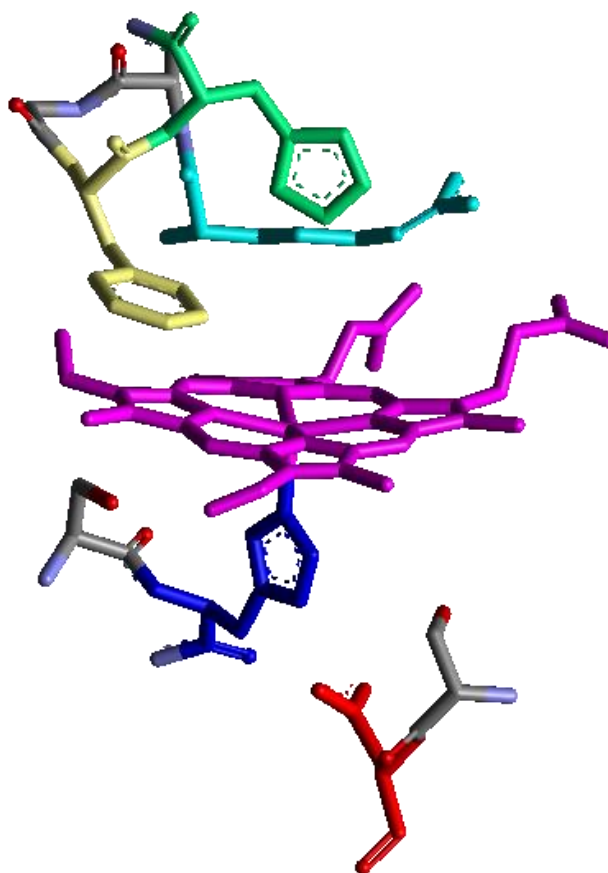


**Biocatálisis Ambiental: Detección, cuantificación y tratamiento de
contaminantes emergentes**

**Environmental biocatalysis: detection, quantification and transformation
of emerging pollutants**

Eduardo Torres*, Alia Méndez Albores.
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Centro de Química-ICUAP.
Edificio 103G Ciudad Universitaria. Tel (222) 2295500 ext. 7273
[*eduardo.torres@correo.buap.mx](mailto:eduardo.torres@correo.buap.mx)



Abstract

Enzymes are natural catalysts of living organisms used to accelerate biochemical reactions. The number of industrial and technological applications of enzymes is increased towards the development of green and sustainable processes. Here we described the relevance and use of peroxidases and laccases enzymes in the detection, quantification and oxidative treatment of organic pollutants, especially those unregulated compounds known as emerging contaminants. The enzymatic treatment of pollutants based on peroxidases and laccases is environmentally friendly, fast and efficient for the removal of the toxicity of the pollutants. On the other hand, the detection and quantification of the emerging contaminants, even at ultra-low concentrations (ng/L), can be possible using peroxidases and laccases as recognition elements in biosensors. The application of these enzymes in the modern biotechnology industry is envisaged in the near future.

Keybord: emerging pollutants, enzymatic biosensor, laccases, peroxidases

Introducción

Las enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones biológicas. Como todos los catalizadores, las enzimas disminuyen la energía de activación (Figura 1), es decir, disminuyen la cantidad de energía necesaria para llevar las moléculas a un estado de transición en la cima de la barrera de activación, sin alterar los parámetros termodinámicos como el cambio de energía libre de la reacción o la constante del equilibrio químico. Las reacciones catalizadas por las enzimas son de 10^3 a 10^{20} veces más rápidas que las mismas sin catalizar.

El éxito de las enzimas como catalizadores industriales se debe a las características exquisitas que presentan durante el proceso catalítico:

- Son altamente eficaces y específicas, ya que poseen gran poder catalítico y un elevado rendimiento, no forman subproductos indeseados y tienen la capacidad de reconocer a su sustrato, incluso entre sus isómeros, es decir son enantio- y regioselectivas.

ejemplos. En la tabla 1 se resumen otros ejemplos (Bommarius y Riebel-Bommarius, 2004) (Alvarado y Torres, 2009) (Schoemaker y col, 2003).

