

# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

# FACULTAD DE BIOLOGÍA

Caracterización Cinética y Aplicaciones Biotecnológicas de Peroxidasas

Dña. Magdalena Parra Carrillo 2014



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

# FACULTAD DE BIOLOGÍA

Caracterización Cinética y Aplicaciones Biotecnológicas de Peroxidasas

Dña. Magdalena Parra Carrillo 2014



D<sup>a</sup>. Virginia Tomás Martínez, Profesora Titular de Universidad del Área de Química Analítica en el Departamento de Química Analítica, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Caracterización cinética y aplicaciones biotecnológicas de peroxidasas", realizada por D<sup>a</sup>. Magdalena Parra Carrillo, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 19 de Mayo de 2014

UNIVERSIDAD DE HURCIA FACULTAD DE QUIMICA namenio de Ciu nalitica





D. José Tudela Serrano, Catedrático de Universidad del Área de Bioquímica y Biología Molecular en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Caracterización cinética y aplicaciones biotecnológicas de peroxidasas", realizada por D<sup>a</sup>. Magdalena Parra Carrillo, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 19 de Mayo de 2014



# UNIVERSIDAD DE MURCIA



D. José Tudela Serrano, Catedrático de Universidad del Área de Bioquímica y Biología Molecular y Presidente Comisión Académica programa doctorado \* Biología Molecular y Biotecnología, INFORMA:

Que una vez evaluado, de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 21 del Reglamento de doctorado de la Universidad de Murcia, el expediente completo de la tesis doctoral titulada "Caracterización cinética y aplicaciones biotecnológicas de peroxidasas", realizada por D<sup>a</sup> Magdalena Parra Carrillo, bajo la inmediata dirección y supervisión de D<sup>a</sup>. Virginia Tomás Martínez y D. José Tudela Serrano, esta Comisión Académica, en sesión celebrada en fecha 23 de Mayo de 2014, ha dado su autorización para su presentación ante la Comisión General de Doctorado.

Murcia, a 23 de Mayo de 2014



Doctorando: D<sup>a</sup>. Magdalena Parra Carrillo

\*Informe del Departamento para alumnos del RD 778/1998.



# UNIVERSIDAD DE MURCIA

\*Informe de La Comisión Académica del Programa para alumnos del RD 56/2005 y RD 1393/2007.



School of Chemistry and Biochemistry

Sept. 17, 2012

Arthur J. Ragauskas, Professor of Chemistry School of Chemistry and Biochemistry Georgia Institute of Technology 500 10th St., NW, Atlanta, GA 30332 arthur.ragauskas@chemistry.gatech.edu

To Whom It May Concern

Dear Colleague:

It is my honor and pleasure to confirm that Magdalena Parra Carrillo was a guest researcher in my laboratory. During the period 03/08/2012 - 06/10/2012 she was involved in examining the novel applications of laccase to reduce the recalcitrance of biomass after an autohydrolysis pretreatment. During this time she received training on advanced biomass characterization techniques and advanced our knowledge in this critical field of study. Ms. M. Carrillo has attended our group meetings and has been a vital participant in my program.

Given her passion, dedication and professional attitude I am sure she we will be successful in her graduate studies and future career ambitions.

All Best,

Ragauskas

Arthur J. Ragauskas

School of Chemistry and Biochemistry Atlanta, Georgia 30332-0400 U.S.A. PHONE 404.894.4002 FAX 404.894.7452

A Unit of the University System of Georgia An Equal Education and Employment Opportunity Institution



## **External reviewer report**

Name of the reviewer: Arthur J. Ragauskas

Position: Professor of Chemistry

*Research center*: School of Chemistry and Biochemistry. Georgia Institute of Technology *Title of the Ph.D*:"Caracterización cinética y aplicaciones biotecnológicas de peroxidasa" *Name of the Ph.D candidate*: Magdalena Parra Carrillo

Specify the reasons endorsing the quality of the above-mentioned thesis for its defence: The thesis summarizes excellent studies in enzymatic oxidation research, characterization and advances the field of oxidoreductase derivatization of phenolic structures.

### What are the contributions of the Ph.D thesis?

In terms of general public interest, there are few higher priority fields that the development of sustainable biofunctionalization of bioresources. Your thesis provides scientific aspects which will undoubtedly garner attention in the scientific and public area. The data and results presented in this manuscript also have practical implications to white biotechnology and will draw strong from this industrial sector.

### Originality of the work:

The thesis contains a comprehensive literature survey based on a long list of references. However, the original research presented is in my opinion novel.

## Methodology used/hypotheses tested:

A number of different methods have been applied. This includes UV-VIS spectrometry and HPLC. Statistical methods and kinetic models are applied to analyze data and reach conclusions.

Observations:

Cf. the above

In consideration of all the above, is the Ph.D. thesis ready for its defense? Yes.

Sincerely,

Dn. A.L. Raganskoz

School of Chemistry and Biochemistry Atlanta, Georgia 30332-0400 U.S.A. PHONE 404•894•4002 FAX 404•894•7452

13- May - 2014

A Unit of the University System of Georgia An Equal Education and Employment Opportunity Institution



#### Informe de revisor externo

Nombre del revisor: Arthur J. Ragauskas Cargo: Profesor de Química Centro de investigación: School of Chemistry and Biochemistry. Georgia Institute of Technology Título de la tesis doctoral:"Caracterización cinética y aplicaciones biotecnológicas de peroxidasa" Nombre del doctorando: Magdalena Parra Carrillo

*Especificar los motivos que respaldan la calidad de la anteriormente citada tesis para su defensa:* 

La tesis resume excelentes estudios de investigaciones de oxidación enzimática, caracterización y fomenta el campo de derivatización oxidoreductasa de estructuras fenólicas.

#### Cuáles son las aportaciones de la tesis doctoral?

En términos de interés público general, hay pocos campos tan prioritarios como el desarrollo de biofuncionalización de biofuentes sostenibles. La tesis provee aspectos científicos que indudablemente ganarán la atención en el área científica y público general. Los datos y los resultados presentados en este manuscrito tienen también implicaciones prácticas con la biotecnología blanca y atraerán fuerte al sector industrial.

#### Originalidad del trabajo:

La tesis contiene un estudio bibliográfico exhaustivo basado en una larga lista de referencias. Sin embargo, la investigación original presentada resulta en mi opinión novedosa.

#### Metodología utilizada/hipótesis evaluadas:

Se han aplicado una serie de métodos diferentes. Esto incluye espectrometría UV-VIS y HPLC. Se han aplicado métodos estadísticos y modelos cinéticos para analizar los datos y llegar a las conclusiones.

Observaciones:

Véase arriba.

Teniendo en cuenta todo lo anterior ¿está la tesis doctoral lista para su defensa? Sí.

Firma de Arthur J. Ragauskas:

Sello y Fecha:

Dn. A.L. Raganskoz

School of Chemistry and Biochemistry Atlanta, Georgia 30332-0400 U.S.A. PHONE 404•894•4002 FAX 404•894•7452

13- May - 2014

A Unit of the University System of Georgia An Equal Education and Employment Opportunity Institution

Novozymes A/S Department 262 Protein Biochemistry Brudelysvej 32 DK-2880 Bagsværd Denmark

CENTER



INTRADA J7492/EFPi/J4 NCm: J8260 Docha: J5/9/J4 Bagsværd September 5th 2011

### Confirmation of research stay: Magdalena Parra

This is to confirm that Magdalena Parra Carrillo (internal Novozymes employee ID: MPCI) have conducted a proprietary and confidential research project in the Department Protein Biochemistry at Novozymes A/S in Bagsværd, Denmark in the period from May 29th until September 5th 2011.

Best regards

Rune Nygaard Monrad Research Scientist Novozymes A/S Tlf: 44461656 E-mail: <u>rnmo@novozymes.com</u>

Novozymes AIS Krogshøjvej 36 2880 Bagsværd

Novozymes A/S Department 262 Protein Biochemistry Brudelysvej 32 DK-28820 Bagsværd Denmark



Bagsværd 5 de septiembre 2011

Confirmación de estancia investigadora: Magdalena Parra

Esto es para confirmar que Magdalena Parra Carrillo (Trabajadora interna en Novozymes con ID: MPCI) ha llevado a cabo un proyecto de investigación confidencial y registrado en el Departamento de Bioquímica de Proteínas en Novozymes A/S en Bagsværd, Dinamarca, en el periodo del 29 de mayo al 5 de septiembre de 2011.

Saludos,

Rune Nygaard Monrad Científico de Investigación Novozymes A/S Tlf: 44461656 Email: <u>rnmo@novozymes.com</u>

Novozymes A/S Krogshøjvej 36 2880 Bagsværd



Novozymes A/S Krogshøjvej 36 DK-2880 Bagsværd Denmark Telephone: +45 4446 0000 Telefax:

E-mail: rnmo@novozymes.com Internet: www.novozymes.com CVR number: 10 00 71 27



## **External reviewer report**

Name of the reviewer: Rune Nygaard Monrad Position: Research Scientist Research center: Novozymes Title of the Ph.D. thesis: "Caracterización Cinética y Aplicaciones Biotecnológicas de Peroxidasas"

Name of the Ph.D. candidate: Magdalena Parra Carrillo

Specify reasons endorsing the quality of the above-mentioned thesis for its defence: The thesis presents a very comprehensive study of oxidoreductase kinetics and applications, focused mainly on the use of peroxidases and laccases for biodegradation of industrial pollutants. It is my opinion that Ms. Magdalena Parra Carrillo with the work presented fully meets the criteria required for awarding her with the doctoral (Ph.D.) degree.

#### What are the contributions of the Ph.D. thesis?

The thesis contains numerous novel contributions to the field, including kinetic data on peroxidase oxidation of the dyes Remazol Brilliant Blue and Indigo Carmine and laccase-mediated biodegradation of the mentioned dyes as well as characterization of the optimal conditions (pH and temperature) for methods for the enzymatic reactions. Furthermore, this thesis presents new methods for detection and quantification of low levels of phenols.

#### Originality of the work:

The thesis contains, as required, a comprehensive literature survey based on a long list of references. However, the original research presented is in my opinion novel.

### Methodology used / hypotheses tested:

A number of different methods have been successfully applied. Typically for biochemistry work, this includes spectroscopic methods such as UV-VIS spectrometry, HPLC, MS, GC, etc. Statistical methods and kinetic models are applied to analyse data and reach conclusions.

*Observations:* Cf. the above.

In consideration of all the above, is the Ph.D. thesis ready for its defence? Yes,

Rune Nygaard Monrad, M.Sc., Ph.D. Research Scientist, Novozymes R&D

9/5-2014

Novozymes A/S Krogshøjvej 36 2880 Bagsværd



Novozymes A/S Krogshøjvej 36 DK-2880 Bagsværd Denmark Telephone: +45 4446 0000 Telefax: E-mail: rnmo@novozymes.com Internet: www.novozymes.com CVR number: 10 00 71 27



## Informe de revisor externo

Nombre del revisor: Rune Nygaard Monrad Cargo: Científico de investigación Centro de investigación: Novozymes Título de la tesis doctoral: "Caracterización Cinética y Aplicaciones Biotecnológicas de Peroxidasas"

Nombre del doctorando: Magdalena Parra Carrillo

*Especificar los motivos que respaldan la calidad de la anteriormente citada tesis para su defensa:* La tesis presenta un estudio exhaustivo de la cinética de oxidoreductasas y aplicaciones, enfocado principalmente al uso de peroxidasas y lacasas para la biodegradación de contaminantes industriales. Es mi opinión que la Señorita Magdalena Parra Carrillo con el trabajo presentado reúne totalmente los criterios requeridos para la obtención de su grado de doctor (Ph.D).

#### ¿Cúales son las aportaciones de la tesis doctoral?

La tesis contiene numerosas contribuciones nuevas en el campo, incluyendo datos cinéticos de oxidación de peroxidasa de los colorantes Remazol Brilliant Blue e Indigo Carmine y biodegración con lacasa y mediadores y la caracterización de las condiciones óptimas (pH y temperatura) de métodos para las reacciones enzimáticas. Además, esta tesis presenta nuevos métodos para la detección y cuantificación de bajos niveles de fenoles.

#### Originalidad del trabajo:

La tesis contiene, como se requiere, de un amplio estudio bibliográfico basado en una larga lista de referencias. Sin embargo, la investigación original presentada es en mi opinión novedosa.

#### Metodología utilizada/hipótesis evaluadas:

Se han aplicado satisfactoriamente diferentes métodos. Típicamente para el trabajo bioquímico, esto incluye métodos espectrométricos como espectrometría UV-VIS, HPLC, MS, GC, etc. Para analizar los datos y las conclusiones de la investigación se han aplicado métodos estadísticos y modelos cinéticos.

Observaciones: Véase arriba.

Teniendo en cuenta todo lo anterior ¿Está la tesis doctoral lista para su defensa? Sí.

Rune Nygaard Monrad, M.Sc., Ph.D. Research Scientist, Novozymes R&D

5-2014

Novozymes A/S Krogshøjvej 36 2880 Bagsværd



Novozymes A/S Krogshøjvej 36 DK-2880 Bagsværd Denmark Telephone: +45 4446 0000 Telefax: E-mail: rnmo@novozymes.com Internet: www.novozymes.com CVR number: 10 00 71 27



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR-A

# UNIVERSIDAD DE MURCIA

Los estudios realizados en esta Memoria han sido parcialmente financiados por

las subvenciones correspondientes a los siguientes Proyectos de Investigación, con la colaboración de la empresa Novozymes Spain S.A.:

- Aplicaciones biotecnológicas de nuevas polifenoloxidasas comerciales (MEC, Programa Nacional de Biotecnología, BIO2006-15363). Investigador Principal: Dr. José Tudela Serrano.
- Polifenoloxidasas y mediadores para el análisis enzimático de sustancias con interés biotecnológico. Programa Nacional de Biotecnología, BIO2009-12956, MICINN, España. Investigador Principal Dr. José Tudela Serrano.
- Biocatálisis enzimática con nuevos sistemas polifenoloxidasas-mediadores (Consejería de Educación y Cultura, BIOCARM-Programa Sectorial de Biotecnología, Proyecto BIO-BMC 06/01-0004). Investigador Principal: Dr. José Tudela Serrano.
- Nuevas polifenoloxidasas con aplicaciones bioanalíticas de alto rendimiento. Fundación Séneca, 08856/PI/08, CARM, Murcia, España. Investigador Principal Dr. José Tudela Serrano.
  - La autora de esta Memoria ha disfrutado de las siguientes ayudas:
- Beca de Investigación Predoctoral de la Fundación Séneca. Programa Regional de Formación de Personal Investigador. Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (CARM). Expte. 09378/FPI/08. Periodo 01/01/2009 al 31/12/2012. Director: Dr. José Tudela Serrano.
- Beca de Formación Práctica. Universidad de Murcia. Procedente del Contrato de Investigación Dermocosméticos naturales basados en extractos de plantas aromáticas, vinculado al Proyecto CDTI IDI 20110316-7, con las empresas Esencias Martínez Lozano S. A. y Alissi Brontë S.L. Investigador Principal Dr. José Tudela Serrano.

En Murcia, a 28 de Abril de 2014.

El Investigador Principal

Fdo.: Dr. José Tudela Serrano.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera han sido participes en el desarrollo de la presente Memoria:

A los doctores Virginia Tomás Martínez y José Tudela Serrano, por darme la oportunidad de entrar a formar parte de un grupo de investigación tan importante como es el GENZ, donde he aprendido mucho y he vivido grandes experiencias. Gracias por vuestra paciencia, enseñanzas y ayuda en todo lo que he necesitado.

A mis **padres**, sin ellos nada de esto hubiese sido posible. Gracias por vuestro esfuerzo diario para que consiguiera una formación universitaria, por vuestro amor incondicional y vuestro apoyo. A **mis hermanos**, **mi abuela Soledad**, **mi cuñada y mi preciosa sobrina Sofía**, fuente de mi inspiración.

A Jesús, mi eterno compañero de laboratorio que se ha convertido en un gran amigo, empezamos juntos en este proyecto y lo terminamos casi a la vez. Son siete años llenos de vivencias y emociones y tal y como él escribió en sus agradecimientos, compañero de deporte, fiesta... y lo que surja.

Al resto de compañeros de laboratorio, **los chicos de Tudela** (Alejandro, Vanesa, Ana Belén y Antonio), **los chicos de Paco** (Paquito, José Luis y Mar) y **los chicos de Neptuno** (Magalí, Maria Piedad, Luis y Mar Collado). Además, a todos aquellos que han ido pasando como alumnos de Máster o alumnos internos como **Rafa y Enrique**. Gracias a todos por los innumerables momentos en *La sala del té*, donde además de té y café habían numerosas risas y discusiones.

A Lidia (alias Yiya) y Paula de República Dominicana, a las que ayudé en sus Tesis de Máster y me hizo comprender mi vocación por enseñar. Gracias por convertiros en mis amigas fuera del laboratorio y todos los momentos vividos; especialmente de risas.

A todos los miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A de la Universidad de Murcia, especialmente al resto de compañeros del grupo GENZ Paco Cánovas, José Neptuno, Sole y Fernanda. También al resto de profesores, Encarna Muñoz, Javier Campoy y Cecilio Vidal, personas a las que he ido viendo diariamente durante siete años.

Al **Dr. Rune Nygaard Monrad** de la empresa multinacional Novozymes, y al **Dr.Arthur J. Ragauskas** de la Universidad norteamericana Georgia Tech, por darme la oportunidad de hacer estancias en sus centros de investigación y apoyarme en todo lo que he necesitado. Gracias por las vivencias tanto profesionales como personales y la oportunidad de lograr mi sueño, el obtener un doctorado internacional.

A la Fundación Séneca, por confiar en mí y otorgarme la beca predoctoral y especialmente a Viviane Barelli, por ayudarme en todo lo que he necesitado de la fundación. A las empresas con las que he colaborado en proyectos de investigación, entre ellas Alissi Brontë y Esencias Martínez Lozano, con las que he obtenido experiencia en empresa.

**A mis amigos**, por estar siempre ahí y hacerme comprender lo que significa la amistad verdadera: Isa, Marián, Merce, Vanesa, María Dolores, Ana, Ángel, Lourdes y Teresa.

Por último, a todos aquellos, que directa o indirectamente, han influido en mi tesis doctoral.

