioluminiscente no son muy costosos y el personal técnico no requiere de capacitación especial para manejarlo. Es evidente que el desarrollo de este método presenta una buena perspectiva en el campo de las investigaciones bioanalíticas.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de investigación fue financiado por CONACyT-SIREYES (970406030) y por la Corporación Mexicana de Investigación en Materiales, S.A. Se agradece el apoyo brindado por la sección de investigación del Grupo Bioquímico Mexicano, S.A. de C.V.

REFERENCIAS

- Arévila A., Ramos J. y Jiménez B. (1997). Evaluación de la contaminación dispersa por agroquímicos en México. *Ingen. Ambient.* 31, 22-32.
- Candy T., Mantle D. y Jones P. (1991). Estimation of tyrosine by attenuation of 4-iodophenol enhanced chemilumin-escence. *J. Biolum. Chemilum.* 6, 245-249.
- Cercek B., Cercek B., Roby K. and Cercek L. (1994). Effect of oxygen abstraction on the peroxidase-luminol-perborate system: relevance to the HRP enhanced chemiluminescence mechanism. *J. Biolumin. Chemilumin.* 9, 273-277.
- CNA (1997). Ley federal de derechos en materia de agua. Comisión Nacional del Agua, D.F. México, 96 p.
- Diario Oficial de la Federación (1993). NOM-CCA-033/1993. Octubre 18, pág. 124. D.F. México.
- Duda A. (1993). Addressing nonpoint sources of water pollution must become an international priority. *Water Sci. Technol.* 28, 11.
- Egorov A.M., Kim B.B., Pisarev V.V., Kapeliuch Yu.L. y Gazarian I.G. (1993). Fundamental and applied aspects of reaction of enhanced chemiluminescence. En: *Bioluminescence and Chemiluminescence Status report.* (A.A. Szalay, P.E Stanly., L.J. Kricka, Eds). Wiley, Chichester, pp. 286-290.
- Henley R. y Worwood M. (1994). The enhancement of iron-dependent luminol peroxidation by 2,2'-dipyridyl and nitrilotriacetate. *J. Biolumin. Chemilumin.* 9, 245-250.
- Hodgson M. y Jones P. (1989). Enhanced chemiluminescence in the peroxidase-luminol-H₂O₂ system: anomalous reactivity of enhancer phenols with enzyme intermediates. *J. Biolumin. Chemilumin.* 3, 21-25.
- Huang Y.L., Kim J.M. y Schmid R.D. (1992). Determination of sulfite in wine through flow-injection analysis based on the suppression of luminol chemiluminescence. *Anal. Chim. Acta* 266, 317-323.
- Kamidate T., Katayama A., Ichihashi H. y Watanable H. (1994). Characterization of peroxidases in luminol chemilumin-escence coupled with copper-catalyzed oxidation of cysteamine. *J. Biolumin. Chemilumin.* 9, 279-286.
- Kim J.M., Huang Y. y Schmid R.D. (1990). Chemiluminescent determination of ascorbic acid in juices. *Anal. Lett.* 23, 2273-2282.
- Lin L., Arnold M.A. y Dordick J.S. (1993). Mathematical model for the luminol chemiluminescence reaction catalyzed by peroxidase. *Biotech. Bioengineer.* 41, 1112-1120.
- Lundin A. y Hallander L.O.B. (1987). Mechanisms of horseradish peroxidase catalyzed luminol reaction in presence and absence of various enhancers. En: *Bioluminescence and Chemiluminescence: New Perspectives* (J.R. Scholmerich, R. Anderseen, A. Kapp, M. Ernst y W. Woods, Eds.) Wiley, Chichester, pp. 555-558.
- Motsenbocker M.A. y Kondo K. (1994). Improvements to enhanced horseradish peroxidase detection sensitivity. *J. Biolum. Chemilum.* 9, 15-20.
- Nakamura M., Yamazaki I., Ohtaki S. y Nakamura S. (1986). Characterization of one- and two- electron oxidantes of glutathione coupled with lacto-peroxidase and thyroid peroxidase reactions. *J. Biolum. Chemilum.* 216: 13923-13927.
- Pascual C. y Romay C. (1992). Effect of antioxidants on chemiluminescence produced by reactive oxygen species. *J. Biolumin. Chemilumin.* 7, 123-132.
- Pascual C., Del Castillo M.D. y Romay C. (1992). New luminol sensitized chemiluminescence methods for determination of superoxide dismutase. *Anal. Lett.* 25, 837-849.
- Ternaux J.-P. y Chamoin M.-C. (1994). Enhanced chemilumin-escence assay for acetylcholine. *J. Biolumin. Chemilumin.* 9, 65-72.
- Thorpe G.H.G., Kricka L.J., Moseley S.B. y Whitehead T.P. (1985). Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydroperoxide reaction: application in luminescence monitored enzyme immunoassays. *Clin. Chem.* 31, 1335-1341.
- Thorpe G.H.G. y Kricka L.J. (1987). Enhanced chemiluminescent assays for horseradish peroxidase: characteristics and applications. En: *Bioluminescence and Chemiluminescence: New Perspectives* (J.R. Scholmerich, R. Anderseen, A. Kapp, M. Ernst y W. Woods, Eds.) Wiley, Chichester, pp. 199-208.
- Ugarova N.N., Brovko L. Yu. y Lebedeva O.V. (1986). Bioluminescent assay in medicine and biotechnology. *Antibiot. Med. Biotechnol.* 31, 141-146.
- Waliszewski S.M., Pardío-Sedas V.T., Waliszewski K. N., Chantiri-Pérez J.N., Infanzón-Ruiz R.M. y Rivera J. (1996). Niveles de plaguicidas organoclorados en carne y grasa de bovino procedentes de Veracruz, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 12, 53-59.
- Whitehead T.P., Thorpe G.H.G. y Maxwell S.R.J. (1992). Enhanced chemiluminescence assay for antioxidant capacity in biological fluid. *Analyt. Chim. Acta* 266, 265-277.