Tabla 1. Principales enzimas industriales y campos de aplicación

Industria	Enzima	Nombre comercial	Utilidad
Textil	Amilasas	Aquazym® Termamyl™	Eliminan el almidón usado para reforzar los hilos durante la urdimbre (desencolado) Reducen el uso de ácidos, bases y agentes oxidantes
	Catalasas	Terminox®	Convierten el H ₂ O ₂ en agua y oxígeno tras el blanqueamiento Reducen el lavado (ahorro de agua) Evitan el uso de agentes reductores
Tenerías e industrias del cuero y piel	Catalasas	Terminox®	Convierten el H ₂ O ₂ en agua y oxígeno tras el blanqueamiento antes del teñido Reducen el lavado (ahorro de agua) Evitan el uso de agentes reductores
Papelería	Celulasas alcalinas	Novozym® 342	Eliminan la tinta del papel antes de reciclado
	Lipasas	Resinase®	Eliminan restos de savia y depósitos de resina en la pasta papelería y en las máquinas
	Hemicelulasas Celulasas Oxidoreductasas	Pullpzyme®	Refuerzan el blanqueo del papel (bleach-boosting)
Aceites y grasas	Enzimas pectolíticas	Olivex™	Aumentan el rendimiento de extracción de aceite de oliva Facilitan la separación del aceite durante el prensado
	Lipasas	Liposyme® IM Novozyme 398	Hidrolizan triglicéridos y ésteres. Síntesis de ésteres para producción de sabores y aromas y para su uso como tensoactivos y en cosmética
	Fosfolipasas	Lecitase®	Desengomado de aceites
Zumos y viticultura	Enzimas pectolíticas	Pectinex® Ultrazym® Vinozym® Citrozym™ Vinoflow™ Peelzyme™	Eliminan las pectinas, disminuyendo la viscosidad y mejorando la filtración, la clarificación y el rendimiento de extracción, así como el color y sabor.
	Glucosidasas	Novoferm® 12	Hidrolizan los terpenilglicósidos del mosto y reforzar el aroma
	B-Glucanasas	Glucanex®	producción vino a partir de uvas botritizadas, hidrolizando los betaglucanos que dificultan la extracción
Cervecería	α-Amilasas Gluconasas Proteasas Amilasas termoestables Ceremix®	Cereflo® Neutrased® Ultraflo™ Termamyl	Elaboración de cerveza hasta con 100% de cereales no malteados Licuefacción de granos crudos Producción de cerveza de bajo contenido en calorías
	Proteasas Enzimas disgregantes de proteínas	Neutrased®	Mayor control de la cantidad de nitrógeno Mayor crecimiento de la levadura y la fermentación

Un área interesante de aplicación de las enzimas es la biocatálisis ambiental (Duran y Esposito, 2000, Karam y Nicell, 1997, Torres y col, 2003). Podemos definir este campo como la detección, la cuantificación y el tratamiento de contaminantes orgánicos. Para esto, se necesita de enzimas que tengan características contrarias a las necesarias para síntesis, es decir, se necesita de enzimas poco selectivas y específicas con una amplia variabilidad de sustratos, ¿porqué?, porque es deseable que con una sola enzima se puedan tratar los diferentes contaminantes de un efluente, el cual acarrea una amplia gama de compuestos orgánicos e inorgánicos. Las enzimas que cumplen con estos requisitos son las peroxidasas y las lacasas, que son enzimas oxidativas con una gran capacidad de reconocer sustratos aromáticos de diferentes naturaleza química. En los organismos estas enzimas tienen diversas variedad de funciones, desde defensivas, de protección antioxidante, de síntesis y de degradación (Dunford, 1999). En la Figura 2 se muestran las estructuras tridimensionales de estos catalizadores biológicos. Para el caso de las peroxidasas, éstas poseen un grupo hemo, el cual es el centro activo de la catálisis (el grupo hemo es un grupo presente también en otras proteínas como la hemoglobina, a la cual le confiere su característico color rojo). El grupo hemo se encuentra unido a la proteína solo por interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, dentro de un canal de acceso que permite el ingreso de las moléculas a oxidarse. Como su nombre lo indica, las peroxidasas usan peróxido de hidrógeno como agente oxidante. Por otro lado, las lacasas poseen como grupo activo un racimo de átomos de cobre, los cuales llevan a cabo la oxidación de los sustratos con usando oxígeno como agente oxidante.