"Caminante no hay camino, se hace camino al andar". Antonio Machado

# Abreviaturas

А	Absorbancia
A <sub>λ</sub>	Absorbancia a la longitud de onda $\lambda$
AA	Ácido ascórbico
AAS	Ácido antranílico sulfonato
AAR	Radical libre ascorbilo
A <sub>max</sub>	Absorbancia máxima a una determinada longitud de onda
$A_{max}^{2}$	Cuadrado de A <sub>max</sub>
AB	Tampón acetato sódico
iACN	Acetonitrilo
AP	Paracetamol
AR	Arbutina
ASG	Acetosiringona
AU	Unidades de absorbancia
4-BrP	4-Bromofenol
В	Disolvente apolar para HPLC, normalmente acetonitrilo
BPA	Bisfenol A
4-CIP	4-Clorofenol
[C] <sub>0</sub>	Concentración inical de colorante
С	Colorante
CA	Ácido cafeico
СВ	Tampón citrato sódico
CGA	Acido clorogénico
CR	Colorante radical
Cys	L-Cisteína
$\delta_{C}$	Desplazamiento químico del carbono C
DAD	Detector de conjunto de diodos
DHA	Ácido deshidroascórbico
DIC	Dihidroíndigo carmín
DMP	2,6-Dimetoxifenol
DMBQ	2,6-Dimetil-1,4-benzoquinona
DMSO	Dimetilsulfóxido
3	Absortividad molar
E	Enzima
EA	Acido elágico
[E] <sub>0</sub>	Concentración inical de enzima

EI	Ionización por impacto electrónico
ESC	Esculetina
γ, δ, θ,φ	Constantes aparentes de biodegradación
4-FP	4-Fluorofenol
FA	Acido ferúlico
GAME	Metil galato
[H <sup>+</sup> ] <sub>0</sub>	Concentración inicial de protones
[X] <sub>0</sub>	Concentración inicial de una especie cualquiera X
[X] <sub>f</sub>	Concentración final de una especie cualquiera X
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HQ	Hidroquinona
HRP	Isoenzima C de peroxidasa de rábano picante
+/	Efecto inductivo o donador de electrones al anillo
	bencénico
-1	Efecto retirador de electrones del anillo benzénico
4-IP	4-lodofenol
IC	Indigo Carmín
IAS	Ácido isático sulfonato
ICR	Indigo Carmín radical
IS	Isatina sulfonato
IR	Espectroscopía infrarroja
<i>k</i> <sub>b</sub>	Constante de descomposición no enzimática
k <sub>E</sub>	Constante de biodegradación enzimática
K	Constante de inhibición
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis
1/ <i>K</i> <sub>m</sub>	Afinidad de catálisis
$K_m^{\chi}$	Constante de Michaelis con respecto a la especie X
$K_{cat}^{X}$	Constante catalítica con respecto a la especie X
k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub>	Eficacia catalítica
λ	Longitud de onda
L-Cys, Cys	L-cisteína
LMS	Sistema lacasa-mediador
LogP	Logaritmo del cociente de reparto de una molécula entre
	las fases inmiscibles octanol/agua
LogD	LogP a un pH determinado
LOD	Límite de detección

Magdalena Parra Carrillo

LOQ	Límite de cuantificación
Μ	Mediador
mAU	Miliunidades de absorbancia
Mr	Masa molecular
MR	Radical del mediador
MSG	Siringato de metilo
MtL	Lacasa de Myceliophthora thermophila
Р	Producto al final del ensayo
PAH	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PB	Tampón fosfato sódico
рС	p-Cresol
Ph	Fenol/ Fenoles
PhR	Radical libre de Ph
PM	Premediador
POD	Polifenol oxidasa
[PTZR] <sub>max</sub>	Concentración máxima de catión radical en estado
	estacionario global
Q	Producto cromofórico
R	Radical libre
RBBR	Remazol Brilliant Blue Royal
RMN	Resonancia magnética nuclear
RP	Producto rojo
S	Sensibilidad
S	Sustrato
SAR	Relación estructura-actividad
SBP	Peroxidasa de soja
SGA	Siringaldehido
SGO	Alcohol siríngico
τ	Periodo de retardo o lag
t	Tiempo
t <sub>50</sub>	Tiempo requerido para una degradación del 50 %
t <sub>E</sub>	Tiempo de reacción enzimática
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención
TBC	4-Tercbutilcatecol
ТВР	4-Tercbutilfenol
TcL	Lacasa de Trametes versicolor

TOL	Tirosol
TvL	Lacasa de Trametes villosa
UE	Unidades enzimáticas
UV/Vis	Espectrofotometría ultravioleta/visible
$V_E^{\times}$	Velocidad enzimática de la especie X
V <sub>max</sub>	Velocidad máxima enzimática en estado estacionario
V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub>	Potencia catalítica
V <sub>SS</sub>	Velocidad en estado estacionario

# Contenido
# SUMMARY

1.0 Introduction: Summary	3
2.0 Objectives	
3.0 Materials and Methods: Summary	
4.0 Biodegradation of the dyes IC and RBBR by POD: Summary	
5.0 Biodegradation of IC by enzyme-mediator systems: Summary	
6.0 Enzymatic biodegradation of RBBR by laccase-mediator systems: Summary	
7.0 Enzymatic bioanalysis of phenols: Summary	
8.0 Conclusions	
9. References	

# CONTENIDO

1.	Introducción		. 1
	1.0 Introduction: Summary		. 3
	1.0.1 Peroxidase		. 3
	1.0.2 Laccase		. 3
	1.0.3 Dyes		. 3
	1.0.4 Phenolic compounds		. 5
	1.1 Peroxidasa	·	10
	1 1 1 Descubrimiento		10
	1 1 2 Clasificación de perovidasas	···· ,	11
	1.1.2 Crasheddion de peroxidasas	,	16
	1.1.3 Caracteristicas estructurales	···· ,	20
	1.1.4 Mecalilismo de reacción de las peroxidasas		20 25
	1.1.5 Peroxidasa de raíz de l'abarlo (RRP)		20
	1.1.6 Peroxidasa de soja (SBP)		32
	1.1.7 Aplicaciones biotecnologicas de peroxidasas	···· \$	33
	1.2 Lacasa		38
	1.2.1 Lacasas fúngicas	(	39
	1.2.2 Características generales de lacasas	4	40
	1.2.3 Estructura de lacasa	4	43
	1.2.4 Propiedades catalíticas de lacasa	4	48
	1.2.5 Aplicaciones biotecnológicas de lacasa	{	52
	1.3 Colorantes	6	60
	1.3.1 Indigo Carmín	6	32
	1.3.2 Remazol Brilliant Blue Royal	(	66
	1.3.3 Métodos de degradación de los colorantes		72
	1.4 Fenoles		76
	1.4.1 Contaminantes fenólicos	-	76
	1 4 2 Fármacos fenólicos	5	85
	1 4 3 Fitoquímicos fenólicos		22
2	<b>Objetivos</b>	10	07
2.	2.0 Objectives		na
	2.0 Djectives	10	00
	2.0.2 Specific objectives	10	00
	2.0.2 Specific Objectives		11
	2.1 Objetivos	I	11
	2.1.1 Objetivos generales		11
~	2.1.2 Objetivos específicos	1	
3.	materiales y metodos	1'	15
	3.0 Materials and Methods: Summary	1	17
	3.0.1 Reagents and materials	1′	17
	3.0.2 Spectrophotometric assays	1′	17
	3.0.3 Liquid chromatography	1′	17
	3.0.4 Enzymatic biodegration of dyes	1′	18
	3.0.5 Enzymatic bioanalysis of phenols	1′	18
	3.0.6 Statistical analysis	1	18
	3.1 Reactivos	1′	18
	3.2 Instrumentación	1′	19
	3.2.1 Ensayos espectrofotométricos de ultravioleta-visible (UV/Vis)	11	19
	3.2.2 Ensayos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	12	21
	3.3 Biodegradación enzimática de colorantes	12	22
	3.3.1 Degradación de IC con peroxidasas	12	23
	3.3.2 Degradación de RBBR con peroxidasas	. 12	23
	3.3.3 Biodegradación de IC con sistemas lacasa/peroxidasa-mediador	. 1:	23
	3 3 4 Biodegradación de RBBR con sistemas lacasa/neroxidasa-mediador	1	24
	3 4 Bioanálisis enzimático de fenoles	12 1'	 24
	3.5 Actividad anzimática de lacasa y perovidasas	14 14	<del>-</del> 2∕/
	2.6 Análisis estadístico	41 م 1	-+ 25
	2.6.1 Dagradán na lindal	4 م اه	20 25
	2.6.2 Pogradián lineal	∡ا م ۸	20 27
	3.0.2 Reyresion Inteal	4 آ	21 27
	3.0.3 Fruedas de significación estadística	Tz	27

4. Biodegradación enzimática por peroxidasas de Indigo Carmín y Remazol	
Brilliant Blue	. 129
4.0 Biodegradation of the dyes IC and RBBR by POD: Summary	. 131
4.1 Ensayos espectrototometricos	. 132
4.2 Ensayos cromatograficos	133
4.3 Influencia del pH	. 140
4.4 Influencia de la concentración inicial de enzima	. 143
4.5 Influencia de la concentración inicial de colorante	. 147
4.6 Influencia de la concentración inicial de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	152
4.7 Optimización de la biodegradación de los colorantes	. 157
5. Diodegradación enzimatica de indigo Carmin por sistemas	159
5 0 Biodegradation of IC by enzyme-mediator systems: Summary	161
5.1 Ensavos espectrofotométricos	162
5.2 Ensavos cromatográficos	162
5.3 Influencia del nH	168
5.4 Análicis cinático	170
5.5 Influencia de la concentración de peróxido de hidrógeno	173
5.6 Influencia de la concentración inicial de enzima	175
5.7 Influencia de la concentración de mediador	176
5.8 Influencia de la concentración inicial de IC	181
5.9 Ontimización de la biodegradación enzimática de IC	184
6 Biodegradación enzimática de Remazol Brilliant Royal Blue por sistemas	104
Lacasa-mediador	. 185
6.0 Enzymatic biodegradation of RBBR by laccase-mediator systems:	
Summary	. 187
6.1 Ensavos espectrofotométricos	. 188
6.2 Ensavos cromatográficos	. 190
6.3 Influencia del pH	. 193
6.4 Análisis cinético	. 195
6.5 Influencia de la concentración inicial de enzima	. 198
6.6 Influencia de la concentración inicial de mediadores	. 200
6.7 Influencia de la concentración inicial de RBBR	. 202
7. Bioanálisis enzimático de fenoles	. 205
7.0 Enzymatic bioanalysis of phenols: Summary	. 207
7.1 Ensayos espectrofotométricos	. 208
7.2 Análisis cinético	. 210
7.3 Efecto de la concentración inicial de enzima	213
7.4 Efecto de la concentración inicial de ácido ascórbico	. 215
7.5 Efecto de la concentración inicial de fenol	. 217
8. Conclusiones	. 221
8.0 Conclusions	. 223
8.0.1 Specific conclusions	. 223
8.0.2 General conclusions	. 226
8.1 Conclusiones	. 228
8.1.1 Conclusiones específicas	. 228
8.1.2 Conclusiones generales	. 231
9. Bibliografía	. 233

1

# Introducción

# 1. INTRODUCCIÓN

# **1.0 INTRODUCTION: SUMMARY**

## 1.0.1 Peroxidase

Peroxidases are heme-containing enzymes playing an important role in large and diverse physiological processes in organisms including humans. They are oxidoreductases commercially produced from some microorganisms and plants. They catalyze a variety of biodegradations, since they remove phenolic compounds and aromatic amines from aqueous solutions, and also decolorize textile effluents. Peroxidases require the presence of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), a cheap and clean oxidant, to activate them. The mechanism of reaction consists on the oxidation by 1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of the enzyme, which in turn oxidizes two molecules of substrate to free radicals. Horseradish and soybean peroxidases are the most studied peroxidases, because are easily obtained and have huge variety of applications such a wastewater treatment, organic synthesis, diagnostics and therapeutics.

#### 1.0.2.Laccase

Laccases are multi-copper proteins that use 1  $O_2$  for oxidation to free radicals of four molecules of various aromatic and non-aromatic substrates. They have high nonspecific oxidation capacity, so they are useful biocatalysts for diverse biotechnological applications. They are found in eukaryotes but also there is evidence for their widespread distribution in prokaryotes. Their uses span from the textile to the pulp industries, and from food applications to bioremediation processes. They have also uses in organic synthesis, where their typical substrates are phenols and amines, and their reaction products are dimers and oligomers derived from the coupling of reactive radical intermediates. Frequently these substrates cannot be oxidized directly by laccases, and it is possible to overcome this limitation with the addition of a mediator, which are suitable compounds that act as intermediate substrates for laccase.

#### 1.0.3 Dyes

The importance of dyes to civilization is evident and well documented.

Approximately, 10000 different dyes and pigments are in industrial use, representing an annual consumption of around  $7x10^5$  tones worldwide. From 10 to 50 % of the initial dye load will be present in the dye batch effluent, giving rise to a highly colored effluent. Many dyes used in the textile industry are designed to resist fading, upon exposure to sweat, light and water. The release of dye effluents into the environment is undesirable, not only because of their visual effect, but also because many dyes are made from known carcinogens, and their breakdown products are toxic and/or mutagenic to life. In recent years, synthetic dyes have found use in a wide range of industries, but are of primary importance to textile manufacturing.

There are various classes of dyes, like azo, anthraquinone, reactive, acidic, basic, neutral, disperse and direct dyes, but the most commonly used are azo and anthraquinone dyes.

#### 1.0.3.1 Indigo Carmine

In last years, the production of denim clothes has been increased in most countries. Indigo carmine (IC)(3,3-dioxo-2,2-bis-indolyden-5,5-disulfonic acid disodium salt) or acid blue 74, is the deep blue dye traditionally used in the production of denim. First used over 4000 years ago for dyeing wool, indigo was originally produced from the leaves of the *Indigofera tinctoria* plant. Both China and India, the natural home of the plant, first cultivated and processed the dye commercially. Indigo is the most popular dyestuff, with more than nine thousand tons produced annually. Nowadays, nearly all Indigo Carmine produced is synthetic, treating Indigo with sulphuric acid.

Apart from its use as textile coloring agent, as additive in pharmaceutical tablets and capsules, as well as in confectionery items, IC is also used for medical diagnostic purposes.

IC is considered to be a highly toxic dye and may cause nausea, vomiting, high blood pressure, skin rashes, breathing problems or allergic reactions. Moreover, it is toxic to flora, fauna and has carcinogenic effects. Therefore, decolorization of IC from wastewater is necessary.

#### 1.0.3.2 Remazol Brilliant Blue Royal

RBBR (3-(4-Amino-9,10-dihydro-3-sulpho-9,10-dioxoanthracen-4-yl) aminobenzenesulphonyl)vinyl disodium sulphate is a typical anthraquinone dye. Anthraquinone-based dyes are persistent due to their fused aromatic structures, and thus remain colored for a longer time in the wastewater. Reactive dyes are typically azo-based chromophores combined with different types of reactive groups, and RBBR is also known as Reactive Blue 19 dye, because it is an anthraquinone-based vinylsulphone dye.

It is used in dyeing of cellulosic fibers (the alkyl sulphonate group is the responsible for the binding with cellulosic fibers, under alkaline conditions) and it is frequently used as a starting material in the production of polymeric dyes.

It is known that the half-life of hydrolyzed RBBR is about 46 years, at pH 7 and 25 °C. Thus, the degradation of this dye is necessary because it is also toxic.

# **1.0.4 Phenolic compounds**

Phenols may occur in the aquatic environment as a result of their widespread use in numerous commercial products such as pesticides, wood preservatives, dyes and synthetic intermediates. Phenols are also widely used in the chemical industry. Thus, they are among the top 50 chemicals produced. Determination of phenols in the aquatic environment is important, due to their toxicity even below mg/l levels. Phenols can be the source of serious health hazards, because they can be absorbed into the human body, whether dermally, orally or via the airways. Prolonged oral or subcutaneous exposure causes damage to the lungs, liver, kidneys and genitourinary tract. Therefore, it is necessary to develop reliable, sensitive and simple methods for the determination of these compounds in environmental samples.

#### 1.0.4.1 Phenolic pollutants

#### 1.0.4.1 Phenol

Phenol is the simplest molecule of all the phenols, is an aromatic organic compound with the molecular formula  $C_6H_5OH$ . The major uses of phenol, consuming two thirds of its production, involve its conversion to precursors to plastics. Phenol is also a versatile precursor to a large collection of drugs, most notably aspirin but also many pharmaceutical drugs and herbicides. The substance may cause harmful effects on the central nervous system and heart, resulting in dysrhythmia, seizures and coma. The kidneys may be affected as well. Long-term or repeated exposure of the substance may have harmful effects on the liver and kidneys.

#### 1.0.4.1.2 Bisphenol A

Bisphenol-A (BPA), organic compound used as stabilizing material or

antioxidant for numerous types of plastics, has been discharged directly or indirectly into de environment, contaminating the atmosphere, water and soil. BPA is also leached from lacquer-coated cans and baby feeding bottles, due to hydrolysis of the polycarbonates during thermal treatment. BPA is slightly toxic and has a low potential for bioaccumulation in aquatic organisms. It has been demonstrated to exhibit estrogenic activity, and it is classified as an endocrine disruptor in many countries. Thus, it is very important to monitor BPA in drinking water or beverage samples.

#### 1.0.4.1.3 p-Cresol

It is a small phenolic compound that is widely used as an intermediate in the production of other chemicals. It is a derivative of phenol, an isomer of *o*-cresol and *m*-cresol. It has been proved to be an uremic toxin.

#### 1.0.4.1.4 p-Halophenols

Chlorophenols (CPs) are important pollutants, that extensively exist in environmental waters and soils. The main sources of CPs are effluent discharges of industries, such as paper and pesticide factories. Because of their high toxicity and potential carcinogenicity, most of them are listed on the priority pollutant list of the US Environmental Protection Agency (US-EPA). In 1982, European Union issued another pollutant list that included many polychlorophenols, and established their maximum allowable concentration in drinking waters ( $0.5 \mu g/L$ ).

lodination of phenol results in the formation of several byproducts like 4iodophenol. lodine is an essential nutrient for production of the body's thyroid hormones, and therefore is required for normal thyroid function. Supplemental iodine may be helpful in correcting hypothyroidism and goiter caused by deficient iodine intake. But the formation of iodophenols could potentially affect the normal functioning of the thyroid gland in humans, due to their chemical structure with the thyroid hormones. Therefore, determination of iodophenol in water is important to evaluate the toxicological risk for humans.

On the other hand, it has been proved that 4-bromophenol has estrogen-like activity. Therefore, it must be controlled its possible release in effluents from chemical industries where it is used in the synthesis of other compounds.

#### 1.0.4.2 Phenolic drugs

Medicaments with phenolic ingredients are safe at recommended doses, but

larger ingestions can make it toxic, making its determination in pharmaceutical compounds very important. Several techniques have been used for the determination of them such as electrochemical, liquid chromatography, electrophoresis, chemiluminescence and the one selected in our research, spectrophometric method.

#### 1.0.4.2.1 Paracetamol

Acetaminophen (paracetamol) is a commonly used antipyretic and analgesic agent. This substance is commonly used for relieving pain associated with headache, backache, arthritis and postoperative pain, and it is used universally for reducing fevers of bacterial or viral origin. It is also used for patients who are sensitive to aspirin. It has been reported as a useful drug in osteoarthritis therapy as well. Therefore, overdoses of paracetamol lead to hepatic toxicity, in some cases associated with liver and kidney damage, and even death. Thus, determination of paracetamol is an important aspect of quality control in pharmaceutical formulations, and its determination in biological fluids (urine, blood or blood plasma) is important for medical field.

#### 1.0.4.2.2 Hydroquinone

Also known as 1,4-dihydroxybenzene, is a phenolic reducing agent which is widely used in medicines, cosmetic products and antioxidant among other uses. In medicine it is used as a topical application in skin whitening to reduce the color of skin. It is hazardous to human health and has low level of degradability in the environment.

#### 1.0.4.2.3 Alkyl phenols: 4-tert-butylcatechol and 4-tert-butylphenol

Both molecules have estrogenic and carcinogenic effects. They have been extensively used in cosmetics to treat some skin problems, but now it is know that can cause more skin problems if they are overtaken.

#### 1.0.4.2.4 Arbutin

Medicinal plants are rich in arbutin, which is used in cosmetic products to treat depigmentation and as a sunscreen factor. But the concentration must be regulated, because an overdose can produce more skin problems. Recently, it has been proved that also has anti-inflammatory effects.

# 1.0.4.3 Phenolic phytochemicals

Phytochemicals are chemical compounds that occur naturally in plants. Some are responsible for color and other organoleptic properties, such as the deep purple of

blueberries and the smell of garlic. The term is generally used to refer to those chemicals that may have biological significance, for example antioxidants, but are not established as essential nutrients. Scientists estimated that there may be as many as 10,000 different phytochemicals, having the potential to affect diseases such as cancer, stroke or metabolic syndrome. They are also used in industrial applications, for example, as natural colorants and preservatives for foods, and applied in the production of paints, paper and cosmetics. Among all the phytochemicals, the phenolic group is one of the most important ones due to their antioxidant properties.

#### 1.0.4.3.1 Chlorogenic Acid

Chlorogenic acid is a natural phenolic product metabolized by plants, and known as a defense compound against microorganisms. For example, the coffee plant is a source of this compound. Experimental studies have shown the positive effects of regular coffee drinking on various aspects of health, such as neurological conditions, metabolic disorders and liver functions among others. However, chlorogenic acid can cause acid reflux symptoms, and doctors tend to recommend patients with reflux to limit their coffee intake. Approximately, 30-50 % of this acid is degraded by roasting, and it is easily hydrolyzed into caffeic and quinic acid, the responsible compounds for the astringent and bitter flavors of the coffee. Therefore, determination of chlorogenic acid is an important aspect in quality control of the production of coffee.

#### 1.0.4.3.2 Caffeic Acid

Caffeic acid is an organic compound that is classified as hydroxycinnamic acid. It is a yellow solid consisting of both phenolic and acid functional groups. It is found in all plants because it is a key intermediate in the biosynthesis of lignin, one of the principal sources of biomass.

Caffeic acid has a variety of potential pharmacological effects, reported from *in vitro* studies and in animal models, such as its inhibitory effect on cancer cell proliferation. It is also an antioxidant *in vitro* and *in vivo*. Caffeic acid also shows immunomodulatory and anti-inflammatory activity. Thus, it is important to determinate the quantity of this compound, recovered from plants in order to be taken (from coffee, Chinese medicines, blueberries, Herba lycopi, wines etc).

#### 1.0.4.3.3 Ferulic Acid

Ferulic acid is one of the major phenolic compounds in rice bran oil, and has strong *in vitro* antioxidant activities. It is also found in others cereals such as wheat and oats, and in coffee beans, apples, artichoke, peanuts, oranges and pineapples. It has hypolipidemic properties and could be effective in lowering risk of high fat diet induced obesity. Also reduces serum cholesterol levels, protects against liver injury and is a potent inhibitor of tumor promotion, at least *in vitro*.

#### 1.0.4.3.4 Ellagic Acid

This phenolic compound is widely distributed in the plants, and it is often present in the diet of the ruminants, so it can be used in ruminant nutritional studies. It is also present in the pomegranates, for example, thus the determination is important for juices and rinds extraction.

#### 1.0.4.3.5 Esculetin

Esculetin is a derivative of coumarin. It is a natural lactone that derives from the intramolecular cyclization of a cinnamic acid derivative. It is present in chicory and in many toxic and medicinal plants, in form of glycosides and caffeic acid conjugates. Esculetin-containing preparations used systemically can have an anticoagulant effect. This compound is used in some sunscreens, but there is evidence that it acts as a photosensitizer for DNA damage. The sodium salt of its methyl-derivative is used in dermatology for the treatment of varicose veins.

#### 1.0.4.3.6 Tyrosol

Tyrosol is a phenylethanoid, a derivative of phenethyl alcohol. It is a natural phenolic antioxidant present in a variety of natural sources. The principal source in the human diet is olive oil. It is also one of the main natural phenol in argan oil. Tyrosol present in white wine is also shown to be cardioprotective. It is suggested that tyrosol induces myocardial protection against ischemia related stress, by inducing survival and longevity proteins that may be considered as anti-aging therapy for the heart. Therefore, determination for quality control should be done.

#### 1.0.4.3.7 Methyl Gallate

Methyl gallate is a phenolic compound found in *Terminalia myriocarpa* and *Geranium niveum*. It is also found in wine. It is the methyl ester of gallic acid, and has potential antioxidant activity for nutraceutical and cosmeceutical products.

#### 1.1PEROXIDASAS

#### 1.1.1. Descubrimiento

Planche, en 1810, descubrió de forma indirecta la capacidad de ciertas proteínas, para reaccionar con el peróxido de hidrógeno y generar compuestos oxidados, observando cómo un tinte alcohólico de resina de guayacán se volvía azul, cuando se mezclaba con varios tipos de extractos de plantas, incluyendo un extracto de raíz de rábano (Fruton, 1972). Fue Linossier en 1898 quién llamó peroxidasas (PODs) a las proteínas que presentaban esa propiedad. Diversos estudios realizados hasta 1918 encontraron actividad peroxidasa en numerosas plantas. Fue durante 1918-1931 cuando se consiguió purificar la enzima. Su actividad se determinaba valorando la oxidación de pirogalol a purpurogalina. En 1931 se demostró que era una hematina, y desde 1957 se investiga la gran multiplicidad isoenzimática de las peroxidasas (Saunders, 1964).

Estas enzimas (donador:  $H_2O_2$  oxidorreductasa; EC 1.11.1.7) están ampliamente distribuidas en los distintos reinos animal y vegetal, y presentan una actividad catalítica en la que suelen formar compuestos coloreados. Son las enzimas más estudiadas desde los comienzos de la enzimología. Las peroxidasas son hemoenzimas que catalizan la siguiente reacción global:

 $2 \text{ AH}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2 \text{ AH} + 2 \text{H}_2\text{O}$ 

En este proceso intervienen dos sustratos, un oxidante ( $H_2O_2$ ) y un reductor (AH<sub>2</sub>)(Chance, 1949). Las peroxidasas desempeñan una importante función en las células, eliminan el  $H_2O_2$  generado por otros sistemas enzimáticos, reduciéndolo hasta agua, y oxidan sustratos reductores formando radicales libres que evolucionarán de distinta manera, dando en ocasiones lugar a reacciones de polimerización, como es el caso de las paredes de las células vegetales.

Las peroxidasas se encuentran ampliamente distribuidas, aparecen en plantas, animales, hongos y en organismos procariotas (Asada, 1992). Se considera que su función principal es proporcionar una defensa esencial, ante las especies activadas del oxígeno, que se ven incrementadas en los procesos metabólicos.

## 1.1.2. Clasificación de Peroxidasas

La clasificación de las peroxidasas gracias a técnicas de ADN recombinante, cristalografía de rayos X y Resonancia Magnética Nuclear (RMN), se puede hacer en dos grandes grupos, de los que se tiene información estructural detallada(Welinder y Gajhede, 1993): Superfamilia de peroxidasas de animales, y superfamilia de peroxidasas microbianas y de plantas.

#### 1.1.2.1. Peroxidasas de animales

Desempeñan funciones antimicrobianas, bactericidas, citotóxicas de parásitos, tumoricidas, de síntesis de hormonas, etc. Oxidan sustratos de alto potencial como pseudohaluros, esto las diferencia de enzimas tales como citocromo c peroxidasa de levadura o peroxidasa de raíz de rábano (HRP). El potencial oxidativo de las enzimas de mamíferos, está relacionado con el hecho de que presentan un grupo hemina o hematina modificado, unido covalentemente a la proteína. Como ejemplos están:

- Peroxidasa de tiroides: desempeña un papel fundamental en la función de la glándula tiroidea. Interviene en la biosíntesis de la hormona tiroidea, mediante la incorporación de yodo a los anillos aromáticos de la tiroxina, que se transforma en tiroglobulina, utilizando  $H_2O_2$  como sustrato oxidante (Dupuy et al., 2000). Se diferencia de las otras peroxidasas en que es una proteína unida a la membrana intracelular.

- Lactoperoxidasa: desempeña un papel bacteriostático (Atasever et al., 2013; Zeldow, 1963). Cataliza la oxidación de un gran número de sustratos orgánicos e inorgánicos por  $H_2O_2$ . Es por eso un componente del sistema de defensa de los mamíferos (Dunford, 2010), se encuentra en la saliva, las lágrimas y en la leche.

- **Mieloperoxidasa:** desempeña una actividad bactericida, y está presente en los neutrófilos (Rosen et al., 2009). El proceso de ingestión de un organismo extraño en un neutrófilo, ocurre cuando éste es estimulado, y se consume oxígeno en exceso. Los gránulos que poseen mieloperoxidasa son liberados en las vacuolas, y comienza la actividad bactericida liberando ácido hipocloroso. El oxígeno es convertido en superóxido por la enzima NADPH oxidasa, y el superóxido dismuta espontáneamente en oxígeno y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno forma compuesto I de mieloperoxidasa, el cual reacciona con ion cloruro (Cl<sup>-</sup>) para generar ácido hipocloroso (HOCI). Se ha encontrado que una dosis de 75 μM de ácido hipocloroso, lisa las células de los microorganismos.

- Eosinofiloperoxidasa: es la peroxidasa de mamífero menos estudiada, y la mayor proteína en los eosinófilos. Junto con mieloperoxidasa, ésta EOP es abundante en leucocitos, encargados de mecanismos de defensa y de respuesta inmune. Estas enzimas son secretadas por fagocitos activados. Los eosinófilos se acumulan en sitios de infección helmíntica, en ciertos tumores y en lugares de reacciones de hipersensibilidad (Walsh et al., 2011). EOP secretada, utiliza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para catalizar la oxidación de haluros, principalmente bromuro (Br<sup>-</sup>) y forma potentes intermedios halogenados, con actividad microbicida y viricida. Esta enzima también está implicada en promover lesiones tisulares ,en condiciones de asma y desordenes alérgicos inflamatorios (Klebanoff y Coombs, 1996).

- Glutation peroxidasa: es muy importante en las células de los mamíferos, ya que está implicada en eliminar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y también en el metabolismo de peróxidos de lípidos (Maddipati y Marnett, 1987). Esta enzima tiene la peculiaridad de poseer un átomo de selenio (Se), unido covalentemente en forma de selenocisteína en su sitio activo.

#### 1.1.2.2. Peroxidasas microbianas y de plantas

Se encuentran fácilmente en la mayoría de los órganos y células vegetales, principalmente en la pared celular, en las vacuolas, en el retículo endoplásmico, en cisternas y vesículas del aparato de Golgi, mitocondrias, cloroplastos y citoplasma. Se las asocia con procesos fisiológicos como abscisión de flores y hojas, envejecimiento y senescencia, dominancia apical, tolerancia al frío, letargo, maduración y desarrollo del fruto, desarrollo precoz y germinación, reacción y resistencia al parasitismo. Actúan como primera línea defensiva de la planta en condiciones adversas como la exposición al ozono (Castillo y Greppin, 1986; Castillo et al., 1987; Castillo et al., 1984), contaminación (Castillo et al., 1987; Heath, 1980), radiación (Frylinck et al., 1987); desorden nutricional (Leidi et al., 1987); infecciones (Parent et al., 1985) y salinidad (Chang et al., 2012). También se les atribuye a estas peroxidasas algún papel en la síntesis de lignina, en el catabolismo de auxinas y en la biosíntesis de etileno, importantes hormonas vegetales (Campa, 1991). Las peroxidasas lignolíticas y otras peroxidasas fúngicas, están estructuralmente relacionadas con las peroxidasas intracelulares de procedencia procariota, y las peroxidasas de secreción de plantas. Estas tres clases de peroxidasas forman la superfamilia de peroxidasas de bacterianas, fúngicas y de plantas (Welinder, 1992). Las peroxidasas de la superfamilia se caracterizan porque contienen un grupo hemina tipo b que, en estado de reposo, presenta un hierro férrico en estado de oxidación +3 (Figura 1.1). El hierro

se encuentra coordinado por los cuatro nitrógenos pirrólicos del anillo porfirínico de hemina y el nitrógeno  $\epsilon$  del anillo imidazólico de una histidina axial, denominada histidina proximal, presente en todas las peroxidasas de la superfamilia. En estado de reposo, la sexta posición de coordinación está libre (aunque en ocasiones se observa una molécula de agua en esta posición), lo que determina el estado de alto spin del hierro (Banci, 1997). La cloroperoxidasa del hongo Caldariomyces fumago es estructuralmente diferente y se sitúa en el grupo de las hemotiolatoproteínas junto a la óxido nítrico sintasa y el citocromo P450.





# Fe<sup>+3</sup>Protoporfirina IX

#### FIGURA 1.1

Estructura del grupo hemo de las peroxidasas. (A). Hemina de tipo b con el átomo de hierro unido a los cuatro nitrógenos pirrólicos. (B). Estado de reposo del hierro, con el N $\varepsilon$  del anillo imidazólico de la histidina proximal actuando como quinto ligando.

Todas las peroxidasas de las diferentes familias se caracterizan por romper la unión O-O del peróxido, aunque todas son muy diferentes en cuanto a sus sitios catalíticos y los pliegues de la proteína. Las hemoproteínas de plantas, hongos y levaduras son homólogas, siendo las de animales muy diferentes y constituyen una superfamilia separada. Basándose en el extenso estudio comparativo de las secuencias de aminoácidos, en la superfamilia de peroxidasas bacterianas, fúngicas y de plantas, se ha propuesto que estas enzimas están relacionadas evolutivamente, lo

que se refleja en un plegamiento común incluso en los casos en los que la identidad de secuencia es baja (Welinder y Gajhede, 1993). Esta superfamilia se puede dividir en tres clases bien diferenciadas (Welinder, 1992).

#### -. Clase I: línea procariota.

Las proteínas de esta clase no contienen puentes de cisteína, ni carbohidratos, ni iones Ca<sup>+2</sup> en su estructura (Welinder, 1992). Se localizan a nivel subcelular, son peroxidasas intracelulares, encontrándose en el citoplasma celular y en los orgánulos. Las más representativas de este grupo son:

-. Catalasas-peroxidasas: Presentan una pequeña secuencia homóloga con las catalasas típicas, pero alta homología con citocromo c peroxidasa de levadura y con ascorbato peroxidasa. Se encuentran en bacterias como *Escherichia coli* (ECP) *y Klebsiella pneumoniae*, presentan las dos actividades catalásica y peroxidásica. El estrés oxidativo induce su síntesis (Hochman et al., 1992).

-. Ascorbato peroxidasa (APX): Es una enzima específica de plantas y algas eucarióticas y de algunas cianobacterias (Miyake et al., 2006), es una enzima desintoxicadora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta enzima es indispensable para proteger a los cloroplastos y estructuras celulares del daño producido por el peróxido, evitando la producción de los radicales hidroxilo generados a partir de él. Cataliza la reducción de peróxido a agua, utilizando ascorbato como donador de electrones (Ross et al., 1999). La actividad peroxidasa dependiente de ascorbato, se describió inicialmente en las membranas de los tilacoides de los cloroplastos(Groden y Beck, 1979; Jones et al., 1998). Actualmente hay indicio de su localización en mitocondrias y peroxisomas (Jimenez et al., 1998). La purificada del citosol de guisante, presenta una especificidad de sustrato más amplia, que incluye fenoles (Mittler y Zilinskas, 1991). La ECP y la APX, comparten una identidad de secuencia con la CcP de aproximadamente un 40%. Estas peroxidasas comparten un mismo plegamiento terciario con las peroxidasas de clase II y III, aunque difieren en aspectos del mantenimiento de dicha estructura. Además, no poseen una secuencia señal que dirija su secreción, a través del retículo endoplasmático.

-. Citocromo *c* peroxidasa (C*c*P): fue descubierta en levaduras de cerveza, Saccharomyces cerevisiae y de corazón de caballo (Erecinsk.M et al., 1973). Presenta un grupo hemina unido a una única cadena polipeptídica, el ligando proximal en la quinta posición de coordinación del hierro, es el anillo imidazol de una histidina 175. Se localiza en la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Daum et al., 1982). Parece que su biosíntesis está unida al metabolismo aeróbico de las levaduras, aunque no se sabe si la única función de la enzima es destruir el  $H_2O_2$ , durante la respiración mitocondrial. C*c*P cataliza la oxidación de ferrocitocromo *c* (Cc(II)) a ferricitocromo *c* (Cc(III)) por  $H_2O_2$ . C*c*p transfiere dos electrones al  $H_2O_2$  para dar un intermedio enzima-peróxido, que acepta dos electrones de dos moléculas de ferrocitocromo. La activación de  $H_2O_2$  es la etapa que caracteriza a la enzima como una peroxidasa. La C*c*P ha sido modelo estructural y mecanístico de las peroxidasas de esta superfamilia durante años, a pesar de que comparte menos de un 20% de identidad de secuencia, con las peroxidasas de secreción fúngicas y de plantas. Además, esta enzima es única en cuanto a que oxida moléculas, que no son los sustratos habituales de las demás peroxidasas.

#### -. Clase II: peroxidasas de hongos.

Esta clase engloba a las peroxidasas extracelulares producidas por los hongos lignolíticos, como la lignin peroxidasa (LiP), la manganeso peroxidasa (MnP) o la peroxidasa versátil de *Pleurotus eryngii* (VP) (Hatakka, 1994; Ruiz-Duenas et al., 2001). Estas tres familias, que comparten una identidad de secuencia en torno al 50%, presentan una amplia especificidad de sustrato (a excepción de la MnP), y se considera están implicadas en la degradación del polímero de lignina. También incluye las peroxidasas de *Coprinus cinereus* (CIP) (Morita et al., 1988) y *Arthromyces ramosus* (ARP) (Limongi et al., 1995). CIP y ARP comparten el 99% de su secuencia de aminoácidos, por lo que se consideran como una misma enzima con el nombre ARP-CIP. La ARP-CIP es secretada y presenta actividad frente a los sustratos típicos de las peroxidasas de secreción de plantas, pero es incapaz de degradar la lignina u oxidar el Mn<sup>2+</sup>. La comparación de secuencias de aminoácidos, sitúa a la ARP-CIP en un grupo no relacionado con las peroxidasas ligninolíticas, que representa una familia diferente en esta clase (Martinez, 2002).

Las peroxidasas fúngicas presentan un péptido señal en el extremo N-terminal, y 40-60 residuos más que otros miembros de la superfamilia, en el extremo C-terminal de las proteínas maduras. Tienen cuatro puentes disulfuro, cinco en el caso de la MnP de *P. chrysosporium* (Sundaramoorthy et al., 2010), que confieren rigidez a la estructura, y dos iones calcio imprescindibles para el mantenimiento de la misma. Estas enzimas están glicosiladas, con un contenido medio de carbohidratos del 5%.

#### -. Clase III: peroxidasas de secreción de plantas.

En esta clase se agrupan las familias clásicas de peroxidasas de secreción de plantas, con funciones fisiológicas muy variadas y específicas del tejido en que se producen. Participan, por ejemplo, en la lignificación de la pared celular, o en el catabolismo de diversas hormonas producidas por las plantas. Aproximadamente el 55%, son la peroxidasa de rábano (HRP), la de tabaco (TOP), la de trigo (WP), la de cebada (BP) y la de tomate (TMP). La isoenzima C de la HRP es una de las peroxidasas más estudiadas. Al igual que las peroxidasas de clase II, se trata de proteínas monoméricas, la mayoría altamente glicosiladas, con cuatro puentes disulfuro y dos iones calcio estructurales conservados.

#### 1.1.3. Características estructurales

La mayor parte del conocimiento estructural de las proteínas, y consecuentemente de las relaciones estructura-función, proviene de la determinación de su estructura cristalina por rayos X, de los estudios mediante espectroscopia RMN de las proteínas en disolución (especialmente en el caso de especies de baja masa molecular, o que contienen átomos paramagnéticos), y las técnicas de mutagénesis dirigida. Gracias a estas técnicas, actualmente se dispone de una gran cantidad de información estructural acerca de las peroxidasas.

La primera peroxidasa en ser cristalizada fue la CcP de S. Cerevisiae (Poulos y Kraut, 1980), publicándose su estructura más refinada a alta resolución en 1984 (Finzel et al., 1984). Este hecho, junto con el desarrollo de un sistema de expresión y purificación de la enzima recombinante (Wang et al., 1990), convirtieron a la CcP en el modelo para los estudios estructura-función de las peroxidasas durante más de una década. No fue hasta 1993 cuando se publicó la resolución de la estructura de una segunda peroxidasa, de la superfamilia de peroxidasas microbianas y de plantas, la LiP de P. chrysosporium (isoenzima H8) (Poulos et al., 1993; Ruiz-Duenas et al., 2007). A ella le siguieron estructuras de otras peroxidasas pertenecientes a la clase II, como la ARP-CIP nativa y recombinante (Petersen et al., 1993) ; la MnP y LiPH2 de P. chrysosporium (Sundaramoorthy et al., 1994), y a la clase I, como la APX citosólica recombinante de guisante (Poulos et al., 1995). La primera estructura cristalográfica de una peroxidasa de clase III, la peroxidasa de cacahuete, no se obtuvo hasta 1996 (Schuller et al., 1996). Un año después se publicaba la resolución de la estructura de la HRP recombinante (Gajhede et al., 1997). También se han publicado modelos moleculares realizados por homología, de algunas de estas enzimas antes de ser

cristalizadas, como la HRP (Zhao et al., 1996), la LiP (Du et al., 1992) o la MnP (Johnson, 1994).

A pesar de ser proteínas demasiado grandes (30-40 Kda), como para obtener una resolución completa de su estructura en disolución, la espectroscopia de <sup>1</sup>H RMN ha resultado ser una técnica valiosa para la caracterización del sitio activo de numerosas peroxidasas, como la CcP (Satterlee et al., 1987) o la HRP (Thanabal et al., 1987), y posteriormente la LiP (Deropp et al., 1991) y la MnP (Banci et al., 1992) de *P. chrysosporium*, y la ARP-CIP (Veitch et al., 1994). Esto se debe al carácter paramagnético de estas proteínas. En los espectros de <sup>1</sup>H RMN, los protones cercanos al hierro del grupo hemina experimentan amplios desplazamientos hiperfinos, obteniéndose de esta forma información local acerca de este grupo y de los residuos que lo rodean. Sin embargo, el estado de alto spin del Fe<sup>3+</sup> da lugar a señales anchas, que dificultan una resolución adecuada. Por el contrario, los complejos de estas peroxidasas con cianuro, aunque son biológicamente inactivos, contienen Fe<sup>3+</sup> en estado de bajo spin ,con tiempos de relajación electrónica rápidos que proporcionan señales más finas, y han sido ampliamente caracterizados por espectroscopía de <sup>1</sup>H RMN (Satterlee et al., 1983).

#### 1.1.3.1. Descripción general de la estructura

Los miembros de la superfamilia de peroxidasas microbianas y de plantas son proteínas globulares, formadas por 10-12 hélices predominantemente  $\alpha$ , y 4-5 regiones  $\beta$  de corta longitud, repartidas en dos dominios bien diferenciados. El grupo hemo se encuentra protegido en la cavidad central, delimitada por los dos dominios. A pesar de que la identidad de secuencia dentro de la superfamilia es inferior al 20%, el plegamiento global y la estructura secundaria están altamente conservados tal como se ha mencionado anteriormente (Li y Poulos, 1994; Welinder y Gajhede, 1993). Un ejemplo representativo (Figura 1.2) es la estructura esquemática de la isoenzima C de la HRP (Gajhede et al., 1997). El dominio I (dominio distal) está formado por el extremo N-terminal y las hélices A-D'. Esta última (D') está ausente en las peroxidasas de clase I y II, que por el contrario presenta una hélice adicional entre la B y la C, generalmente denominada B'. El dominio II (dominio proximal) contiene las hélices E-I, y está conectado con el dominio I a través de un lazo de gran longitud entre las hélices D' y E. La hélice F' es también característica de las peroxidasas de clase III, estando ausente en las de clase I y II. Finalmente, la hélice J comienza en el dominio II y se proyecta hacia el dominio I, donde está situado el extremo C-terminal.