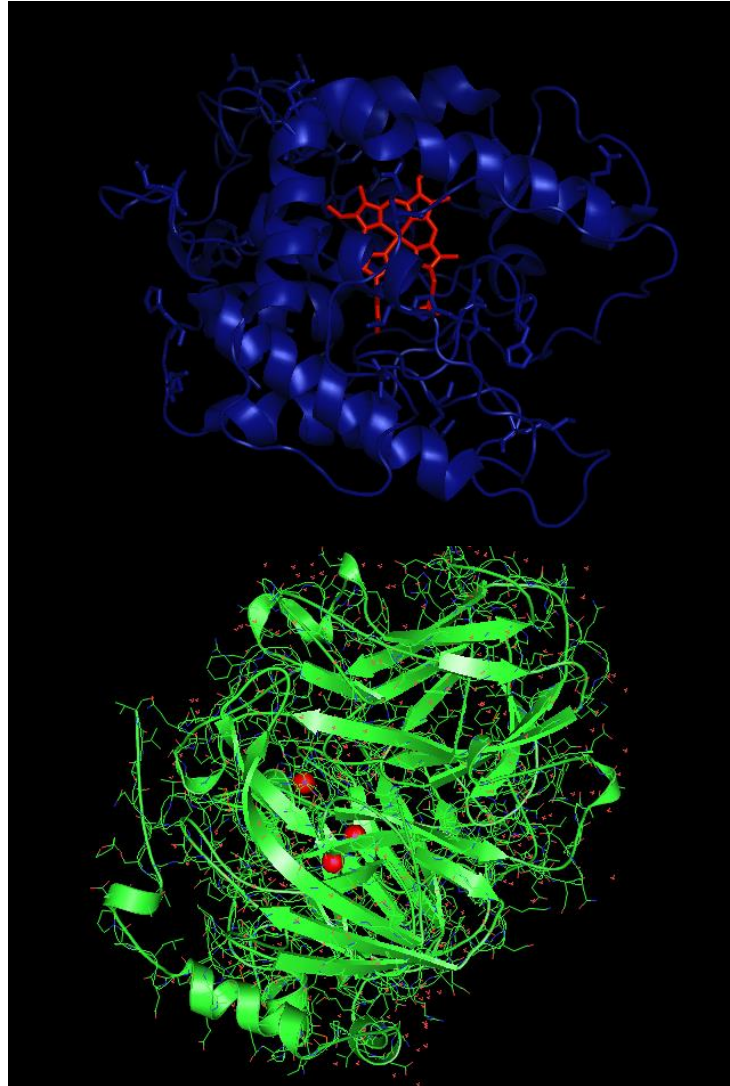


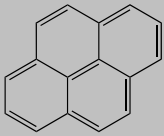
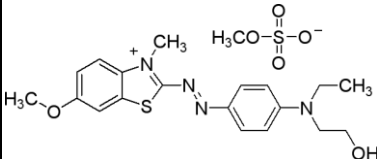
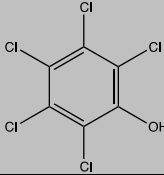
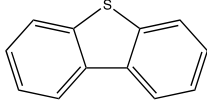
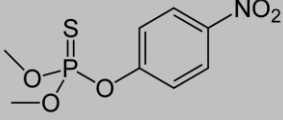
Figura 2. Estructuras tridimensionales de la enzimas cloroperoxidasa (superior) del hongo *Caldariomyces fumago* y lacasa (inferior) del hongo *Corioloopsis gallica*. En rojo se destacan el grupo hemo de la cloroperoxidasa y los átomos de cobre de la lacasa, en ambos casos forman parte del sitio en donde se llevan a cabo las reacciones.

Como se mencionó, estas enzimas son útiles para catalizar la oxidación de compuestos contaminantes de familias aromáticas como los plaguicidas organofosforados, colorantes tipo azo, plaguicidas organoclorados y organofosforados, hidrocarburos policíclicos aromáticos y compuestos azufrados del petróleo, entre otros (Torres y Ayala, 2010). Las reacciones son realmente rápidas, con tiempos alrededor de 2 a 10 minutos para una completa conversión en concentraciones de partes por millón o incluso partes por billón.

En la Tabla 2 se ilustran algunas de estas reacciones. La oxidación enzimática de contaminantes da lugar a productos no tóxicos, o de toxicidad disminuida miles de veces, además de ser más fácilmente biodegradables al ser activados con la oxidación. En el caso de los hidrocarburos policíclicos aromáticos, como el pireno por ejemplo, su oxidación reduce su concentración mínima mutagénica (cantidad mínima para provocar efectos en el ADN) por completo (Torres, Bustos-Jaimes y Le Borgne, 2003). El caso de los organoazufrados del petróleo es un caso interesante de reacción ya que su oxidación produce sulfonas, cuyo punto de ebullición es más elevado que la molécula sin oxidar, y permitiendo su separación de la corriente de petróleo dentro de la columna de destilación, lo que repercute en la producción de derivado de petróleo con menor contenido de azufre (Ayala y col, 2000, Ayala y col, 1998). En el caso de los fenoles, su oxidación produce dímeros, trímeros y polímeros, que pueden ser separados por una simple filtración, con ello se reduce de manera importante la toxicidad de los efluentes que contengan fenoles, como los encontrados en la industria de refinación del petróleo (Ibrahim y col, 2001, Wagner y Nicell, 2001). Los colorantes azo (azul de maxilón en la tabla 2) son compuestos que impactan al ambiente, en especial el agua, de manera muy grave, ya que además al degradarse en los cuerpos de agua naturales (o en algunas plantas de tratamiento biológico) sus metabolitos generan aminas mutagénicas, es decir, el producto es altamente tóxico que altera la información genética de un organismo (Chung y Cerniglia, 1992, Golka y col, 2004).

Con la aplicación de las enzimas para la oxidación de los colorantes esta propiedad desaparece, y los productos además de ser no mutagénicos son fácilmente biodegradables, ya que se hidroliza el compuesto (Abadulla y col, 2000, Champagne y Ramsay, 2010, Chivukula y col, 1995, Guerrero y col, 2013). Para el caso de los plaguicidas organofosforados los productos de reacción son más tóxicos (Hernandez y col, 1998), al igual que con algunos hidrocarburos policíclicos aromáticos en donde los productos de oxidación resultan estar clorados (Vazquez-Duhalt y col, 2001). En estos casos no es recomendable aplicar un tratamiento enzimático.