#### FIGURA 1.2

Estructura tridimensional de HRP refinada a 2,15 Å de resolución. Modelo esquemático en el que se muestran las estructuras en  $\alpha$  hélice, repartidas en los dominios proximal y distal a ambos lados del plano del grupo hemina.

Existen, sin embargo, tres características estructurales importantes que diferencian a las peroxidasas de clase I de las de clase II y III. Las primeras no están glicosiladas, y no contienen puentes disulfuro ni sitios de unión a calcio en su estructura. Por el contrario, las peroxidasas de secreción fúngicas y de plantas presentan 4-5 puentes disulfuro, que proporcionan un alto grado de rigidez a la estructura. Estas dos clases contienen además un sitio de unión de calcio en cada dominio, ambos altamente conservados (Banci, 1997).

Estos iones calcio resultan esenciales para el mantenimiento de la estructura (Welinder, 1992). Su eliminación en la HRP y en la peroxidasa de cacahuete, dio como resultado una reducción en la actividad del 40%-50% (Shiro et al., 1986), mientras que en la MnP y la LiP (George et al., 1999) de *P. chrysosporium*, produjo la inactivación total de las enzimas.

#### 1.1.3.2. Estructura-Función de peroxidasas

Las características estructurales de las peroxidasas deben determinar de alguna manera su especificidad, hacia los distintos sustratos que son capaces de oxidar. Teniendo en cuenta el grado de conservación del plegamiento terciario, en la superfamilia de peroxidasas microbianas y de plantas, parece probable que la especificidad de sustrato esté modulada por diferencias en un pequeño número de aminoácidos, situados cerca de la superficie o en las proximidades del hemo, sin que haya una modificación sustancial de la topografía global (Poulos et al., 1995). La comprensión de cómo pequeñas diferencias entre moléculas altamente relacionadas, conduce a cambios drásticos de comportamiento, implica descifrar en detalle a escala molecular, la estructura y la función de cada tipo de molécula, así como la relación que existe entre ambas. Además de los datos estructurales aportados por los estudios de difracción de rayos X y RMN, la disponibilidad de las secuencias génicas y el desarrollo de sistemas de expresión eficaces, están proporcionando una base fundamental para los estudios estructura-función de las peroxidasas, mediante mutagénesis dirigida. Estos estudios son importantes para una mejor comprensión de sus propiedades y características distintivas, así como para diseñar variantes con mayor actividad catalítica y/o estabilidad, que puedan destinarse a distintas aplicaciones biotecnológicas.

#### 1.1.3.3. Isoenzimas de peroxidasas de plantas

Las tres clases de enzimas de la superfamilia de las plantas, presentan un acusado polimorfismo dentro de cada clase. En la planta *Arabidopsis thaliana* de la familia de las *Brasicaceae* se han detectado cerca de 40 isoperoxidasas (Ostergaard et al., 1996). Estas isoenzimas difieren en su comportamiento catalítico y electroforético. Parte de este polimorfismo se debe a modificaciones post-traduccionales de peroxidasas, en distintas partes de la planta (Tyson et al., 1985).

Existe discusión en cuanto a la actuación de las peroxidasas en correlación con la localización celular, especificidad de tejido y posible función de las diferentes isoperoxidasas. Diferentes isoperoxidasas tienen distinta especificidad de sustrato, estabilidad al calor, y distribución en los compartimentos celulares, en los cuales pueden catalizar distintas reacciones especializadas y participar en procesos de desarrollo específicos. A nivel celular se les atribuye a las isoenzimas aniónicas, la principal contribución de la actividad peroxidasa en la biosíntesis de la pared celular (Schloss et al., 1987), mientras que las enzimas catiónicas tienen poca afinidad por

precursores de lignina (Bolwell, 1988; Mader et al., 1980) ,localizándose en las vacuolas y en los espacios extracelulares, implicándose en el catabolismo de auxinas (Boyer et al., 1983; Hazell y Murray, 1982).

#### 1.1.4-Mecanismo de reacción de peroxidasas

El mecanismo de reacción llamado peroxidación, consiste en la oxidación divalente del grupo prostético de la enzima por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seguida de sucesivas reducciones unielectrónicas llevadas a cabo por sustratos donadores de electrones (Chance, 1952). Durante el ciclo de reacción de la enzima, se pueden distinguir dos intermedios catalíticos, que poseen diferentes espectros de absorción UV/Visible. Las peroxidasas (PODs) reaccionan primeramente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para formar un intermedio de color verde llamado Compuesto I (Chance, 1952; Keilin et al., 1951). Este compuesto se convierte en enzima nativa, a través de un intermedio de color rojo llamado Compuesto II (Chance, 1949, 1952; George, 1949). Ambas son etapas de reducción unielectrónica, que siguen el siguiente esquema:

$$POD + H_2O_2 \xrightarrow{K_a} POD - I + H_2O$$
$$POD - I + S \xrightarrow{K_b} POD - II + R$$
$$POD - II + S \xrightarrow{K_c} POD + R + H_2O$$

Donde PODs corresponde a la enzima en su estado nativo, con grado de oxidación (+3). S y R corresponden al sustrato donador de electrones, en su estado reducido y oxidado respectivamente. Las especies intermedias activas de la enzima son POD-I (Compuesto I) con grado de oxidación (+5), y POD-II (Compuesto II) con grado de oxidación (+4)(Chance, 1952; George, 1953). En la Figura 1.3 se muestra el ciclo catalítico de la enzima, y parte de la estructura del sitio activo correspondiente a cada una de las especies enzimáticas. Compuesto I tiene dos equivalentes de oxidación más que la enzima nativa, y debería contener por ello Fe (V), Compuesto II sufre una reducción unielectrónica desde el Compuesto I y debería tener Fe (IV).

Existe otra forma de peroxidasa, denominada Compuesto III u oxiperoxidasa, que contiene tres equivalentes de oxidación más que ferriperoxidasa (Dunford y Stillman, 1976), y no participa en el ciclo de peroxidación de la enzima. Este Compuesto III se puede obtener por varias reacciones: -.Reacción del Compuesto II con exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Chance, 1952).

-.Durante la oxidación aeróbica de NADH (Yokota y Yamazaki, 1977).

-.Reacción de ferriperoxidasa con anión superóxido (Yamazaki y Piette, 1963).

-.Reducción de ferriperoxidasa a ferroperoxidasa y fijación por ésta de O<sub>2</sub> molecular (Yokota y Yamazaki, 1965).

También se ha llegado a describir recientemente la existencia de otro intermedio denominado Compuesto 0, que se forma durante el ciclo catalítico de PODs con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y que aparece con anterioridad a la formación de Compuesto I. Este nuevo intermedio se observó en la reacción de PODs con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a -16°C en un medio que contenía metanol, y se caracteriza por tener unido un anión peróxido (Baek y Vanwart, 1992). Además, se ha caracterizado otro intermedio espectroscópico al estudiar el mutante R38L, formándose también con anterioridad al Compuesto I, aunque presenta un espectro distinto al de los Compuestos I y 0 (RodriguezLopez et al., 1996a). Estos resultados están apoyados por un estudio teórico, donde se simularon los espectros electrónicos de los intermedios de peroxidasa, justificándose la existencia de varios de ellos, formados previamente a la aparición del Compuesto I (Harris y Loew, 1996).

$$POD + H_2O_2 \xleftarrow{k_1} POD - H_2O_2 \xrightarrow{k_2} POD - I + H_2O$$

El ciclo de peroxidación se inicia por una rápida oxidación ( $k_1 > 10^7 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) de la enzima, por peróxido de hidrógeno para dar compuesto I. La formación de compuesto I implica al menos dos reacciones, la formación previa de un complejo enzimahidroperóxido (Baek y Vanwart, 1992), seguido por una ruptura heterolítica de la unión oxígeno-oxígeno. Residuos clave que modulan ambas reacciones son la His-42 y Arg-38, localizadas ambas en la cavidad hémica distal (RodriguezLopez et al., 1996b). Se ha sugerido que el residuo de histidina distal actúa como un catalizador ácido/base general. Actúa primero como base, favoreciendo la unión de la molécula de  $H_2O_2$  al átomo de hierro del sitio activo de la enzima, ya que su presencia facilita la transferencia de un protón, desde el átomo de oxígeno de la posición  $\alpha$  del  $H_2O_2$  al nitrógeno de dicha histidina, y esto da lugar a la formación de una unión peróxidohierro (Dunford, 2010). Posteriormente actúa como un ácido, al transferir el protón al oxígeno terminal del peróxido para generar una molécula de agua, que se desprende después de la ruptura de la unión oxígeno-oxígeno (Erman et al., 1992). La escisión de la unión O-O es promovida también por la arginina 38, localizada cerca del residuo histidina distal del sitio activo. Esta arginina, cargada positivamente, estabiliza el estado de transición hacia el Compuesto I, interaccionando con la carga negativa desarrollada sobre el átomo de oxígeno, siendo reducida durante la ruptura heterolítica de la unión O-O del peróxido (Vitello et al., 1993). Este conjunto de interacciones tiene como resultado final la formación del Compuesto I como intermedio catalítico (Figura 1.3).

Otro residuo, Asn-70, tiene gran importancia al comprobar que mantiene la basicidad del residuo histidina distal (Mukai et al., 1997; Nagano et al., 1996; Tanaka et al., 1997). El residuo Arg-38 no parece ser absolutamente esencial en la formación de Compuesto I, pero aumenta la eficiencia de la reacción y la afinidad por los sustratos, incluido el peróxido (RodriguezLopez et al., 1996a).





**Ciclo catalítico de peroxidasa.** Se muestra la estructura del sitio activo para cada una de las especies enzimáticas: Enzima nativa, Compuesto I y Compuesto II.

Se observa un flujo de electrones entre el sustrato  $H_2O_2$  y el sitio activo de la enzima. Éste transfiere su protón al grupo básico distal (His-42). La carga positiva de

la His-170 facilita la formación de la unión peróxido-hierro. La carga negativa sobre la His-170 y la carga positiva sobre la His-42 y la Arg-38, facilitan la ruptura heterolítica de la unión O-O, dando lugar a la formación del grupo ferrilo Fe=O, liberándose una molécula de agua.

Para completar el ciclo de peroxidación, el Compuesto I debe ser reducido para restablecer el estado de Fe (III) inicial. Esto se lleva a cabo mediante dos reacciones sucesivas, de transferencia de un electrón procedente de moléculas de sustratos que tengan carácter reductor, tales como fenoles, anilinas y un amplio abanico de sustratos. Tras la primera etapa de reducción, se produce un segundo intermedio enzimático, el Compuesto II. Durante estas dos reacciones se producen radicales libres, que intervendrán en distintas reacciones químicas. En el paso de Compuesto I a Compuesto II es donde se produce la transferencia del electrón, desde un sustrato reductor al anillo de porfirina, de forma que el radical  $\pi$ -catión desaparece, y el protón se transfiere al grupo básico distal de His-42 (Dunford, 2010). El Compuesto II tiene la estructura de Fe<sup>IV</sup>=O indicada anteriormente. Cuando este grupo está protonado, el Compuesto II está activo, pero cuando está desprotonado es totalmente inactivo (Dunford y Stillman, 1976). La reducción de Compuesto II está totalmente influenciada por el grupo ácido de pKa 8,7 de la histidina distal. La forma protonada posee un hidrógeno unido al átomo de oxígeno del grupo Fe<sup>IV</sup>=O, aguí no hay ambigüedad en su localización (Hashimoto et al., 1986). Cuando Compuesto II se reduce a enzima nativa, se desprende agua que incorpora el átomo de oxígeno procedente del grupo Fe<sup>IV</sup>=O. Un protón es suministrado por el grupo distal (His-42) del sitio activo de la enzima, y otro por el sustrato reductor donante de hidrógeno. La transferencia del electrón ocurre a través del grupo ferrilo. La velocidad del ciclo de peroxidación depende de la naturaleza del sustrato reductor. Diferentes factores modifican esta velocidad, como es el caso de los factores estéricos y los electrónicos. La transferencia electrónica entre los sustratos y el átomo de hierro del grupo hemina, se ve dificultada por el impedimento estérico, que limita el acceso al sitio de interacción, de los sustratos con sustituyentes muy voluminosos, al igual que la polaridad de los sustratos, ya que el grupo hemina se localiza en un bolsillo hidrofóbico formado por Phe 179, Phe 68, Pro141, Ala 140 y Gly 69 (Smith y Veitch, 1998). La velocidad de reacciones entre sustratos como fenoles y Compuesto II, se ve intensificada si los sustituyentes del sustrato son donadores de electrones (Dunford, 2010). Nuevos descubrimientos en el sitio de unión y en la catálisis, se obtienen a través de mutagénesis dirigida, crucial en el reciente progreso en el entendimiento, de las interacciones de peroxidasa con gran diversidad de sustratos

(Smith y Veitch, 1998). La etapa limitante de la velocidad de este ciclo, resulta ser por tanto el proceso de reducción de Compuesto II, que restablece la forma nativa de la enzima. Desde el punto de vista cinético, el mecanismo de reacción de peroxidasa se ha descrito como un mecanismo Ping-Pong irreversible (Dunford y Stillman, 1976), según el siguiente esquema :



Normalmente la reducción del Compuesto II es más lenta que la reducción del Compuesto I ( $k_2 > k_3$ ), por lo que en condiciones de estado estacionario es posible la determinación de  $k_3$ . Para la determinación de  $k_2$  es necesario recurrir a técnicas de cinética rápida (*flujo detenido*) (Dunford, 2010; Dunford y Stillman, 1976).

#### 1.1.4.1. Inactivación de las peroxidasas

La inactivación es una de las propiedades a evitar cuando se utilizan peroxidasas. Puede haber tres posibles procesos por los cuales las peroxidasas se desactivan:

-. Inactivación irreversible: Una forma de inhibición suicida, debido a los radicales libres generados durante el proceso catalítico (Klibanov et al., 1983).

-. Inactivación debido a los polímeros producidos al final del ciclo catalítico, que pueden adsorber la enzima y co-precipitarla, cuando exceden el límite de solubilidad (Nakamoto y Machida, 1992).

-. Exceso de peróxido de hidrogeno que es otra forma de inhibición suicida (Arnao et al., 1990).

Para prevenir la inactivación, se pueden añadir aditivos como el polietilenglicol (PEG), gelatina y ciertos polielectrolitos. PEG se ha comprobado que es el mejor en términos de mínima concentración efectiva requerida, ausencia de interferencias con la eficiencia de degradación, y facilidad de separación de la solución, como un co-precipitado con los productos formados de la reacción enzimática (Zalipsky y Harris,

1997). El mecanismo por el cual PEG protege a la enzima no está totalmente claro, pero se cree que sigue la teoría del "polímero sacrificado", reaccionando con los radicales libres generados durante el proceso catalítico, y/o los productos poliméricos de la unión radical, en lugar de que estos productos reaccionen o se asocien con la enzima ,y por tanto la precipiten (Nakamoto y Machida, 1992).

# 1.1.5. Peroxidasa de raíz de rábano (HRP).

#### 1.1.5.1. Características generales

El rábano picante, Armoracia rusticana, de la familia de las Brasicaceae, es un material clásico utilizado como fuente de peroxidasa, ya que su raíz es rica en dicha actividad. Es una planta de hoja perenne muy resistente, cultivada en regiones de clima templado del mundo, principalmente por el valor culinario de sus raíces (Veitch, 2004). La peroxidasa de raíz de rábano, es una enzima característica de la clase III. Está implicada en la formación de radicales libres, que pueden ser intermediarios para la polimerización y entrecruzamiento, de los componentes de la pared celular. También participa en la oxidación de metabolitos secundarios, esenciales para ciertas reacciones de defensa frente a patógenos, así como en la regulación del crecimiento celular y su diferenciación (Penel et al., 1992). Esta actividad enzimática es conocida con las siglas HRP (del inglés: horseradish peroxidase), y cataliza in vitro la oxidación por  $H_2O_2$  de una amplia variedad de sustratos, incluyendo fenoles, aminas aromáticas, etc. HRP presenta un elevado polimorfismo, aislándose en 1958 (Paul, 1958), 5 isoenzimas de la raíz. En 1966 Shannon y colaboradores aislaron 7 isoenzimas, que se dividen en tres grupos, de acuerdo con sus propiedades electroforéticas. Las peroxidasas aniónicas forman 2 grupos, uno compuesto por las isoenzimas A1 y A2, y otro por la isoenzima A3. Las isoenzimas catiónicas forman el tercer grupo con las isoenzimas B, C, D y E. Las isoenzimas aniónicas y catiónicas presentan propiedades catalíticas diferentes, frente a peróxidos y sustratos reductores (Kay et al., 1967). Se ha llegado a detectar más de 30 isoformas de HRP (Hoyle, 1977). Comercialmente, las preparaciones consisten principalmente en isoenzima C y muchas veces está presente la isoenzima B, ambas son idénticas para todos los propósitos, excepto en la movilidad electroforética (Dunford, 2010). Actualmente se conocen al menos nueve genes que codifican para HRP, de los cuales, cinco se expresan en la raíz (HRP C, A1, A2, N, E5). También se ha sugerido que las posibles fuentes de variantes de peroxidasa, pueden ser debidas al procesado de sus propéptidos, y a sus diferentes patrones de glicosilación (Welinder, 1992). Una ventaja de utilizar esta enzima, es que se produce a gran escala a partir de sus raíces, debido a sus usos comerciales. Por ejemplo, se utiliza en los kits de diagnóstico como reactivo en numerosos análisis clínicos (glucosa, colesterol, triglicéridos, etc.), y de enfermedades, así como en ensayos inmunoenzimáticos (Veitch, 2004).

#### 1.1.5.2. Isoenzima C de peroxidasa de raíz de rábano (HRP C).

Numerosos sistemas distintos de expresión para la producción de HRPC recombinante, se han desarrollado desde los años noventa (Veitch y Smith, 2001), ya que HRPC es la isoforma más estudiada. Es una isoenzima débilmente básica, y constituye el 50 % del contenido en peroxidasa de la raíz de rábano. Es una enzima de naturaleza glicoproteica. La parte proteica está constituida por una única cadena polipeptídica, con un total de 308 aminoácidos. La distribución de los aminoácidos permite predecir la existencia de cuatro puentes disulfuro, entre las cisteínas 11 y 91; 44 y 49; 97 y 301 y entre las 177 y 209 (Welinder, 1976, 1979).

Actualmente las técnicas de evolución dirigida, se han aplicado para mejorar cualidades de la enzima HRPC, como estabilidad térmica y resistencia a la inactivación por peróxidos, aspectos importantes para su uso biotecnológico y aplicaciones de diagnóstico (Veitch, 2004).

Relacionados con la conformación estructural y con la estabilidad de la proteína, se encuentran dos átomos de Ca<sup>+2</sup> (Haschke y Friedhoff, 1978), uno en posición distal y otro proximal respecto al grupo hemina (Gajhede et al., 1997) . El átomo de calcio distal se encuentra heptacoordinado, forma seis enlaces con cinco aminoácidos próximos (G48, V46, D50, S52, D43) a través de sus cadenas laterales, y el séptimo a una molécula de agua estructural. El átomo de calcio proximal se encuentra también heptacoordinado, a los aminoácidos D222 y D230 mediante el grupo carboxilo, a T171 y T225 por grupos hidroxilo y a T171, T225 e l228 mediante grupos carbonilo. Estos sitios de calcio son idénticos estructuralmente a los de peroxidasa de cacahuete (PNP), excepto el residuo l228 de HRP, cuyo equivalente en PNP es L220 (Schuller et al., 1996). La existencia de dos sitios de calcio puede ser una consecuencia de la duplicación temprana de genes, durante la evolución de peroxidasas de plantas y fúngicas (Welinder, 1992; Welinder y Gajhede, 1993). El tratamiento de HRPC con EDTA separa los iones calcio de la proteína, y esto causa su inestabilidad térmica (Haschke y Friedhoff, 1978). La ausencia de este ion implica que

la proteína se pliegue incorrectamente y resulta ser inactiva. Esto se ha comprobado al obtener la enzima peroxidasa recombinante, después de expresarla en E. Coli (Smith et al., 1990) y observar la necesidad de calcio para el plegamiento correcto. La eliminación de los átomos de calcio de la estructura de HRP-C, provoca una disminución en la actividad específica hasta un 40%. La eliminación de calcio de la estructura de HRP-C, produce también un cambio en el entorno del grupo hemina. La enzima carente de calcio tiene un espectro de EPR y <sup>1</sup>H RMN diferente al de la enzima nativa. Estudios de la dependencia con la temperatura, demuestran que el átomo de hierro del grupo hemina, existe como una mezcla de estados de alto y bajo spin, modulados por la temperatura. Estudios cinéticos muestran una disminución mínima, de la constante de velocidad de formación de Compuesto I, mientras que la constante de reducción del Compuesto II, disminuye un 44% su valor inicial, con la eliminación de calcio de la estructura de la enzima (Shiro et al., 1986). Se ha confirmado la existencia de conexiones estructurales, entre los sitios de calcio y el grupo hemina en HRP-C (Figura 1.4), mediante estudios cristalográficos (Gajhede et al., 1997). Se sabe que uno de los ligandos del calcio distal es una molécula de agua (Wat15), la cual se une por puente de hidrógeno a  $O \in 1$  de Glu64, que a su vez comparte otro enlace por puente de hidrógeno, con otra molécula de agua estructural (Wat14). Esta molécula de agua, Wat15, y el grupo carbonilo de Glu64, se unen mediante enlace por puente de hidrógeno, a N $\delta$ 2H2 de Asp70, mientras que O $\delta$ 1 de Asp70 se enlaza mediante puente de hidrógeno con N $\delta$ 1H de la histidina distal (His42). Los residuos Glu64 y Asp70 que facilitan la conexión mediante puentes de hidrógeno, se encuentran altamente conservados en las peroxidasas de plantas (Welinder, 1992).