Tabla 2. Reacciones catalizadas por peroxidasas y lacasas para algunos contaminantes aromáticos

Compuesto	Producto	
Pireno (carcinógeno, mutagénico)		1,8-Pirenodiona (no mutagénico ni carcinógeno)
Azul de mexilón (metabolitos mutagénico)		Producto hidrolizado, sin carácter mutagénico
Pentaclorofenol		Tetraclorobenzoquinona, más biodegradable
Dibenzotiofeno		Sulfóxido de dibenzotiofeno, más biodegradable
Paratión		Paraoxón, más tóxico

La contaminación ambiental conocida por todos tiene un aspecto menos célebre, aquella provocada por compuestos orgánicos que pesábamos no contaminarían, o que son tan nuevos en la naturaleza que no existe regulación ambiental sobre ellos, no se sabe de su distribución en los compartimientos aunque su toxicidad ya ha sido determinada para muchos de ellos (Barceló y López de Alda, 2011). Estos compuestos son llamados contaminantes emergentes, dado que se conoce para algunos de ellos su grave impacto ambiental. Algunos ejemplos de contaminantes emergentes son: surfactantes, plaguicidas, productos farmacéuticos, productos para el cuidado personal, aditivos de las gasolinas, antisépticos, aditivos industriales, esteroides y hormonas y subproductos de la desinfección del agua. El destino final de estas sustancias depende de sus propiedades fisicoquímicas, habiendo sido encontradas en todos los compartimientos ambientales, principalmente en agua. El efecto de estas sustancias ubicuas, persistentes y biológicamente activas en la salud ha sido determinado para varios de ellos, dependiendo de su naturaleza pueden ser tóxicos al sistema nervioso,

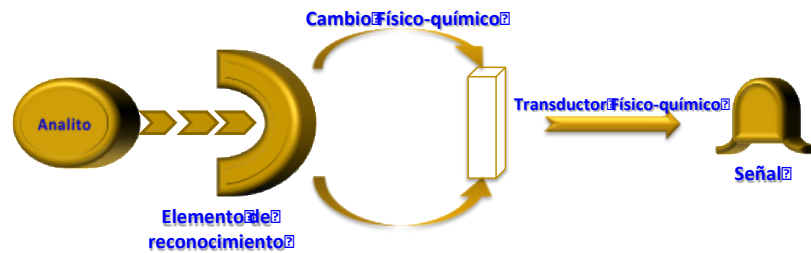
mutagénicos, carcinógenos, estrogénicos, etc. (Bowe, 2012, Fent y col, 2006). Por ejemplo, el estradiol es un fármaco utilizado en su mayoría en la veterinaria para fines reproductivos de los animales. Se sabe ahora que las reses desechan una gran cantidad de este compuesto en su orina principalmente, y el compuesto ha migrado al suelo, agua y a los organismos acuáticos, provocando en estos cambios hormonales que amenazan su reproducción, y por ende, su sobrevivencia. El estradiol es causante de feminización y hermafroditismo en los peces, así como disminución de la fertilidad en humanos. Lejos de disminuir el impacto ambiental de estos compuestos se cree aumentará debido a las necesidades de incremento en la producción de alimentos a nivel mundial (caso de plaguicidas, antibióticos, hormonales) o al envejecimiento de la población que requerirán mayores cuidados hospitalarios (para el caso de fármacos). Por lo anterior, los contaminantes emergentes constituyen un área intensa de investigación y estudio para su detección, cuantificación y tratamiento.

Las concentraciones de algunos contaminantes emergentes a las que se han encontrado en aguas superficiales (como consecuencia de una eliminación incompleta en las plantas de depuración de aguas) o en aguas subterráneas (debido a la escasa atenuación que experimentan algunos compuestos durante la filtración a través de suelos) se sitúan normalmente en el rango de ng/L o µg/L. En estos casos es necesario contar con técnicas confiables, ultrasensibles, rápidas, repetibles y reproducibles para su detección, cuantificación y tratamiento en los compartimientos ambientales, en alimentos u organismos.

El tratamiento biológico es el proceso más frecuentemente utilizado en la degradación de los contaminantes debido a su alta eficiencia, condiciones suaves de reacción y el bajo costo asociado. De hecho, los reactores biológicos más grandes del mundo son los reactores de tratamiento biológicos de aguas residuales. Un tren de tratamiento normalmente va acompañado de procesos físicos y químicos que facilitan la depuración de aguas complejas tanto de la industria como las domésticas. Sin embargo, para el caso de los contaminantes emergentes, las plantas convencionales de tratamiento de aguas residuales la población microbiana no está adaptada para eliminar estos tipos de compuestos, tanto por su naturaleza química sintética, como por sus bajas concentraciones, por lo que un porcentaje alto de estos compuestos no es transformado o es transformado parcialmente (Verlicchi y col, 2012). Por esta razón, aun después de un tren de tratamiento estos contaminantes han sido encontrados en agua potable en países como Alemania, España y Francia, en donde sus procesos de