La mutagénesis dirigida de HRP-C ha permitido la obtención de mutantes de Glu64, sustituido por Gly (E64G), Pro (E64P) o Ser (E64S), con el fin de evaluar la importancia de este residuo en la estabilización por calcio y en la actividad de la enzima (Tanaka et al., 1997). El contenido en calcio de estos mutantes es solo de 1 mol de calcio por mol de enzima, de acuerdo con los resultados obtenidos por espectroscopia de emisión en plasma. Las propiedades cinéticas de los tres mutantes, son significativamente diferentes a las de la enzima salvaje, y muestran pequeñas variaciones entre ellas. Se observa una reducción de 20 veces en el valor de V<sub>max</sub>, en la reacción de oxidación de hidroquinona en condiciones de estado estacionario. La constante de velocidad de primer orden de formación de Compuesto I, obtenida mediante espectroscopia de flujo detenido (*stopped-flow*), disminuye 33 veces en los



FIGURA 1.4

Sitios de unión a calcio en HRPC. (A). Catión de calcio proximal. (B). Catión de calcio distal.

tres mutantes respecto a la HRP-C salvaje. Sin embargo, se observan disminuciones más moderadas en las constantes de reducción de Compuesto I y Compuesto II, siendo éstas de cinco y dos veces, respectivamente. La mayor contribución a la disminución en la constante de formación de Compuesto I, se debe al aumento en el potencial redox (Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>) de los mutantes, y a la reorientación y disminución de la basicidad de His42. El espectro de RMN es extraordinariamente similar, indicando que la sustitución de Glu64, produce un cambio en la estructura electrónica del grupo hemina, independiente de la naturaleza de la sustitución.

El calcio proximal se une al grupo hemina a través de la Thr171, que se encuentra adyacente al residuo de histidina proximal, His170. Se esperan con interés

los resultados de la mutagénesis dirigida de este residuo Thr171. La importancia de ambos cationes de calcio, distal y proximal, en la estructura y función de HRP-C, se ve reflejada en la necesidad de incorporar calcio como componente de la mezcla de plegamiento *in vitro*, para obtener de los cuerpos de inclusión solubilizados, una enzima recombinante activa (Smith et al., 1990).

La masa molecular de la cadena polipeptídica se ha calculado a partir de la secuencia de aminoácidos, dando un valor de 33.890. Si se tiene en cuenta el grupo hemina, y los dos átomos de calcio que posee la enzima en su estructura, entonces su masa molecular aumenta a 34.590 (Welinder, 1979). Por espectrometría de masas (MALDI-TOF) se ha determinado su masa dando un valor de 43.540. La diferencia de masa molecular se debe a la contribución de los carbohidratos a la molécula, que suponen entre un 18 y un 22,2 % del total de la masa de HRPC (Wang et al., 1999). El patrón de glicosilación lo constituyen 8 cadenas de oligosacáridos (Welinder, 1979) Welinder, 1976). Su digestión con tripsina, libera siete glicopéptidos. Los carbohidratos más abundantes son manosa y glucosamina, y también fructosa, arabinosa y xilosa en menor cantidad. En cada uno de los siete glicopéptidos, una molécula de glucosamina se asocia a un residuo de asparragina, por lo que se cree que las cadenas de azúcares están unidas covalentemente a la cadena polipeptídica, a través de enlaces N-glicosídicos (Welinder, 1979).

El grupo prostético de HRPC está constituido por protohematina IX. Esta estructura está constituida por protoporfirina IX y un átomo de Fe (III), ligado por interacción electrostática con las cargas negativas del anillo porfirínico (Figura 1.5). La unión a la proteína se realiza a través de un grupo imidazol perteneciente a un residuo de histidina, llamado histidina proximal, que ocupa la quinta posición de coordinación del hierro (Lamar y Ropp, 1979; Mauk y Girotti, 1974; Smulevich et al., 1990). Esta interacción confiere a la histidina proximal un carácter lo suficientemente aniónico, como para aumentar la densidad electrónica del hierro hémico, ayudando a la estabilización del catión ferrilo formado durante el ciclo catalítico de la peroxidasa.

Otro residuo de histidina, llamado histidina distal, se localiza en el sitio activo, siéndole atribuido el papel de aminoácido clave en la catálisis de la enzima (Hashimoto et al., 1986). También participa en la catálisis de HRPC, una arginina situada también en la parte distal del sitio activo de HRPC ((RodriguezLopez et al., 1996a).

En cuanto a la sexta posición de coordinación del hierro, en un principio se estableció que era una molécula de agua la que ocupaba dicha posición (Keilin et al., 1951). Estudios posteriores han demostrado que el átomo de hierro en HRPC se

encuentra de forma pentacoordinada, estando la sexta posición vacía, aunque la estructura pentacoordinada no excluye necesariamente la existencia de una molécula de aqua ligada a la histidina distal del sitio activo de HRPC (Gupta et al., 1980; Kobayashi et al., 1980). Se han obtenido datos de resonancia Raman, que han proporcionado evidencia de que el hierro de HRPC está pentacoordinado (Smulevich et al., 1990). Además, los espectros de la región Soret de HRPC (Dunford, 1982; Edwards et al., 1993), son marcadamente diferentes a los de mioglobina, de la que se sabe que posee agua en la sexta posición de coordinación. Hasta hace unos años, sólo era posible hacer estudios espectroscópicos descriptivos para HRPC (Pennerhahn et al., 1986), ya que su estructura cristalina por rayos X era complicada de obtener, debido principalmente a la microheterogeneidad en las preparaciones de la enzima, y también por el alto contenido de carbohidratos de la enzima, que dificultaba la buena obtención de cristales. En 1997, la estructura cristalina de la isoenzima HRPC ha podido obtenerse con una resolución de 2,15 Å (Gajhede et al., 1997). Pero se ha cristalizado su forma no glicosilada o recombinante, ya que la forma nativa o salvaje posee un alto grado de glicosilación. Esta forma enzimática se obtiene cuando su ADN se expresa en la bacteria E. coli. En la Figura 1.5 se ilustra la topología de esta enzima, observándose la localización del grupo hemo y las zonas de unión de los dos iones calcio.

Datos obtenidos de variantes de HRPC a partir de mutagénesis dirigida (técnica que reemplaza unos aminoácidos seleccionados en el sitio activo de la enzima por otros), permiten conocer mejor cuál es la función de aminoácidos esenciales en el sitio activo, y en el ciclo catalítico de la enzima. Así, la estructura catalítica de HRPC muestra que hay un puente de hidrógeno, que une la histidina proximal con la cadena carboxilada de un residuo de ácido aspártico-247, que está conservado en todas las peroxidasas de plantas y de hongos (Gajhede et al., 1997). Se ha confirmado la importancia de los residuos de Arginina-38 e Histidina-42 de la zona distal del grupo hemina, que junto con Asparragina-70 son esenciales para la catálisis de la enzima. Estudios de mutagénesis sobre el aminoácido Asn-70, confirman que su presencia es necesaria para mantener la basicidad del residuo histidina distal (Mukai et al., 1997; Nagano et al., 1996; Tanaka et al., 1997). Otro residuo de gran importancia es Fenilalanina-179, ya que junto con Phe-68 y Phe-142, actúan como los contactos hidrófobos en el canal de acceso de los sustratos reductores (Veitch et al., 1997). La estructura cristalina indica que la conformación de la Phe-68, puede modular la formación del complejo enzima-sustrato, ya que cierra el paso al canal de acceso. Un detalle de los aminoácidos del sitio activo de la enzima se muestra en la Figura 1.6.



FIGURA 1.5

Esquema del sitio catalítico de HRPC y cationes de calcio de la estructura. El grupo hemo se coordina al residuo de histidina proximal, His 170. La sexta posición de coordinación se encuentra libre.



FIGURA 1.6 Detalle de los aminoácidos del sitio activo de la HRPC

#### 1.1.6. Peroxidasa de soja (SBP).

#### 1.1.6.1. Características generales

En 1991 fue identificada en las semillas de soja, una rica fuente de una peroxidasa única, una isoenzima de 37000 Daltons (Gillikin y Graham, 1991).

La peroxidasa de soja de *Glycine max* (SBP; EC 1.11.1.7) es una glicoproteína que pertenece al mismo grupo de peroxidasas que la comentada anteriormente, HRPC. Por tanto es bastante parecida, y de hecho exhibe un 57% de secuencia de aminoácido idéntica, tienen el mismo grupo prostético y el mismo mecanismo catalítico. En la Figura 1.7 se muestra la estructura de la enzima SBP (Henriksen et al., 2001).

Lo que hace a SBP una enzima muy utilizada en el ámbito de la biotecnología, es su extraordinaria estabilidad térmica, su alta reactividad, su estabilidad incluso a bajo pH y sus propiedades catalíticas. La temperatura de inactivación de SBP es 90.5°C, mientras que la de la isoenzima HRP C es de 81.5 °C (Henriksen et al., 2001). Además, las semillas de la soja son una fuente muy rica en peroxidasa, y como es un subproducto de la industria alimentaria de soja, es una alternativa muy barata y abundante. Por tanto, también es ecológica, pues se utilizan los desperdicios de otro proceso, y se usa directamente como extracto crudo de las semillas, obviando los costes en la purificación de la proteína. Lavar las semillas de soja con agua tamponada es suficiente para extraer la enzima cruda (Bassi et al., 2004). Sin embargo, HRP no está disponible en grandes cantidades a un precio apropiado para el tratamiento de aguas. Por ello se trata de investigar otras peroxidasas, como es el caso de SBP (Al-Ansari et al., 2009).

Se ha comprobado que puede ser una alternativa eficaz a la clásica , bien conocida y utilizada HRP (Frasconi et al., 2009).

Según el sustrato con el que actúe SBP, es más o menos eficaz que HRP, pues su eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_{M}$ ) es veinte veces superior para la oxidación de ABTS, pero menor para la eficiencia de degradación de fenol (Al-Ansari et al., 2009).

El precio, prohibitivo muchas veces de las enzimas, es debido a que la enzima es susceptible a la inactivación. En el caso de HRP, se encuentra comercialmente disponible en forma de enzima purificada. En cambio, SBP procede de una fuente más barata (Wright y Nicell, 1999).

Por el momento, no se han hecho estudios de mutagénesis de SBP recombinante, y los investigadores creen que esto necesita atención urgente, pues podría revelar qué residuos de SBP la dotan de una estabilidad térmica tan grande,
comparada con la de HRP. Además, al igual que con HRP, la evolución dirigida podría aumentar el número de sustratos que acepta (Ryan et al., 2006).



#### FIGURA 1.7

Detalle de la estructura 1FHF de la enzima SBP (A) y la estructura 1 FHF en 3D (B).

## 1.1.7 Aplicaciones de Peroxidasas

Las peroxidasas se utilizan ampliamente en bioquímica clínica y ensayos inmunoquímicos (Ngo, 2010). Pero además, las peroxidasas tienen potencial para disminuir la contaminación medioambiental mediante bioremediación de vertidos industriales (Bansal y Kanwar, 2013). Entre otras aplicaciones de peroxidasas, se encuentran la síntesis de algunos compuestos químicos aromáticos, y la eliminación de peróxido de hidrógeno de alimentos y desechos industriales (Hamid y Khalil ur, 2009). Sin embargo, para mejorar y ampliar las aplicaciones con peroxidasas es necesario seguir conociendo la estructura de la enzima, y de sus compuestos intermedios l y II, así como su reactividad (Poulos, 2010). A continuación se detallan

varias de estas aplicaciones biotecnológicas.

### 1.1.7.1 Ensayos inmunológicos

HRP es probablemente la enzima más común en ensayos ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) debido a su escasa especificidad frente al sustrato, junto con su alta estabilidad térmica. Estos ensayos se diseñan para detectar anticuerpos o antígenos mediante la producción de un cambio de color por la reacción enzimática. Para ello se necesita una enzima específica del antígeno y un sustrato cromogénico. La cantidad de color generada es proporcional a la cantidad de antígeno en el test. Entre los métodos ELISA que se han desarrollado con HRP destaca el utilizado contra micotoxinas, que son peligrosos subproductos de varias especies fúngicas y que se pueden encontrar predominantemente en los cereales.

### 1.1.7.2 Aplicaciones en análisis y kits de diagnóstico

HRP es la enzima más utilizada en esta aplicación, aunque otras peroxidasas pueden sustituirla, dada la habilidad de las peroxidasas de producir productos cromofóricos en bajas concentraciones y una relativa estabilidad. Entre los kits de diagnóstico, destacan los de determinación de glucosa, colesterol y ácido úrico. En el caso del kit de determinación de ácido úrico la reacción sería la siguiente (Agostini et al., 2002):

Ácido úrico+ $O_2 + 2H_2O \xrightarrow{Uricasa}$  Alantoina +  $H_2O_2 + CO_2$  $H_2O_2 + 4$  - aminofenazona + Fenol  $\xrightarrow{Peroxidasa}$  p-(benzoquinona)monoamina-fenazona

Como se observa, en estos ensayos se aprovecha la reacción redox catalizada por HRP, y en aquellos casos en los que la sustancia a determinar no se pueda oxidar, ésta puede ser degradada mediante la actuación de otra enzima hasta la obtención de productos susceptibles de oxidarse.

Además de los kits, también se han utilizado las peroxidasas en diversas aplicaciones de diagnóstico en medicina, como por ejemplo, la detección de 8-hidroxidesoxiguanosina y sus análogos en orina, para identificar el riesgo de padecer cáncer de próstata o vejiga (Chiou et al., 2003).

### 1.1.7.3 Biosensores de peroxidasa

Los biosensores electroquímicos también engloban una de las grandes aplicaciones de las peroxidasas. Los biosensores se definen como aparatos analíticos

que combinan estrechamente elementos de bioreconocimiento, con transductores físicos para la detección de un compuesto concreto. Se han descrito muchos biosensores específicos de contaminantes medioambientales que puede ser muy útil por ejemplo en la detección en continuo de un área contaminada.

Recientemente, se han utilizado electrodos basados en peroxidasa para uso en sistemas analíticos, para la determinación de peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos. Estas determinaciones se pueden utilizar, por ejemplo, para la determinación de glucosa, alcoholes, glutamato y colina (Ruzgas et al., 1996), aprovechando el ciclo catalítico de la enzima.

### 1.1.7.4 Síntesis orgánica y de polímeros

Las peroxidasas también son populares en la polimerización de aminas aromáticas y polímeros fenólicos, mientras nuevos tipos de polímeros aromáticos se han sintetizado en agua o en disolventes orgánicos miscibles en agua.

El cardanol, es un derivado del fenol de cadena alquílica insaturada  $C_{15}$  que se utiliza como material de partida para producir resinas y forros de fricción y se obtiene de una destilación térmica de biomasa procedente de castaños. La síntesis oxidativa del polímero de este compuesto es catalizada por SBP utilizando disolventes como etanol o 2-propanol (Kim et al., 2003).

La producción de polímeros conductores tiene un interés remarcable por su uso en múltiples aplicaciones como protección anticorrosiva, display óptico, etc. El polímero más estudiado en este campo es la polianilina que se ha venido sintetizando químicamente, con las desventajas propias de este método (condiciones de reacción extremas y uso de reactivos químicos que hacen que sea un método no ecológico y caro). Por ello, se ha sustituido por la síntesis enzimática con HRP.

Además, las peroxidasas catalizan la oxidación de fenoles que normalmente originan polímeros de alto peso molecular mediante reacciones no enzimáticas posteriores y esta característica se puede aprovechar como una atractiva alternativa al método convencional de producir resinas fenólicas de lignina (método del formaldehido), que se utilizan en una gran variedad de aplicaciones como agentes condicionantes del suelo, adhesivos, dispersantes poliméricos, etc. (Nicell y Wright, 1997).

Se han registrado algunas patentes con HRP, en la formación de geles semisólidos biocompatibles, utilizados en el campo de la cosmética como vehículos, selladores de heridas, o agentes aglomerantes en la industria de alimentación.

Finalmente, otro ejemplo en el ámbito de la síntesis es el acoplamiento

enzimático entre catarantina y vindolina para producir  $\alpha$ -3'-4'-anhidrovinblastina. Este compuesto se cree que es el precursor de vinblastina y vincristina, que son parte de los tratamientos usados en la quimioterapia del cáncer (Sottomayor et al., 1998).

### 1.1.7.5 Desodorización de estiércol porcino

Los compuestos odoríferos como fenoles, indoles, ácidos grasos volátiles, amonio, sulfuro de hidrógeno y mercaptanos se encuentran presentes inicialmente en el estiércol o se generan por transformaciones anaeróbicas de desechos animales. Estos olores en cantidades elevadas dentro de recimiento confinados resultan peligrosos y pueden llegar a disminuir el rango de crecimiento del ganado, aumenta el brote de infecciones y por tanto, también afecta negativamente a los granjeros. Tratamientos como dietas específicas, aireación intensa de la zona y la aplicación de aditivos al estiércol se han venido usando, pero son métodos caros que requieren mano de obra especializada (McCrory y Hobbs, 2001). Recientemente HRP se ha probado como una alternativa combinada con peróxido de calcio y se puede reutilizar hasta cinco veces, consiguiendo una reducción, por ejemplo de fenol del 70% y de ácidos grasos volátiles del 45%. También se ha conseguido un 100% de reducción en 72 h. sin recurrencia (Govere et al., 2005).

## 1.1.7.6 Biodegradación de compuestos fenólicos y derivados

Las peroxidasas, especialmente HRP se están utilizando en el tratamiento de contaminantes aromáticos acuosos provenientes de aguas de desecho de industrias tan variadas como refinerías de petróleo, industrias textiles, de polímeros, resinas, papel, entre otras. El uso de esta enzima, en presencia de peróxido de hidrógeno, incluye el tratamiento de contaminantes tan variados como anilinas, hidroxiquinolina, bencidinas y naftilaminas, que se consideran cancerígenas (Aboul-Gheit et al., 2011). Además, HRP es capaz de coprecipitar ciertos contaminantes muy difíciles de degradar (incluso compuestos que no son sustratos de HRP), hacia compuestos fáciles de separar pues induce a la formación de compuestos poliméricos. Este fenómeno tiene una aplicación muy práctica en los vertidos industriales, pues se puede utilizar con numerosos contaminantes, y se ha demostrado por ejemplo que los bifenilos policlorados se pueden eliminar de las aguas, a través de una coprecipitación con fenoles (Klibanov et al., 1983).

Debido a esta práctica aplicación de las peroxidasas, se están realizando muchos esfuerzos para mejorar el proceso, como por ejemplo en la vida útil de la enzima, en el diseño de los reactores enzimáticos, inmovilización de enzimas, uso de aditivos como borato sódico, y adición de adsorbentes como talcos para proteger la enzima de inhibiciones por productos de oxidación (Nicell et al., 1993).

Casi todas las degradaciones de estos compuestos están hechas tradicionalmente con HRP pero actualmente otras fuentes de peroxidasa, como soja, están siendo estudiadas, por sus mejores propiedades como estabilidad térmica.

No obstante estas aplicaciones están aún en fase experimental, pues se necesitan muchas condiciones de reacción que optimizar como el pH, concentración de sustrato, tiempo de reacción y la adición de ciertos reactivos.