purificación son avanzados (Díaz-Cruz y Barceló, 2005, Hernando y col, 2006). Nuevamente las enzimas oxidativas como lacasas y peroxidasas exhiben la capacidad de oxidar a estos contaminantes (Lloret y col, 2010, Lloret y col, 2013). Por ejemplo, el triclosan (TCS), un agente antibacteriano y fungicida de gran uso como desinfectante en hospitales, hogares e industria, es oxidado enzimáticamente por la lacasa de *Ganoderma lucidum*, produciendo dímeros y trímeros del triclosan (Murugesan y col, 2010). Los estudios de toxicidad de estos productos revelaron que la oxidación mediada por esta enzima efectivamente redujo la toxicidad del triclosán, con una conversión final del 100% hacia productos no tóxicos o menos tóxicos (Murugesan, Chang, Kim, Jeon, Kim y Chang, 2010). Otros compuestos farmacéuticos han sido completamente oxidados por lacasas de otras fuentes como la de *Myceliophthora thermophila* (Lloret, Eibes, Lú-Chau, Moreira, Feijoo y Lema, 2010). Entre estos compuestos se encuentran antiinflamatorios (diclofenaco y naproxeno) y estrógenos (estrona, 17 β -estradiol, 17 β -etinilestradiol) (Lloret, Eibes, Moreira, Feijoo y Lema, 2013, Suzuki y col, 2003). En relación a las peroxidasas, algunos estudios reportan la habilidad de estas enzimas de oxidar fármacos aromáticos. Wen et al (2009; 2010) (Wen y col, 2010, Wen y col, 2009) reportaron la oxidación de dos antibióticos abundantes, la tetraciclina y la oxitetraciclina, por extractos crudos de lignino peroxidasa del hongo *Phanerochaete chrysosporium*, con una conversión del 95% en 5 minutos. De este mismo hongo, la enzima manganeso peroxidasa tiene la capacidad de oxidar a las hormonas esteroideas 17 β -estradiol y el etinilestradiol con una conversión del 95% y una remoción del 80% de la actividad estrogénica.

En otro ejemplo, el bisfenol- A y el nonilfenol fueron oxidados por la lacasa de *Coriolopsis gallica* (Torres-Duarte y col, 2012). De acuerdo con el reporte, la lacasa fue capaz de catalizar la transformación de estos compuestos, produciendo polímeros como productos de reacción. La actividad estrogénica que exhibían los compuestos desapareció al oxidarlos enzimáticamente. Como puede apreciarse, las enzimas oxidativas tienen potencial de ser aplicables como parte de los métodos de tratamiento ambiental novedosos dado las altas conversiones y la disminución importante de la toxicidad. Pero ¿qué hay en cuanto a la detección y cuantificación?



Esquema 1. Representación del funcionamiento de un biosensor.

La capacidad de estas enzimas de transformar a los contaminantes emergentes puede utilizarse también con fines de detección y cuantificación, formando parte de biosensores analíticos. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), define a un biosensor como un dispositivo que comprende un elemento de reconocimiento biológico o derivado biológico que esté integrado o íntimamente relacionado con un transductor físico-químico. El esquema 1, y Figura 3 muestran de manera ilustrativa el funcionamiento y los componentes de un biosensor. El elemento biológico es capaz de reconocer la presencia, actividad o concentración de un analito específico en solución. El reconocimiento puede ser un proceso de unión, por ejemplo, un biosensor basado en la afinidad consiste en un anticuerpo, ácido nucleico, receptor proteico o receptor celular, y un receptor sintético. La otra clase de elementos de reconocimiento se basa en reacciones biocatalíticas, por ejemplo, los biosensores derivados de enzimas, microorganismos, cortes de tejido, y los catalizadores biomiméticos.

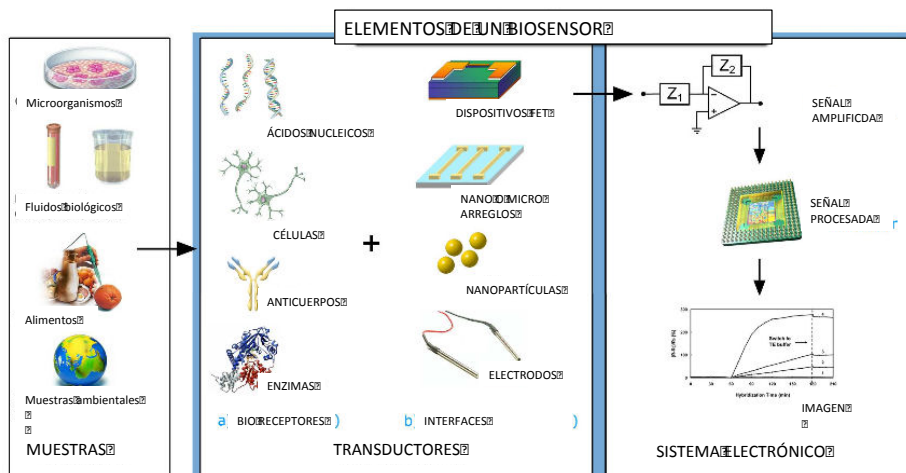


Figura 3. Componentes de un biosensor

La característica fundamental y más importante de un biosensor es la construcción del elemento biológico de reconocimiento o más específicamente del sitio biológico de reconocimiento para la interacción con el analito seleccionado. Estos materiales biológicos pueden ser proteínas, como las enzimas; los biosensores que utilizan enzimas como elemento de reconocimiento representan el área más extensamente estudiada. La alta especificidad de las interacciones enzima-sustrato, y las velocidades de reacción generalmente altos de los biocatalizadores, han impulsado el camino hacia la medición sensible y específica de los biosensores basados en enzimas (Amine y col, 2006, Arduini y Amine, 2014, Choi, 2004). En la tabla 3 se resumen algunas metodologías para la detección de contaminantes emergentes usando peroxidases como elementos de reconocimiento de un biosensor. Como puede apreciarse, se han detectado en concentraciones ultrabajas diferentes contaminantes emergentes como fármacos y plaguicidas usando principalmente a la peroxidasa de rábano (Castilho y col, 2005, Chen y col, 2007, Ding y col, 2008, Hartmann, 2005). Los transductores empleados son generalmente del tipo electroquímico. Los límites de detección, es decir, la concentración mínima de analito que puede detectarse, está en el orden de ng/L, y los tiempo de respuesta pueden ser tan cortos como 2 minutos en matrices complejas como el diesel.

La detección usando biosensores a base de enzimas puede realizarse de dos maneras diferentes: una por medición directa, es cuando el analito es transformado por la enzima, y el producto de reacción presenta propiedades fisicoquímicas diferentes al analito para ser selectivamente monitoreado por alguna técnica instrumental; ejemplo de ellos es la cuantificación del contenido azufre en diesel, parámetro importante de la calidad de un diesel. Este caso es particularmente interesante dado que la sensibilidad de la detección es mayor que la lograda con instrumentos costosos como la fluorescencia de rayos X o la fluorescencia ultravioleta acoplada a oxidación. En este ejemplo, se oxida a los compuestos aromáticos del diesel, incluidos los organoazufrados usando a la enzima cloroperoxidasa durante 2 minutos en presencia de peróxido de hidrógeno. El diesel oxidado presenta propiedades espectroscópicas diferentes que permiten cuantificar a los azufrados de manera selectiva en la mezcla. En el espectro de fluorescencia de los azufrados oxidados, los cuales tienen propiedades espectroscópicas diferentes al resto de compuestos presentes en el diesel, por lo que su señal de fluorescencia se puede separar y leer sin interferencias (Aburto y col, 2013).

Tabla 3. Ejemplos de metodologías o biosensores a base de peroxididasas para la detección de contaminantes emergentes

Analito	Rango dinámico*	Límite de detección**	Transductor
Leveritacem	0.1-0.83 mM	1.75×10^{-2} mM	Electroquímico
Adrenalina	9.87×10^{-7} - 1.22×10^{-4} M	-	Electroquímico
Aminas biogénicas	40-470 ng/mL	17 ng/mL, tiempo de respuesta 5 s	Electroquímico
Fenoles clorados	10 pM - 10^{-6} M	1 pM	Electroquímico
Sulfametoxazol	-	0.002 nM	Electroquímico
Dopamina	3.3×10^{-5} – 1.3×10^{-3} M	2×10^{-6}	Electroquímico
Sulfuros	$0.6 - 7^{-6}$ M	0.4^{-6} M	Óptico
Paracetamol	1×10^{-5} – 4.9×10^{-4}	3.1×10^{-6} (135 s response time)	Electroquímico
Cd ⁺²	2 – 30 μ g/L	0.51 μ g/L	Electroquímico
PB ⁺²	0.092 – 0.55 μ g/L	2.5 μ g/L	Electroquímico
Glifosato	0.1 4.55 mg/L	30 μ g/L	Electroquímico
Tamoxifen	-	0.07 ng/mL	Electroquímico
Diclofention	-	24 μ M	Electroquímico
Azufre en diesel	1 – 6 ppb	0.84 ppb, tiempo de respuesta 2 m	Óptico

* Rango dinámico se refiere al intervalo de concentraciones del analito en el que hay linealidad entre la concentración y la respuesta analítica.