### 1.1.7.7 Decoloración de colorantes sintéticos

Los tintes usados para la imprenta, para la fotografía, industria textil y aditivos del petróleo tienen un origen sintético y unas complejas estructuras aromáticas. Estos compuestos representan unos de los grupos contaminantes más problemáticos, considerados como xenobióticos que no son fácilmente degradados (Ong et al., 2011). Además, sobre el 10-15% de los tintes sintéticos producidos son vertidos en los efluentes industriales causando problemas medioambientales. La degradación de estas sustancias no es fácil en plantas de tratamiento de aguas convencionales pues el tratamiento biológico que se les da no es apropiado para la estructura química .Los métodos físico-químicos como oxidación química, ósmosis inversa y adsorción son muy eficientes pero tienen sus desventajas. Por tanto, hay un interés en la degradación biológica ya que es más barata y supone una alternativa menos agresiva (de Souza et al., 2007).

Se ha demostrado que HRP es eficaz en la degradación industrial de importantes colorantes como fenol y fenoles substituidos mediante el mecanismo de polimeración vía radical libre (Tatsumi et al., 1996). Se sabe que HRP en su forma libre es efectiva en la decoloración de colorantes textiles y efluentes, así como para conseguir una reducción en la toxicidad de un efluente tras un tratamiento enzimático.

En capítulos posteriores se profundizará en esta aplicación, puesto que es la estudiada en esta tesis doctoral.

## 1.2 LACASA

Lacasa (benzenediol: oxígeno oxidorreductasa, EC 1.10.3.2) representa el mayor subgrupo de oxidasas multicúpricas azules (BMCO, *blue multicopper oxidases*). Éstas se caracterizan por ser polifenoloxidasas cuyo sitio catalítico contiene átomos de cobre. Otros miembros de este grupo de oxidasas multicúpricas son la ceruloplasmina de plasma de mamíferos y la ascorbato oxidasa de plantas (Piontek et al., 2002; Solomon et al., 1996).

Lacasa fue encontrada inicialmente en 1883 por Yoshida en exudados de *Rhus vernicifera* o árbol de la laca. Posteriormente, se encontró en gran diversidad de hongos y, recientemente, se han descrito enzimas con propiedades típicas de lacasas en insectos y procariotas.

En el caso de los insectos, se ha comprobado el papel fundamental de lacasa en la esclerotización de la cutícula de los insectos, al catalizar la transformación de compuestos fenólicos a quinonas (Gorman et al., 2012; Yatsu y Asano, 2009). Además, han sido clonadas y caracterizadas dos lacasas a partir del gusano del cuerno del tomate (*Manduca sexta*), y una del mosquito de la malaria (*Anopheles gambiae*) (Nakamura y Go, 2005).

En los últimos años se ha llevado a cabo la caracterización de lacasas en organismos procariotas, tanto bacterias y actinomicetos gram-negativos, como grampositivos. A pesar de la gran adaptabilidad ambiental, y la versatilidad bioquímica de los organismos procariotas, como por ejemplo *Oceanobacillus iheyensis* o *Aquifex aeolicus*, éstos no han sido estudiados a fondo. Además, se han identificado lacasas en las esporas de cepas de *Bacillus sphaericus* y *B. subtilis* (Claus, 2003; Singh et al., 2011).

En el reino vegetal, toda la familia *Anacardiaceae*, de la que es miembro el árbol de la laca, parece presentar lacasa en los conductos de resina y en la resina secretada. Cultivos celulares de *Acer pseudoplatanus* producen y secretan lacasa, y tejidos de *Pinus taeda* presentan ocho lacasas, localizadas predominantemente en el xilema. Hay otros estudios que muestran la presencia de lacasa en hojas de *Aesculus parviflora* y en brotes verdes del té (Mayer y Staples, 2002). Las lacasas vegetales suelen aparecer unidas a pared celular y es difícil determinar su actividad en extractos crudos, en los que aparece gran cantidad de polifenoloxidasas (tirosinasas, peroxidasas y lacasas).

## 1.2.1 Lacasas fúngicas

A pesar de conocerse durante años, las lacasas atrajeron una considerable atención, sólo tras el inicio de estudios de degradación enzimática, en la podredumbre blanca de plantas causada por hongos.

Las lacasas fúngicas aparecen en numerosas especies y se han purificado a partir de decenas de ellas. Se han puesto de manifiesto en hongos inferiores, como *Zygomycetes* y *Chytridiomycetes*, en *Ascomycetes* fitopatogénicos, así como en *Ascomycetes* del suelo.

Es difícil determinar cuántas especies de ascomicetos producen lacasas, ya que no se ha llevado a cabo una búsqueda sistemática. Además de las especies patógenas de plantas, la producción de lacasa se ha demostrado en algunas especies de ascomicetos del suelo y del agua (Abdel-Raheem y Shearer, 2002; Banerjee y Vohra, 1991; Junghanns et al., 2005; Rodriguez et al., 1996; Scherer y Fischer, 1998). Sin embargo, la enzima de *Aspergillus nidulans* no es capaz de oxidar la siringaldacina (Scherer y Fischer, 1998) y las presentes en *Penicillium* spp. no han sido evaluadas con este sustrato, con lo que no queda claro si son auténticas lacasas (Baldrian, 2006). Así mismo, especies de ascomicetos relacionadas con hongos degradadores de madera, que participan en la degradación de biomasa muerta en pantanos salados, presentan genes de lacasa y la capacidad de oxidar siringaldacina.

Las levaduras son un grupo fisiológico específico de basidiomicetos y ascomicetos. Hasta el momento sólo se ha purificado una lacasa a partir del patógeno humano *Cryptococcus neoformans*. Esta levadura, perteneciente a los basidiomicetos, produce una lacasa capaz de oxidar fenoles y aminofenoles, pero no tirosina (Williamson, 1994). La enzima está estrechamente unida a la pared celular y contribuye a la resistencia frente a fungicidas (Ikeda et al., 2003; Zhu et al., 2001). La producción de lacasa no ha sido demostrada en levaduras de ascomicetos, pero la oxidasa multicúprica unida a membrana Fet3p de *Saccharomyces cerevisiae* presenta homología tanto secuencial como estructural con las lacasas fúngicas, con propiedades espectroscópicas prácticamente idénticas (Baldrian, 2006).

Se han llevado a cabo diversos intentos para detectar enzimas ligninolíticas en hongos ectomicorrízicos (Burke y Cairney, 2002; Cairney y Burke, 1998), encontrándose fragmentos de genes muy similares a lacasa de hongos de podredumbre de madera, a partir de especies como *Amanita, Cortinarius, Hebeloma, Lactarius, Paxillus, Piloderma, Russula, Tylospora y Xerocomus (Chen et al., 2003; Luis et al., 2004)*. En el caso de *Piloderma byssinum*, se confirmó la transcripción de

una secuencia similar a lacasa por RT-PCR (Chen et al., 2003); no obstante, la aparición de una secuencia génica no determina la producción de la enzima. En *Paxillus involutus*, especie que contiene otra secuencia de lacasa, no se ha detectado la oxidación de siringaldacina (Gunther et al., 1998; Timonen y Sen, 1998). Parece que tirosinasa es la fenoloxidasa mayoritaria en hongos ectomicorrízicos, mientras que de la oxidación de siringaldacina apenas hay datos (Burke y Cairney, 2002), y los casos en los que se describe actividad lacasa en la literatura se basan en la utilización de sustratos no específicos, como ácido 2,2´-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) y naftol (Baldrian, 2006; Gramss et al., 1998; Gramss et al., 1999).

Entre los grupos fisiológicos de hongos, las lacasas son típicas en los Basidiomycetes de la podredumbre blanca de la madera, y un grupo relacionado de hongos saprofíticos, es decir, las especies que causan la degradación de la lignina. Casi todas las especies de hongos de la podredumbre blanca producen lacasa en distintas cantidades, y la enzima ha sido purificada a partir de numerosas especies. En el caso de Pycnoporus cinnabarinus, lacasa fue descrita como la única enzima ligninolítica (Eggert et al., 1996). Aunque el grupo de hongos que producen podredumbre marrón se caracteriza por carecer de la capacidad de descomponer lignina, se ha intentado detectar lacasas en estas especies. En Gloeophyllum trabeum se ha detectado una secuencia de ADN bastante similar a la de lacasas de un hongo de podredumbre blanca. Así mismo, se detectó oxidación de ABTS en esta especie y en alguna otra de la podredumbre marrón (Dsouza et al., 1996). Aunque no se ha purificado ninguna lacasa a partir de estos hongos de la podredumbre marrón, recientemente se ha detectado oxidación de siringaldacina en el hongo Conyophora puteana (Lee et al., 2004) y se ha observado oxidación de ABTS en Laetiporus sulphureus (Schlosser y Hofer, 2002). La presencia y función de lacasas en la podredumbre marrón de la madera no están claras (Baldrian, 2006).

## 1.2.2 Características generales de lacasa

Las lacasas catalizan la oxidación por oxígeno molecular de un sustrato, generalmente un p-dihidroxifenol u otro compuesto fenólico, debido a sus potenciales redox (en el rango de 0.5 a 1.0 V vs. NHE), suficientemente bajos para la extracción de un electrón por el T1 Cu(II) (Giardina et al., 2010; Tadesse et al., 2008). Es difícil definir la actividad catalítica de lacasa en cuanto a su gran variedad de sustratos, que cambian de una lacasa a otra y se superponen con los sustratos de otras enzimas. Aunque lacasa fue llamada difenol oxidasa, monofenoles como 2,6-dimetoxifenol o guaiacol, son en muchas ocasiones mejores sustratos que los difenoles. La

siringaldacina, N,N´-bis(3,5-dimetoxi-4-hidroxibenziliden hidracina), es considerada el sustrato más específico de lacasa.

### 1.2.2.1 Obtención

Los datos de que se dispone actualmente acerca de la estructura y las propiedades fisico-químicas de las lacasas fúngicas se deben a los estudios de lacasas purificadas. A día de hoy, se han purificado más de 100 lacasas a partir de hongos, y han sido caracterizadas en mayor o menor grado. En su mayoría, estas lacasas fúngicas, han sido purificadas a partir de *Basidiomycetes* de la podredumbre blanca de la madera, mientras que otros grupos de hongos productores de lacasas no han sido estudiados con detalle.

La mayoría de especies de hongos en las que se ha descrito la producción de lacasa presentan varias isoenzimas, que normalmente difieren en masa molecular. El hongo *Pleurotus ostreatus* produce al menos ocho isoenzimas de lacasa diferentes, seis de las cuales han sido aisladas y caracterizadas. La multiplicidad de genes de lacasa en hongos es una característica común en muchas especies, de ahí la producción de diferentes isoenzimas. Una explicación plausible de por qué un hongo requiere tal diversidad de genes de lacasa, es la consideración de las múltiples funciones fisiológicas que lleva a cabo lacasa durante el ciclo de vida de un hongo , ya que está descrito su implicación en procesos como la deslignificación, el desarrollo del cuerpo fructífero, la formación de pigmentos en la etapa asexual, patogénesis e interacciones competitivas, además del reciclaje de materia orgánica del suelo en hongos saprofitos y micorrizas (Giardina et al., 2010).

A partir de la purificación y secuenciación de distintas lacasas fúngicas, se ha determinado que éstas presentan alta homología estructural (entre el 56 y el 60%), así como una estricta conservación de los residuos de histidina que coordinan los átomos de cobre.

Lacasa es una glicoproteína típicamente monomérica constituida por 3 dominios y con una masa molecular entre 60-70 kDa; aunque se han observado casos de estructura de dos dominios y con una masa molecular inferior, entre 30 y 40 kDa; debido a esto, estas lacasas de dos dominios podrían necesitar ensamblarse en una estructura cuaternaria para poder trabajar adecuadamente (Giardina et al., 2010). Se ha conseguido aislar lacasas homodiméricas cuya estructura está compuesta por dos subunidades totalmente idénticas. Este es el caso de *Trametes villosa* y *Phellinus ribis*. Estas enzimas experimentan una dimerización dependiente del pH, con el dímero predominante en el rango de pH de 5.0 a 8.0. Incluso se han aislado lacasas

heteroligoméricas, cuya heterogeneidad se debe a la presencia o ausencia de una parte glicosídica. En general, presentan un pH óptimo ácido, con un punto isoeléctrico entre 3 y 5 (Baldrian, 2006).

### 1.2.2.2 Compartimentación

La mayoría de lacasas purificadas son de tipo extracelular, siendo ésta su ubicación mayoritaria. Sin embargo, es frecuente encontrar isoenzimas de características muy similares, localizadas intracelularmente o ubicadas en la pared celular. Debido a las propiedades de sus sustratos, las enzimas que participan en la ruptura de la lignina deberían aparecer exclusivamente en el medio extracelular. Mientras que este hecho no presenta ninguna excepción en el caso de ligninperoxidasas y manganeso-peroxidasas de hongos de podredumbre blanca, la situación es diferente en el caso de lacasas. Aunque la mayoría de lacasas son enzimas extracelulares, las lacasas de los hongos de la podredumbre de la madera se encuentran frecuentemente también en el medio intracelular. La mayoría de especies de la podredumbre blanca estudiadas producen ambos tipos, extracelular e intracelular. En cultivos de Trametes versicolor se encontraron las dos fracciones, aunque la enzima mayoritaria fue producida extracelularmente (98-95%). En Agaricus bisporus fueron encontradas trazas de actividad lacasa intracelular, pero más del 88% de la actividad apareció en el sobrenadante del cultivo. Sólo en los casos de lacasa de Neurospora crassa, Rigidoporus lignosus y una de las isoenzimas de lacasa de Pleurotus ostreatus, una parte considerable de la actividad lacasa está localizada intracelularmente o en la pared celular. La actividad lacasa está casi exclusivamente asociada a pared celular en el basidiomiceto de podredumbre blanca Irpex lacteus, la levadura C. neoformans y en las esporas de Trichoderma spp. La localización de lacasa está probablemente asociada a su función fisiológica y determina el rango de sustratos disponibles para la enzima. Es posible que las lacasas intracelulares de hongos, así como las lacasas periplásmicas bacterianas, puedan participar en la transformación de compuestos fenólicos de baja masa molecular en la célula. Las lacasas de pared celular y las asociadas a esporas, parecen relacionadas con formación de melanina y otros compuestos protectores de la pared celular (Baldrian, 2006).

### 1.2.2.3 Glicosilación

Como la mayoría de enzimas fúngicas extracelulares, las lacasas son glicoproteínas. Presenta N-glicosilación por medio de residuos de ácido aspártico de

los polipéptidos anclados a la membrana. El porcentaje de glicosilación generalmente oscila entre 10 y 25 %, pero se han encontrado lacasas con un contenido de sacarosa mayor del 30%, como Coriolopsis fulvocinnerea (32%) y Pleurotus pulmonarius (44%) (De Souza y Peralta, 2003; Shleev et al., 2004). Se han descrito lacasas con un contenido incluso mayor en Botritis cinnerea, donde la enzima monomérica de la cepa 61-34 contiene un 49% de azúcares. Otras preparaciones procedentes de las mismas especies, presentan hasta un 65-80%; esta parte glicosídica contiene monosacáridos tales como hexosaminas, glucosa, manosa, galactosa, fucosa y arabinosa (Madhavi y Lele, 2009), siendo manosa uno de los monosacáridos mas abundantes unidos a lacasa. Por otro lado, también han sido descritas especies en las que la glicosilación es muy baja, como en Pleurotus eryngii, donde la lacasa 1 presenta un 7% y la lacasa 2 sólo un 1% de uniones a azúcares. La estructura de glicanos de lacasa mejor conocida es la de la lacasa de Rigidoporus lignosus, que presenta N-glicosilación con manosa (Baldrian, 2006). La glicosilación de las lacasas fúngicas es un gran problema debido a la gran heterogeneidad en la producción de la enzima, que supone una dificultad para abordar el tema. La glicosilación es la responsable de la secreción, la susceptibilidad proteolítica, la actividad, la retención de cobre y la estabilidad térmica (Madhavi y Lele, 2009; Xu, 1999).

## 1.2.3 Estructura de lacasa

Se ha conseguido cristalizar diversas lacasas fúngicas (Figura 1.1). Entre ellas,



## FIGURA 1.1

**Cristales de lacasa. A:** Cristales de lacasa 1 de *T. versicolor*. **B** y **C:** Cristales de lacasa 2 de *T. versicolor*. **D:** Cristales de lacasa I, isoforma c. (Antorini et al., 2002).

una de las mejor caracterizadas es la procedente de *Trametes versicolor*, que además presenta gran similitud con las cristalizadas a partir de *Coprinus cinereus* y *Pycnoporus cinnabarinus* (Antorini et al., 2002).

Las lacasas son glicoproteínas monoméricas, diméricas o tetraméricas, en las que cada monómero contiene un sitio activo, el cual consta de 4 átomos de cobre. Estos átomos de cobre se distribuyen en diferentes sitios de unión y se clasifican en tres tipos, de acuerdo a su especificidad espectroscópica y a sus características funcionales: tipo 1 (T1) o azul, tipo 2 (T2) o normal y tipo 3 (T3) o sitio binuclear cúprico, donde dos átomos de cobre están acoplados antiferromagnéticamente. El sitio de cobre T1 contiene un catión Cu<sup>2+</sup> que confiere el color azul a la enzima, debido a su absorbancia a 600 nm ( $\varepsilon$  = 5000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), además está coordinado con dos histidinas, una cisteína y una metionina como ligandos. El sitio de cobre T2 consta de un catión Cu<sup>2+</sup> y no confiere ningún color, pero es detectable por resonancia paramagnética electrónica (EPR) y está ligado por dos histidinas y agua. Sin embargo, los dos cationes Cu<sup>2+</sup> del sitio de cobre T3 no son detectables por EPR, debido a su fuerte acoplamiento antiferromagnético mantenido por un puente hidroxilo y las 3 histidinas que coordinan los átomos. Los cobres T2 y T3 forman una agrupación trinuclear, que lleva a cabo la reducción de oxígeno a agua. Dependiendo de la estructura y propiedades de los centros de cobre, las lacasas se dividen en lacasas de potencial redox alto y bajo. Las lacasas de basidiomicetos (especialmente las del hongo blanco) son lacasas de alto potencial redox, mientras que las lacasas procedentes de bacterias y plantas son ejemplos de lacasas de bajo potencial redox (Dwivedi et al., 2011).

Además, podemos encontrar otro tipo de lacasas, denominadas lacasas "amarillas" o "blancas", que se diferencian en su sitio activo, ya que éste carece del cobre T1. En el caso de la lacasa "blanca" de *Pleurotus ostreatus*, su sitio activo está formado por 1 átomo de cobre, 1 átomo de hierro y 2 átomos de zinc (Palmieri et al., 2003), mientras que en *Panus tirinus* se puede encontrar una lacasa "amarilla", cuyo átomo de cobre T1 (Cu<sup>+</sup>) no está oxidado cuando la enzima se encuentra en reposo (Leontievsky et al., 1997), demostrando la aparición de los cuatro átomos de cobre en ambas isoenzimas (azul y blanca) procedentes de una misma especie (Dwivedi et al., 2011; Leontievsky et al., 1997).

### 1.2.3.1 Estructura tridimensional

La estructura tridimensional de lacasa (Figura 1.2) se compone de tres dominios, con estructuras en lámina  $\beta$  en cada uno de ellos (Piontek et al., 2002).



### FIGURA 1.2

Lacasa de *T. versicolor*. Los dominios están representados en distintos colores, mientras que los átomos de Cu aparecen como esferas azules. (Piontek et al., 2002).

Lacasa de T. versicolor fue cristalizada en su forma activa, comprobándose que conservaba los cuatro átomos de cobre, así como los siete grupos funcionales Nacetilglucosamina en los cuatro sitios de N-glicosilación tras el proceso de cristalización. Se trata de un monómero, organizado en 3 dominios y con unas dimensiones de 65x55x45 Å. Cada uno de los dominios tiene una estructura similar de barril- $\beta$ , relacionada con las proteínas cúpricas azules pequeñas, como la azurina o la plastocianina. El dominio 1 comprende dos láminas- $\beta$  de cuatro hebras. El segundo dominio presenta una lámina- $\beta$  de seis hebras y una de cinco hebras. Una hélice entre los dominios 2 y 3 forma un lazo de 40 residuos aminoacídicos de extensión. Finalmente, el dominio 3 está formado por un barril- $\beta$ , compuesto por dos láminas- $\beta$  de cinco hebras y una de dos hebras que, conjuntamente con una hélice- $\alpha$  y un giro- $\beta$ , forman la cavidad en la que se localiza el cobre T1. La agrupación trinuclear T2/T3 está incrustada entre los dominios 1 y 3, donde estos dominios aportan residuos aminoacídicos para la coordinación de los cobres. El tercer dominio tiene un contenido helicoidal mayor, con dos hélices- $\alpha$  localizadas en las regiones que conectan las hebras de las diferentes láminas-β. Por último, en el extremo C-terminal del dominio 3, tres hélices-α secuenciales completan el complejo. Aparece una hélice-α de 13 residuos aminoacídicos en la porción C-terminal, estabilizada por un puente disulfuro que sirve de unión con el dominio 1, mientras que otro puente disulfuro conecta los dominios 1 y 2. Ambos extremos aminoacídicos, N-terminal y C-terminal, contribuyen a

la formación de puentes de hidrógeno en el resto de la proteína, aportando rigidez suficiente para dar lugar a la excelente densidad electrónica, que se observa en la estructura cristalina. La comparación de dominios individuales con estructuras de proteínas cúpricas azules, muestra que presentan esencialmente la misma topología.