** Límite de detección es la concentración más baja del analito que puede ser detectada por el instrumento o dispositivo

En la segunda modalidad de detección, se utiliza un sustrato estándar de la enzima, y la presencia del analito interfiere con la catálisis, provocando cambios en la velocidad de reacción, estos cambios son proporcionales a la concentración del analito presente, por lo que puede detectarse y cuantificarse. Esta metodología es empleada en la cuantificación de glifosato, plaguicida altamente tóxico. En este ejemplo, la peroxidasa lleva a cabo una reacción estándar, como se explica a continuación, la enzima reacciona primero con el peróxido de hidrógeno para llevarla a un estado de oxidación alto, la enzima oxidada interactúa con la hidroquinona oxidándola dos veces para producir la *p*-benzoquinona, ésta última en contacto con el electrodo se reduce con los electrones provenientes del electrodo, cerrando el ciclo. Los cantidad de electrones que fluyen por el electrodo por unidad de tiempo son una medida de la velocidad de reacción. En presencia del glifosato, hay una competencia de la hidroquinona y el plaguicida por los sitios activos de la enzima; si el plaguicida presenta buena afinidad por el sitio de la enzima puede inhibirla, es decir, reducir la velocidad con que oxida a la hidroquinona, esto se refleja en último término en la menor cantidad de electrones que fluyen desde el electrodo. La disminución de la velocidad es una medida proporcional del glifosato presente en la mezcla de reacción (Oliveira y col, 2012).

Conclusión

La biocatálisis ambiental usando enzimas oxidativas es una tecnología potencial prometedora para la detección, cuantificación y transformación de contaminantes emergentes dada la versatilidad de las peroxidasas y lacasas. La transformación de estos compuestos es rápida, con altas conversiones y los productos oxidados presentan niveles mínimos o nulos de toxicidad. La detección y cuantificación usando biosensores a base de peroxidasas y lacasas presenta límites de detección ultrabajos y tiempos de respuesta cortos.

Referencias

- Abadulla, E.; Tzanov, T.; Costa, S.; Robra, K. H.; Cavaco-Paulo, A. Gubitzi, G. M. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta* *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3357-3362. (2000)
- Aburto, P.; Zuñiga, K.; Campos-Terán, J.; Aburto, J. Torres, E. Quantitative Analysis of Sulfur in Diesel by Enzymatic Oxidation, Steady-State Fluorescence, and Linear Regression Analysis. *Energy Fuels.* **28**: 403-408. (2013)
- Alvarado, B. Torres, E. Recent patents in the use of peroxidases. *Recent Pat. Biotechnol.* **3**: 88-102. (2009)
- Amine, A.; Mohammadi, H.; Bourais, I. Palleschi, G. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosensors and Bioelectronics.* **21**: 1405-1423. (2006)
- Arduini, F. Amine, A., Biosensors Based on Enzyme Inhibition. In Biosensors Based on Aptamers and Enzymes; M. B. Gu and H.-S. Kim Ed.; Springer Berlin Heidelberg: 2014, Vol. 140, 224 224; pp 299-326
- Ayala, M.; Robledo, N. R.; Lopez-Munguia, A. Vazquez-Duhalt, R. Substrate Specificity and Ionization Potential in Chloroperoxidase-Catalyzed Oxidation of Diesel Fuel. *Environ. Sci. Technol.* **34**: 2804-2809. (2000)
- Ayala, M.; Tinoco, R.; Hernandez, V.; Bremauntz, P. Vazquez-Duhalt, R. Biocatalytic oxidation of fuel as an alternative to biodesulfurization. *Fuel Process. Technol.* **57**: 101-111. (1998)
- Bommarius, A. S. Riebel-Bommarius, B. R. *Biocatalysis: Fundamentals and Applications*, Ed. Wiley-VCH Verlag P. 634. Atlanta, USA, (2004)
- Castilho, T. J.; Sotomayor, M. D. P. T. Kubota, L. T. Amperometric biosensor based on horseradish peroxidase for biogenic amine determinations in biological samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **37**: 785-791. (2005)
- Champagne, P. P. Ramsay, J. A. Dye decolorization and detoxification by laccase immobilized on porous glass beads. *Bioresour. Technol.* **101**: 2230-2235. (2010)
- Chen, X.; He, M.; Cai, Q. Shi, H. Horseradish peroxidase biosensor using electrode modified with osmium polymer. *Qinghua Daxue Xuebao/Journal of Tsinghua University.* **47**: 1473-1476. (2007)
- Chivukula, M.; Spadaro, J. T. Renganathan, V. Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides. *Biochemistry.* **34**: 7765-7772. (1995)