La distribución de la superficie de potencial electrostático de la lacasa de *T. versicolor* revela una carga mayoritariamente negativa, lo que se confirma con su pl ácido en torno a pH 3.5. A partir de la estructura cristalina del complejo enzimasustrato, se sabe que el sustrato se une por una pequeña cavidad cargada negativamente cercana al cobre T1. Las cargas negativas localizadas en este sitio pueden tener una importante funcionalidad, ya que pueden estabilizar los productos catiónicos que se forman durante el ciclo catalítico.



#### FIGURA 1.3

Lacasa de *T. versicolor* mostrando los dos canales que dan acceso a la agrupación T2/T3. Las moléculas de agua están representado como esferas rojas y los iones de cobre como esferas azules. (Piontek et al., 2002).

El sitio de reducción del oxígeno en la agrupación trinuclear T2/T3 es accesible para los disolventes, a través de dos canales que llevan a los sitios T3 y T2, respectivamente (Figura 1.3). En estos canales aparecen moléculas de agua que forman numerosos puentes de hidrógeno con residuos aminoacídicos cercanos. La comparación de la lacasa de *T. versicolor* con la de *C. cinereus* y con la ascorbato oxidasa, muestra que estas moléculas de agua y los aminoácidos que forman los canales están muy conservados. Se ha propuesto un mecanismo de reacción de tipo

Ping-Pong Bi Bi, por el cual los productos son liberados antes de la unión de nuevos sustratos. Parece que los canales de las oxidasas cúpricas azules permiten el acceso rápido de las moléculas de oxígeno al centro trinuclear y, posteriormente, la fácil liberación de las moléculas de agua.

La agrupación trinuclear T2/T3 de lacasa se encuentra situada entre los dominios 1 y 3, a una profundidad de unos 12 Å. Los tres cobres están organizados en un triángulo casi perfecto, con una distancia media de 3.85 Å. Entre los dos cobres T3 hay una unión con una molécula de oxígeno, OH<sup>-</sup> u O<sup>2-</sup>, que se coordina con los cobres T2 y T3. Un total de seis histidinas coordinan los dos cobres T3 de forma simétrica.



#### FIGURA 1.4

Sitio de cobre T1 de lacasa de T. versicolor. El cobre está representado como una esfera azul. Los residuos aminoacídicos que se unen al cobre, así como la Phe-463 de la posición axial se hallan resaltados. (Piontek et al., 2002).

El cobre T1 se encuentra insertado en el dominio 3 (Figura 1.4), a una profundidad de 6.5 Å, ocupando la depresión que aparece en la superficie de la enzima, delimitada por un giro- $\beta$ , perteneciente al dominio 1, y dos giros- $\beta$  del dominio 3, que están implicados en la unión a sustrato. Por tanto, es lógico pensar que el cobre T1 es el primer sitio aceptor de electrones. El T1 está conectado a la agrupación trinuclear T2/T3 por medio de un tripéptido His-Cys-His, que está muy conservado en las oxidasas multicúpricas azules (Piontek et al., 2002).

## 1.2.4 Propiedades catalíticas de lacasa

### 1.2.4.1 Selectividad de sustrato

Lacasa cataliza la oxidación de una amplia gama de sustratos como son monofenoles, orto- y para-difenoles, aminofenoles, metoxifenoles, polifenoles, poliaminas, ligninas, aril diaminas e, incluso, algunos iones inorgánicos, siendo siringaldacina el sustrato considerado más específico para lacasa (Baldrian, 2006; Xu, 1996; Xu et al., 1996). Una determinación menos ambigua de la actividad lacasa es aquella que se basa en la purificación de la proteína hasta homogeneidad electroforética, seguida de la determinación de K<sub>M</sub> y k<sub>cat</sub> con múltiples sustratos. Idealmente, este proceso debería incluir diversos sustratos y, entre ellos, siringaldacina, ABTS o catecol, para los que lacasa presenta alta afinidad.

Los sustratos (Figura 1.5) son oxidados por el cobre T1 y los electrones obtenidos son transferidos, probablemente a través de un motivo tripeptídico His-Cys-His muy conservado, a la agrupación trinuclear T2/T3, donde se utilizan para reducir la molécula de oxígeno a agua, al tiempo que éste provoca la reoxidación de los cuatro cationes cobre hasta su estado nativo de Cu<sup>2+</sup> (Solomon et al., 1996).



FIGURA 1.5

**Modelo de la agrupación catalítica de lacasa de** *T. versicolor.* El sitio T1 es el lugar donde tiene lugar la oxidación del sustrato. T2 y T3 forman la agrupación trinuclear donde se lleva a cabo la reducción del oxígeno molecular y la liberación de agua. (Riva, 2006).

El balance final del ciclo catalítico es la reducción de una molécula de oxígeno, para dar dos moléculas de agua, como resultado de la oxidación de cuatro moléculas de sustrato que producen cuatro radicales (Figura 1.6). Estos radicales son intermedios reactivos inestables que pueden experimentar una posterior oxidación catalizada por lacasa (por ejemplo la formación de quinonas a partir de compuestos fenólicos) o reacciones no enzimáticas como hidratación, desproporción o polimerización (Xu, 1999).



#### FIGURA 1.6

**Representación esquemática del ciclo catalítico de lacasa**, produciendo dos moléculas de agua a partir de la reducción de una molécula de oxígeno molecular, y la oxidación de cuatro moléculas de sustrato a los radicales correspondientes. (Riva, 2006).

La preferencia por los sustratos está determinada por el potencial redox ( $E_0$ ) de la enzima. Basándose en el potencial redox de sitio T1 las lacasas se pueden clasificar en alto, medio o bajo potencial (Morozova et al., 2007). Los potenciales redox se encuentran entre 450-480 mV en *Myceliophthora thermophila* (potencial redox medio) y 430 mV en *Rhus vernicifera* (bajo potencial redox) y en torno a 780 mV para *Trametes villosa* o *Trametes versicolor* (alto potencial redox). La variabilidad encontrada en el  $E_0$  de distintas lacasas se relacionó con el tipo de coordinación del cobre T1 (Xu et al., 1999), pero posteriormente ha sido establecida una relación entre la longitud del enlace Cu-N y el potencial redox, mostrando que un incremento de la longitud del enlace afecta al potencial, por una menor contribución del par de electrones libres del átomo de nitrógeno (Morozova et al., 2007; Piontek et al., 2002).

### 1.2.4.2 Mediadores

Lacasa juega un papel muy importante en la biodegradación de lignina, pero se encuentra restringida a actuar sobre ciertos sustratos, debido a su escasa afinidad y/o

bajo potencial de oxidación. Para solventar este problema se hace uso de los mediadores redox o Sistemas Mediadores de Lacasa (LMS, *Laccase Mediator Systems*), que aumentan la capacidad de oxidación de sustratos por lacasa, ampliando el rango de actuación a compuestos lígnicos y otros sustratos no fenólicos. El sistema LMS fue desarrollado inicialmente para solventar problemas de blanqueamiento de la pulpa de la madera, usando ABTS como mediador. El mecanismo de reacción de lacasa con mediador es el siguiente: lacasa oxida el mediador en presencia de oxígeno; el mediador oxidado tiene un alto potencial de oxidación que le permite oxidar al compuesto de interés, reduciéndose él mismo y regenerándose el mediador para siguientes ciclos de oxidación enzimática+química (Madhavi y Lele, 2009).

### 1.2.4.3 Regulación

El pH óptimo de lacasa es altamente dependiente del sustrato. En fenoles, se observa que el pH óptimo puede variar entre 3 y 7 para lacasas fúngicas, e incluso llegar a 9 para lacasas procedentes de plantas. Cuando se usa ABTS como sustrato, se ha comprobado que el valor de pH óptimo es más ácido, encontrándose en el rango de 3 a 5 (Heinzkill et al., 1998). La diferencia de potencial redox entre el sustrato fenólico y el cobre de tipo T1, podría incrementar la oxidación de sustratos a altos valores de pH. Pero debido a la unión de aniones hidróxido a la agrupación trinuclear T2/T3, da lugar a una inhibición de la actividad lacasa, por interrupción de la transferencia interna de electrones entre T1 y T2/T3. Estos dos factores contrapuestos juegan un papel muy importante en la determinación del pH óptimo (Xu, 1997). Aunque fueron Palmieri y colaboradores quienes descubrieron que el cobre del sitio T1 se encuentra ausente de la actividad lacasa, cuando el pH es próximo a un valor neutro (Madhavi y Lele, 2009; Palmieri et al., 1997). La estabilidad de las lacasas fúngicas es generalmente superior a pH ácido, aunque existen excepciones.

El comportamiento de lacasa frente a distintas temperaturas es muy similar al de otras enzimas ligninolíticas extracelulares, presentando un óptimo entre 50 y 70 °C, aunque se han descrito algunas lacasas con temperatura óptima por debajo de 35 °C, como es el caso de la procedente de *Ganoderma lucidum*, cuyo óptimo aparece a 25 °C, y es estable entre 10 y 50 °C, durante 4 horas (Ko et al., 2001). De cualquier modo, no existe relación entre la temperatura óptima de lacasa y la óptima para el crecimiento del hongo. La estabilidad térmica puede variar considerablemente. La vida media a 50 °C varía desde minutos para la lacasa procedente de *Botrytis cinerea*, hasta 50-70 horas en *Trametes* sp. Mientras que la enzima de *G. lucidum* es

inactivada inmediatamente a 60 °C, la lacasa de *Melanocarpus albomyces* presenta una vida media superior a 5 horas, lo que la hace muy interesante por su potencial uso en aplicaciones biotecnológicas (Baldrian, 2006). Fueron Farnet y colaboradores quienes observaron que la preincubación de estas enzimas a una temperatura entre 40 y 50 °C, incrementa de forma considerable la actividad lacasa (Farnet et al., 2000; Madhavi y Lele, 2009).

## 1.2.4.4 Inhibidores

Se han descrito numerosos compuestos inhibidores de lacasa (Baldrian, 2006). Además de los inhibidores de metalo-oxidasas como cianuro, azida o flúor, hay diversos inhibidores selectivos de cada tipo de oxidasas. El monóxido de carbono, el 4-hexilresorcinol o el ácido salicilhidroxámico son ejemplos de inhibidores específicos de tirosinasa, pero no de lacasa, pudiendo diferenciar las medidas de actividad lacasa cuando no es posible la purificación de la enzima. La inhibición de lacasa por ditiocarbamato y ácido tioglicólico podrían deberse a la presencia de cobre en el sitio catalítico de la enzima, y algunos compuestos orgánicos con grupos sulfhidrilo han sido descritos como inhibidores de lacasa (ditiotreitol, ácido tioglicólico, cisteína y ácido dietilditiocarbámico). Sin embargo, ensayos realizados con lacasa de *Trametes versicolor*, demuestran que el efecto inhibidor de estos compuestos probablemente es debido a la metodología, usando ABTS como sustrato, y que estos compuestos, al contrario que en el caso de la azida, no disminuyen el consumo de oxígeno por parte de lacasa durante la catálisis.

Dada la abundancia de lacasas en el suelo, debe tenerse en cuenta la inhibición por metales pesados y sustancias húmicas. Mientras que algunas lacasas presentan gran sensibilidad ante metales pesados, otras, como la de *G. lucidum*, son completamente insensibles a ellos. En el complejo medio que supone el suelo o la descomposición del material lignocelulósico, hay numerosos sustratos de lacasa presentes normalmente que pueden competir por la oxidación y, por tanto, inhiben competitivamente la transformación de otros compuestos. De este modo, es difícil estimar la transformación de sustratos en el suelo, en base a los resultados de laboratorio, y los valores estimados pueden ser significativamente diferentes en cada suelo (Baldrian, 2006).

#### 1.2.4.5 Catálisis heterogénea

Para llevar a cabo reacciones catalizadas enzimáticamente en medios de reacción no convencionales, con codisolvente orgánico, se ha de tener en cuenta

aquellos factores primarios que controlan la actividad enzimática: (a) la distribución de agua, (b) las propiedades específicas de los disolventes (tales como hidrofobicidad, coeficiente de reparto y polaridad), y finalmente (c) la solvatación resultante, así como la distribución de reactivos y productos en el sistema (Wan et al., 2010).

El uso de codisolventes orgánicos es debido a la escasa solubilidad en agua de muchos sustratos de lacasa, generando un sistema con un contenido en agua restringido (Riva, 2006). De hecho, uno de los primero ejemplos descritos de catálisis enzimática en sistemas bifásicos agua-disolvente orgánico, fue la oxidación de  $\beta$ -estradiol disuelto en acetato de etilo, catalizada por una lacasa de *Polyporus versicolor* disuelta en tampón acetato. Asimismo, algunas de las aplicaciones sintéticas descritas son llevadas a cabo en presencia de codisolventes orgánicos miscibles en agua, en algunos casos en una proporción superior al 50%.

Se sabe que la presencia de codisolventes, particularmente aquellos que forman fases homogéneas con las disoluciones tamponadoras que contienen las enzimas, pueden afectar significativamente a la estructura, estabilidad y actividad de los biocatalizadores, por medio de interacciones directas con las moléculas proteicas o a través de la modificación termodinámica de la actividad del agua. El efecto de los diferentes codisolventes miscibles en agua sobre la actividad y estabilidad de lacasa, ha sido investigada por diferentes autores. Se ha determinado que la rapidez de la reacción se mantiene dentro del mismo orden de magnitud en disoluciones acuosas, sistemas de micelas inversas, y en presencia del 20-30% v/v de ciertos disolventes miscibles en agua restringido mediante micelas reversas, llevando a cabo la biotransformación de compuestos fenólicos y compuestos lígnicos, debido a que la enzima mantiene su estructural tridimensional (Ma et al., 2009; Michizoe et al., 2001).

Las lacasas también han sido usadas con éxito en disolventes orgánicos polares con un bajo contenido en agua, unidas a polímeros alquilados anfifílicos o inmovilizadas en soportes sólidos. En el caso de lacasa inmovilizada, la naturaleza del disolvente orgánico tiene una influencia significativa en la proporción relativa de los dímeros obtenidos por oxidación de tetrahidro-2-naftol (Riva, 2006).

## 1.2.5 Aplicaciones biotecnológicas de lacasa

Lacasa es una enzima que atrae gran atención debido a su vasto rango de aplicaciones, tales como deslignificación de compuestos lignocelulósicos,

entrecruzamiento de polisacáridos, biorremediación, biotransformación de tintes textiles, en la industria alimentaria, aplicaciones dentro del cuidado personal y sanitario, síntesis química y el desarrollo de biosensores y nuevas aplicaciones analíticas.

#### 1.2.5.1 Industria del papel

La fabricación del papel parte principalmente de la madera, pero también de otras materias vegetales. La madera esta constituida en una estructura multicapa y requiere de la separación de los constituyentes, celulosa, hemicelulosa y lignina. La lignina es el constituyente que actúa como unión de las diferentes fibras. Este proceso de separación, deslignificación, se ha realizado tradicionalmente mediante dos procesos bien diferenciados. Un proceso químico, genera residuos tóxicos, su rendimiento es menor del 50% y tiene un alto coste. Y un proceso mecánico, éste es más barato que el químico debido a su rendimiento de aproximadamente el 95 %, pero la calidad del papel es baja debido a su alto contenido en lignina que resta flexibilidad a las fibras, tiene menos resistencia, y amarillea con la exposición a la luz solar, además de un elevado consumo energético. La búsqueda de procesos alternativos se orientó hacia el tratamiento biológico, debido a que de forma natural la madera y otras materias vegetales son degradadas. El efecto del tratamiento biológico combinado con el tratamiento mecánico, ha dado muy buenos resultados al reducir los requerimientos energéticos en un 47 %, e incrementar la resistencia hasta un 80 %. La lignina residual es la principal causa del color remanente de la pulpa, por ello se requiere un proceso de blanqueo. Los métodos tradicionales conllevan el uso de agentes oxidantes tales como CIO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, y aunque su eficiencia es alta, conlleva algunos inconvenientes como productos de reacción clorados (contaminantes) y pérdida de resistencia. Lacasa juega un papel relevante en el blanqueo del papel. Ésta actúa sobre pequeños fragmentos de lignina en sus grupos fenólicos generando su degradación. El uso de mediadores con lacasa proporciona importantes ventajas en el proceso de degradación (Call y Mucke, 1997; Madhavi y Lele, 2009).

Además, la enzima presenta la propiedad de generar radicales libres, lo que tiene una gran utilidad para modificar fibras de la lignina, así como para formar enlaces entre distintas fibras, actuando como adhesivo y evitando el uso de adhesivos sintéticos de carácter tóxico (Rodriguez Couto y Toca Herrera, 2006).

Otra posible aplicación es el uso de lacasa para mejorar las propiedades químicas o físicas de las fibras resultantes.

#### 1.2.5.2 Biorremediación

Lacasa es bien conocida por su aplicación en la eliminación de compuestos tóxicos, a través de reacciones enzimáticas acopladas, dando lugar a compuestos insolubles de compleja estructura. Además, lacasa tiene la ventaja de actuar sobre gran número de compuestos fenólicos y no fenólicos. Éstas dos características la hacen de gran utilidad para el tratamiento de aguas residuales, provenientes de distintos sectores como son la industria del carbón, el refinado del petróleo, química fina o la producción de aceites de oliva. Este último caso supone un problema medioambiental en el área del Mar Mediterráneo. Estos efluentes de la industria del aceite de oliva tienen un contenido en compuestos fenólicos, con una estructura similar a la lignina, de ahí que sea de difícil tratamiento. El uso de lacasa inmovilizada permite reducir la concentración inicial de compuestos fenólicos (hasta un 78 %), así como en la decoloración del efluente, y por tanto disminuyendo el carácter fitotóxico del vertido (Dwivedi et al., 2011; Minussi et al., 2002).

Otros compuestos a degradar son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), formados por anillos bencénicos simples condensados de forma lineal, angular o en grupo. Estos compuestos son contaminantes medioambientales ubicuos encontrados en suelo, agua y aire. La mayoría de ellos son tóxicos para los microorganismos, y muchos de ellos son metabolitos mutagénicos y carcinogénicos para humanos. Estos compuestos se encuentran en diferentes tipos de suelos así como de sedimentos, y son de difícil biodegradación, lo que conlleva que se encuentren altos niveles de PAHs. Existen estudios para la biodegradación de estos compuestos, pero su baja solubilidad en agua y su persistencia a la biodegradación, los hacen unos de los contaminantes más peligrosos (Levin et al., 2003). La actual tendencia es el uso de enzimas ligninolíticas procedentes del hongo de la podredumbre blanca, para oxidar los PAHs a sus quinonas correspondientes, y posteriormente degradarlos a CO<sub>2</sub>. Lacasa de Trametes versicolor oxida la mayoría de los 16 PAHs listados por la US EPA como principales contaminantes químicos. Benzopireno y el perileno son parcialmente convertidos a productos poliméricos. Pequeñas cantidades de quinonas y cetonas son los principales productos de oxidación de antraceno, benzopireno, y fluoreno. Lacasa en combinación con 1hidroxibenzotriazol (HBT) oxida acenafteno y acenaftileno a 1,2-acenaftenodiona y ácido 1,8-naftalico. Lacasa purificada de Trametes versicolor ha mostrado ser capaz de oxidar PAH de entre 3 y 5 anillos mediante un sistema LMS usando HBT y ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) como mediadores (Madhavi y Lele, 2009). Lacasa también es capaz de mediar la unión de metabolitos reducidos de

2,4,6-trinitrotoulueno (TNT) a una matriz orgánica, eliminando estos contaminantes (Rodriguez Couto y Toca Herrera, 2006).

### 1.2.5.3 Colorantes e Industria textil

El uso de colorantes está ampliamente implantado en la sociedad actual, se conocen alrededor de 100000 tintes y pigmentos, con una producción anual de 800000 toneladas. Estos tintes se caracterizan por ser muy estables frente a la radiación solar, la temperatura, al ataque microbiano, siendo algunos de ellos cancerígenos como la bencidina, por lo cual se consideran contaminantes recalcitrantes. Los efluentes de las industrias de producción así como de consumo son tóxicos, y se caracterizan por tener una elevada demanda de oxígeno tanto química como biológica, sólidos en suspensión y un color intenso.