- Choi, M. M. F. Progress in Enzyme-Based Biosensors Using Optical Transducers. *Microchim. Acta.* **148**: 107-132. (2004)
- Chung, K. T. Cerniglia, C. E. Mutagenicity of azo dyes: structure-activity relationships. *Mutat. Res.* **277**: 201-220. (1992)
- Díaz-Cruz, M. S. Barceló, D. LC-MS2 trace analysis of antimicrobials in water, sediment and soil. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* **24**: 645-657. (2005)
- Ding, C.; Zhang, M.; Zhao, F. Zhang, S. Disposable biosensor and biocatalysis of horseradish peroxidase based on sodium alginate film and room temperature ionic liquid. *Anal. Biochem.* **378**: 32-37. (2008)
- Dunford, H. B. *Heme Peroxidases*, Ed. Wiley -VCH P. 507. USA, (1999)
- Duran, N. Esposito, E. Potential applications of oxidatives enzymes and phenoxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B:Environmental.* **28**: 83-99. (2000)
- Fent, K.; Weston, A. A. Caminada, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* **76**: 122-159. (2006)
- Golka, K.; Kopps, S. Myslak, Z. W. Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. *Toxicol. Lett.* **151**: 203-210. (2004)
- Guerrero, E.; Aburto, P.; Terrés, E.; Villegas, O.; González, E.; Zayas, T.; Hernández, F. Torres, E. Improvement of catalytic efficiency of chloroperoxidase by its covalent immobilization on SBA-15 for azo dye oxidation. *J. Porous Mat.* **20**: 387-396. (2013)
- Hartmann, M. Ordered Mesoporous Materials for Bioadsorption and Biocatalysis. *Chem. Mater.* **17**: 4577-4593. (2005)
- Hernandez, J.; Robledo, N. R.; Velasco, L.; Quintero, R.; Pickard, M. A. Vazquez-Duhalt, R. Chloroperoxidase-Mediated Oxidation of Organophosphorus Pesticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* **61**: 87-94. (1998)
- Hernando, M. D.; Mezcuca, M.; Fernández-Alba, A. R. Barceló, D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta.* **69**: 334-342. (2006)
- Ibrahim, M. S.; Ali, H. I.; Taylor, K. E.; Biswas, N. Bewtra, J. K. Enzyme-catalyzed removal of phenol from refinery wastewater: feasibility studies. *Water and Environmental Research.* **73**: 165-172. (2001)
- Karam, J. Nicell, J. A. Potential applications of enzymes in waste treatment. *J Chem Technol Biotechnol.* **69**: 141-153. (1997)
- Lloret, L.; Eibes, G.; Lú-Chau, T. A.; Moreira, M. T.; Feijoo, G. Lema, J. M. Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens. *Biochem. Eng. J.* **51**: 124-131. (2010)
- Lloret, L.; Eibes, G.; Moreira, M. T.; Feijoo, G. Lema, J. M. Removal of Estrogenic Compounds from Filtered Secondary Wastewater Effluent in a Continuous Enzymatic Membrane Reactor. Identification of Biotransformation Products. *Environ. Sci. Technol.* **47**: 4536-4543. (2013)
- Murugesan, K.; Chang, Y.-Y.; Kim, Y.-M.; Jeon, J.-R.; Kim, E.-J. Chang, Y.-S. Enhanced transformation of triclosan by laccase in the presence of redox mediators. *Water Res.* **44**: 298-308. (2010)
- Oliveira, G. C.; Moccelini, S. K.; Castilho, M.; Terezo, A. J.; Possavatz, J.; Magalhães, M. R. L. Dores, E. F. G. C. Biosensor based on atemoya peroxidase immobilised on modified nanoclay for glyphosate biomonitoring. *Talanta.* **98**: 130-136. (2012)
- Schmid, A.; Dordick, J. S.; Kiener, A.; Wubbolts, M. Witholt, B. Industrial biocatalysis: today and tomorrow. *Nature.* **409**: 258-268. (2001)

- Suzuki, K.; Hirai, H.; Murata, H. Nishida, T. Removal of estrogenic activities of 17 β -estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Water Res.* **37**: 1972-1975. (2003)
- Torres, E. Ayala, M. *Biocatalysis based on heme peroxidases*, Ed. Springer P. 325. Germany, (2010)
- Torres, E.; Bustos-Jaimes, I. Le Borgne, S. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Appl. Catal. B.* **46**: 1-15. (2003)
- Torres-Duarte, C.; Viana, M. Vazquez-Duhalt, R. Laccase-Mediated Transformations of Endocrine Disrupting Chemicals Abolish Binding Affinities to Estrogen Receptors and Their Estrogenic Activity in Zebrafish. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **168**: 864-876. (2012)
- Vazquez-Duhalt, R.; Ayala, M. Marquez-Rocha, F. Biocatalytic chlorination of aromatic hydrocarbons by chloroperoxidase of *Caldariomyces fumago* *Phytochemistry.* **28**: 929-933. (2001)
- Verlicchi, P.; Al Aukidy, M. Zambello, E. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. *Sci. Total Environ.* **429**: 123-155. (2012)
- Wagner, M. Nicell, J. A. Peroxidase-catalyzed removal of phenols from a petroleum refinery wastewater. *Water Sci. Technol.* **43**: 253-260. (2001)
- Wen, X.; Jia, Y. Li, J. Enzymatic degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude manganese peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Hazard. Mater.* **177**: 924-928. (2010)
- Wen, X.; Jia, Y. Li, J. Degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude lignin peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium* – A white rot fungus. *Chemosphere.* **75**: 1003-1007. (2009)