Existen tratamientos químicos y físicos para los efluentes de las industrias, pero tienen inconvenientes como un alto coste y problemas operacionales. Se han desarrollado, por tanto, métodos biológicos. Entre ellos, sistemas anaerobios que dan lugar a efluentes no coloreados, pero generan aminas aromáticas, compuestos más tóxicos que los de partida. Además, sistemas aerobios, cuyo principal inconveniente es la adaptación de una bacteria a un solo tinte. Por ello, los hongos ligninolíticos aparecen como alternativa debido a su potencial para la oxidación de diferentes tipos de tintes. Lacasa juega un papel fundamental en este terreno debido a su capacidad de oxidación de compuestos fenólicos y no fenólicos, y el uso de mediadores que amplían el rango de sustratos a degradar por lacasa (Madhavi y Lele, 2009; Rodriguez Couto y Toca Herrera, 2006).

Lacasa también tiene uso en la industria textil en la mejora de la blancura del algodón, así como en el biodesgaste de la tela vaquera (Tzanov et al., 2003). La aplicación de enzima lacasa aporta ventajas a la industria textil en ahorro energético, menor consumo de compuestos químicos, y una reducción del consumo de agua. Lacasa se utilizó para remplazar la carga de piedra pómez que generaba un desgaste de la tela vaquera, produciendo una sensación de envejecimiento del vaquero (Pazarlioglu et al., 2005). Recientemente, se ha publicado el uso de lacasa de *Stenotrophomonas matophilia* para la degradación de tintes sintéticos (Galai et al., 2009).

Lacasa tiene potenciales aplicaciones como su uso en lavavajillas (Kirk et al., 2002), en la eliminación de olores de tejidos, incluyendo ropa, tapizado del sofá, cortinas, o en detergentes para eliminar el olor procedente del lavado de la ropa. El uso de lacasa más mediador, ha sido usado para incrementar la resistencia de la lana

al encogimiento (Dwivedi et al., 2011). Polímeros sintetizados por lacasa han sido usado como potenciales aplicaciones para el desarrollo de materiales bioactivos, y como nuevos colorantes textiles (Kim et al., 2008; Uyama y Kobayashi, 2006). Lacasa también cataliza la inserción de moléculas funcionales en lana y celulosa, con el fin de añadir nuevas propiedades a las fibras (Elegir et al., 2008; Fackler et al., 2008; Kudanga et al., 2008).

### 1.2.5.4 Cuidado personal y sanitario

La decoloración así como el tinte del cabello, se lleva a cabo con productos que contienen compuestos agresivos que pueden dañar el cabello. Por ello, el uso de lacasa para llevar a cabo la oxidación del precursor del colorante, puede ser una alternativa frente a esos compuestos agresivos para el cuero cabelludo, además de trabajar en unas condiciones más suaves (en términos de pH y disolventes). Pigmentos usados en cosmética como melaninas pueden ser producidos usando la capacidad oxidativa de lacasa. Y justo a la inversa, lacasa también toma importancia en cosmética, al ser capaz de oxidar compuestos derivados de melaninas, eliminando las manchas de la piel que se producen por la exposición al sol (Alcalde, 2007; Rodriguez Couto y Toca Herrera, 2006).

Compuestos como sulfuros, tioles, amonio, aminas, ácidos grasos de cadena corta y otros compuestos orgánicos volátiles, son los responsables del mal olor corporal, doméstico e industrial. Debido a la capacidad para oxidar varios tioles y otros compuestos de azufre, la aplicación de lacasa en desodorantes ha sido tema de estudio e interés (Madhavi y Lele, 2009).

En el ámbito sanitario (Dwivedi et al., 2011), lacasa toma relevancia al ser capaz de sintetizar complejos fármacos por oxidación fenólica y otras oxidaciones acopladas (Camarillo y Rincon, 2011; Mikolasch et al., 2008), tales como, triazol (benzo) cicloalquil tiadiazinas (un grupo de anti-inflamatorios, agentes analgésicos, etc.), vinblastina (un citostático, agente antitumoral), mitomicina, dímero de penicilina X, cefalosporinas, y un dímero de vindolina (para el tratamiento de enfermedades neoplásicas).

También se ha comprobado la importante actividad inhibidora de la transcriptasa inversa de VIH-1 (Wang y Ng, 2004).

La dermatitis de Poison Ivy, es causada principalmente por una toxina derivada del catecol, urushiol. Lacasa tiene la capacidad de oxidarlo y destoxificar. También se ha estudiado la aplicación de lacasa en muchas aplicaciones industriales, médicas y domesticas por esterilización y desinfección, al ser capaz de oxidar ioduro a iodo

(Dwivedi et al., 2011).

#### 1.2.5.5 Industria alimentaria

Dentro del ámbito alimentario lacasa tiene tres sectores de amplia aplicación:

Bebidas: una de las principales aplicaciones de lacasa en el sector bebidas es la estabilización del vino. El mosto y el vino son una mezcla compleja de diferentes compuestos químicos como etanol, ácidos orgánicos, sales y compuestos fenólicos. El alcohol y los ácidos orgánicos son los responsables del aroma del vino, mientras que el color y el gusto dependen de los compuestos fenólicos presentes. Durante el proceso de crianza en barricas de madera, se llevan a cabo una serie de complejas reacciones y oxidaciones que provocan una alteración del color, aroma y gusto del vino. Por ello, lacasa es usada para la oxidación selectiva de determinados polifenoles, que polimerizan y son eliminados mediante clarificación. El uso de lacasa en mosto da lugar a vinos con un buen aroma. Aunque el uso de lacasa como aditivo alimenticio no está permitido, sí se usa en la producción de vino en forma inmovilizada (Alcalde, 2007; Madhavi y Lele, 2009).

Zumos: uno de los principales problemas de la fabricación y almacenamiento de zumos, es el pardeamiento enzimático y químico que sufren. Varios tratamientos enzimáticos se han probado, incluido el uso de lacasa. Pero los resultados obtenidos son contradictorios. La combinación de ultrafiltración con el uso de lacasa es la alternativa más plausible, pues mejora la estabilidad del color y el sabor, comparada con métodos tradicionales con adición de ácido ascórbico y sulfitos (Madhavi y Lele, 2009; Minussi et al., 2002).

Panadería: en el sector panadero lacasa es de interés debido a su capacidad para entrelazar biopolímeros, mejorando la textura, el volumen, la estabilidad y la resistencia, y disminuyendo la adherencia de la masa. Lacasa es utilizada como aditivo en la producción de productos de panadería, ejerciendo un efecto oxidativo en los componentes de la masa, lo que mejora la resistencia del gluten. El uso de lacasa produce un aumento en el volumen, y mejora el aspecto esponjoso y la suavidad de los productos de panadería.

Recientemente, lacasa ha sido comercializada para la preparación de tapones de corcho, destinados a botellas de vino, en los que la enzima disminuye oxidativamente características derivadas de corchos defectuosos, como contaminación y astringencia, que se generan al envejecer el producto.

#### 1.2.5.5 Síntesis química

Los procesos de síntesis basados en lacasa tienen un claro potencial para la industria química fina. Los resultados obtenidos tienen gran interés en química y actualmente hay numerosos estudios centrados en el desarrollo de nuevas aplicaciones sintéticas.

Los sistemas mediadores de lacasa han sido aplicados para la oxidación de alcoholes bencílicos, arílicos, propargílicos y alifáticos a sus correspondientes aldehídos y cetonas, respectivamente (Riva, 2006).

La oxidación de grupos hidroxilo primarios de azúcares usando un sistema lacasa-TEMPO está descrita en una patente con la oxidación parcial de celulosa y otros polisacáridos. Más recientemente, una lacasa de *Trametes pubescens* ha sido usada en una investigación sistemática de la oxidación de mono-, di- y oligosacáridos. Los aldehídos intermedios para cada sustrato son oxidados posteriormente in situ a sus correspondientes glicopiranosiduronatos. Los mismos procedimientos han sido aplicados para la oxidación de la saponina glicosilada asiaticosido, y una serie de glicósidos naturales (Riva, 2006).

La oxidación de fenoles por sistemas mediadores de lacasa genera radicales intermedios que pueden dar lugar a reacciones de unión, llevando a la formación de dímeros, oligómeros y, finalmente, polímeros. Todos estos productos pueden ser de relevancia sintética.

La preparación enzimática de polifenoles poliméricos por la acción de oxidorreductasas, ha sido investigada en las últimas décadas como una alternativa viable y no tóxica, respecto a la producción química de estos materiales basada en formaldehído. Un ejemplo atípico de la explotación de lacasas en este campo es la preparación del "urushi artificial", que es un análogo de la laca oriental: resina natural producida por *Rhus vernicifera* mediante un proceso de polimerización (Riva, 2006) (Witayakran y Ragauskas, 2009).

Los radicales fenólicos llevan a una serie de reacciones de autoensamblaje para formar dímeros C-O y C-C antes de iniciarse las reacciones de oligomerización y polimerización. Este hecho fue utilizado para la producción de derivados, como dímeros de penicilina X o de bisfenol A (Riva, 2006; Witayakran y Ragauskas, 2009).

Finalmente, las lacasas han sido propuestas para su utilización en la desprotección oxidativa y en la producción de polímeros compuestos y agentes médicos. Recientemente, ha sido aplicada en la síntesis de colorantes fenólicos (Mustafa et al., 2005).

#### 1.2.5.6 Análisis químico

En este campo podemos encontrar aplicaciones en la detección de numerosos compuestos, destacando algunos recientes ejemplos.

En la producción de zumos, la oxidación excesiva de fenoles se considera muy perjudicial, ya que provoca una disminución en las propiedades organolépticas del producto. Por tanto, es de un interés especial la evaluación del contenido en fenoles en estas bebidas, para lo cual se han desarrollado dos ensayos enzimáticos basados en lacasa de *Trametes versicolor* (Minussi et al., 2002).

Otro ejemplo es el nuevo método enzimático basado en lacasa, desarrollado para distinguir la morfina de la codeína, al inyectar las muestras en un sistema de flujo detenido. El sensor enzimático fue diseñado con lacasa y glucosa deshidrogenasa inmovilizadas en un electrodo de Clark para oxígeno. La morfina es oxidada por lacasa con consumo de oxígeno y es regenerada por la glucosa deshidrogenasa. Sin embargo, lacasa no puede oxidar la codeína, por lo que el detector es selectivo para morfina, que puede detectarse en concentraciones de 32 nM a 100 µM (Mayer y Staples, 2002).

Asimismo, se ha diseñado un sistema de lacasa inmovilizada sobre pasta de carbón, para la detección de catecolaminas. Lacasa cataliza la oxidación de adrenalina o dopamina a adrenoquinona o dopaminoquinona, respectivamente; estas quinonas son reducidas electroquímicamente a las correspondientes catecolaminas, con un potencial de -174 mV (adrenoquinona) y 238 mV (dopaminoquinona), siendo las corrientes catódicas resultantes directamente proporcionales a la concentración de cada catecolamina en la muestra. Este biosensor supone un método fiable, simple, rápido y barato (Leite et al., 2003).

Lacasa también está envuelta en el desarrollo de biosensores para la detección de fenoles, anilinas, oxígeno y otras sustancias. También se estudia la aplicación de lacasa para ensayos inmunoquímicos (Dwivedi et al., 2011; Madhavi y Lele, 2009).

## **1.3 COLORANTES**

Diversas sustancias son utilizadas actualmente para dar color a una gran variedad de compuestos. Los tintes se dividen en dos grupos, los colorantes y los pigmentos solubles e insolubles en agua respectivamente. Los colorantes son compuestos aromáticos complejos que están constituidos por tres grupos funcionales, el cromóforo que es el responsable de producir el color mediante absorción de la luz, el auxocromo que aumenta la afinidad del colorante hacia la fibra e intensifica el color, y el solubilizador, ión que le da afinidad hacia disolventes como por ejemplo -SO<sub>3</sub>Na, - ONa, -NH<sub>2</sub>·HCI, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (Marcano, 1990; Salleh et al., 2011).

La importancia de los colorantes en la civilización es evidente y está bien documentada. En 1856 se fabricó el primer colorante sintético y desde entonces el uso de colorantes industriales y en hogares se incrementó considerablemente (Husain, 2010). Unos 10000 colorantes y pigmentos diferentes se usan industrialmente, representando un consumo mundial anual de unas 100.000 toneladas, consumiéndose sólo en Brasil 26.500 toneladas (de Souza et al., 2007). Los colorantes son muy utilizados en muchos campos de tecnología actual, como en algunas ramas de la industria textil, industrias de curtido de pieles, en producción de papel, en industria alimentaria, en células fotovoltaicas, en investigación agrícola, en tintes de pelo, en control de aguas residuales y tratamiento de aguas, para la determinación de la superficie específica de fangos activos, y para el trazado de aguas subterráneas, (Forgacs et al., 2004). De toda esta actividad industrial, se ha calculado que hasta 50000 toneladas de los mismos pueden ser liberados al medio ambiente cada año, y dependiendo del tipo de colorante puede variar de un 2 a un 50 % del mismo (Janaki et al., 2012).

Gran parte de los colorantes son carcinogénicos, mutagénicos y tienen efectos crónicos graves en los organismos expuestos ((Mohan et al., 2005; Moya et al., 2010). Además, son visibles al ojo humano, estableciéndose el límite de visibilidad en 0.005 mg/l (Champagne y Ramsay, 2010), generando no sólo contaminación estética incluso a concentraciones bajas (Shakeri y Shoda, 2010), sino también ecotoxicidad debido a que el color absorbe y refleja la luz solar, lo que puede alterar y destruir el ecosistema acuático, al no permitir realizar la fotosíntesis acuática ,produciendo así el fenómeno de eutrofización con una gran carga orgánica en el agua (He et al., 2008). Los colorantes también alteran la solubilidad de los gases (Moya et al., 2010)y la transferencia de oxígeno (Siddique et al., 2009). La contaminación por colorantes

(Siddique et al., 2009) puede presentar un riesgo para nuestra salud, por bioacumulación y entrada en la cadena alimentaria. La toxicidad de los colorantes se ha establecido a niveles tan bajos como 5.2 mg/L.

Su complejidad estructural hacen que las plantas de tratamiento convencionales no sean capaces de eliminarlos, razón por la cual se han venido vertiendo sin tratarlos (Alatorre, 2006).

En 1974 se formó la Asociación Toxicológica y Ecológica de la Industria Manufacturera de Colorantes (ETAD), para minimizar el daño medioambiental, proteger a los usuarios y consumidores, y cooperar fuertemente con gobiernos y con el público preocupado por el impacto toxicológico en sus productos. Sobre el 90% de 4000 colorantes testados en ETAD, tenían el valor LD50 mayor de 2x10<sup>3</sup> mg/kg. Los valores de toxicidad mayor se encontraron en colorantes básicos y diazo (Robinson et al., 2001). Así, las leyes internacionales medioambientales se están volviendo más exigentes (ISO 14001, Octubre 1996) (F. M. de Urzedo et al., 2007), y en ciertos países como Canadá está prohibido verter colorantes a las aguas residuales municipales (Champagne y Ramsay, 2007). Por tanto, se deben desarrollar nuevas líneas de tecnología limpia, unos servicios seguros de tintado, y mejoras del enlace del tinte a la fibra (Husain, 2010). Además, las nuevas regulaciones de EU sobre vertidos peligrosos, fuerzan a la necesidad de encontrar técnicas innovadoras, ecológicas y respetuosas con el medio ambiente, para prevenir el daño de estos contaminantes (Michniewicz et al., 2008).

Muchos colorantes son difíciles de degradar debido a las estructuras complejas que tienen y a su origen sintético. Hay muchas variedades estructurales que se recogen principalmente en tres tipos, las catiónicas, aniónicas y no iónicas. Las catiónicas corresponden a colorantes básicos, muy utilizados en la industria textil. Se basan en distintas estructuras químicas con sustituyentes aromáticos, que dependen de un ion positivo (Salleh et al., 2011). Este grupo de colorantes causa efectos dañinos como náuseas, hemorragias, dermatitis, irritación de la piel, mutaciones y cáncer (Eren et al., 2007). Algunos de estos colorantes son el violeta cristal, azul de metileno, Basic Red y Basic Blue 41. Un 2% de los colorantes básicos pueden aparecer en efluentes industriales.

En las aniónicas y no iónicas, los cromóforos son mayormente grupos azo o antraquinónicos Los compuestos azo, dado su naturaleza con hendiduras reductoras, forman aminas tóxicas en los efluentes. Los colorantes antraquinónicos son muy persistentes en el medio, debido al carácter rígido de sus estructuras aromáticas (Siddique et al., 2011b). Las variedades aniónicas dependen de un ion negativo e

incluyen numerosos compuestos, que exhiben características diferentes en estructura y se dividen en las directas, acídicas y reactivas (Salleh et al., 2011). Las reactivas, están compuestas por enlaces azo (N=N) principalmente unidos a un grupo reactivo, que puede ser vinylsulfona, clorotriazina, tricloropirimidina, difluorocloropirimidina, etc (Siddique et al., 2011b). Los colorantes reactivos son inicialmente absorbidos, y luego se enlazan covalentemente por un enlace éter a la fibra (como el algodón), a través del grupo reactivo. Son la principal clase de colorantes utilizados en la industria (alrededor del 60%), y se utilizan sobre todo en la industria textil, pues tienen una serie de características favorables a otros colorantes, como que reaccionan muy bien con las fibras, su color es estable (Guimaraes et al., 2012), pueden ser brillantes, se aplican fácilmente con bajas necesidades energéticas (Aksu y Tezer, 2000; Juang et al., 1997), tienen mayor estabilidad fotolítica y mayor estabilidad a la degradación microbiana (Murugesan et al., 2007). Todas estas características beneficiosas los hacen perjudiciales a la hora de intentar degradarlos, pues son los más resistentes a eliminar, y al ser solubles en agua puede haber pérdidas hacia los efluentes (Asgher, 2012). Además, en los baños donde se añaden los colorantes, suelen haber iones hidroxilo que pueden competir con el sustrato celulósico a tintar, los cuales hidrolizan al colorante y por tanto ya no reaccionan con las fibras, resultando que hasta un 50% del colorante puede quedarse en las aguas de teñido (Janaki et al., 2012). Por tanto, es de vital importancia su degradación en el medio acuoso tras la tinción. Los colorantes acídicos son también solubles en agua, y tienen un efecto dañino al ser ácidos orgánicos sulfónicos.(Attia et al., 2006). Ejemplos de colorantes aniónicos son el Indigo Carmín, Remazol Brilliant Blue Royal, Naranja de metilo, Reactive Yellow IV entre otros. Por último, las variedades no iónicas son colorantes dispersos, porque no se ionizan en el medio acuoso.

Dentro de todos los colorantes, se va a estudiar la degradación del Remazol Brilliant Blue Royal y del Indigo Carmín, dos colorantes del tipo aniónico, antraquinónico e indigoide respectivamente.

# 1.3.1 Índigo Carmin

Índigo Carmín (IC) es uno de los colorantes más antiguos que se conocen y más importantes industrialmente (Flox et al., 2006). Es colorante azul usado tradicionalmente en la tinción de la tela vaquera o *denim*, cuya producción ha ido en aumento desde su descubrimiento. El *denim* o mezclilla es un tejido empleado en la confección de ropa de trabajo. Aunque no hay unanimidad sobre el origen, diversos estudios señalan que surgió en Europa, en la Edad Media. En 1853 Levi Strauss,

comerciante de San Francisco, pensó en utilizar las lonas que se usaban en la fabricación de tiendas de campaña, para hacer ropas de trabajo a los mineros, que resistieran la vida a la intemperie y el peso en los bolsillos del mineral encontrado. Estos pantalones fueron rematados con refuerzos de cobre y eran todos del color marrón usado para las tiendas y sin bolsillos traseros. Poco después, los genoveses se encargaron de teñir la tela con otro pigmento azul, menos caro y más abundante, el Índigo, extraído de una leguminosa *Indigofera tinctoria* (Figura 1.1) procedente de Java y de la India, que finalmente fue patentado en 1873 por Strauss con su nombre. Originalmente, los pantalones vaqueros o *blue jeans* eran una prenda de trabajo, pero a partir de la década de 1950, se empezaron a imponer como prenda juvenil hasta la actualidad.



FIGURA 1.1

**Fotografía de Indigofera tinctoria.** Planta leguminosa fuente original del tinte índigo, de la familia de las Fabaceae.



FIGURA 1.2

**Estructura del Índigo Carmín** (Ácido 3,3´-dioxo-2,2´-bi-indolinyliden-5,5´-disulfónico o Acid Blue 74).

Desseián	Operaciónª	Concentración	Tiempo	Deferencia	
Reaccion		(μM)	(min)	Referencia	
	ACC Fe (III)	30		De Andrade (2012)	
	Sm <sub>2</sub> FeTaO <sub>7</sub>	21.44		Torres-Martínez (2012)	
	PbMnO <sub>4</sub>	(71 %)		Martínez-de la Cruz (2012)	
	TiO <sub>2</sub>			Montero-Ocampo (2012)	
	SiC-TiO <sub>2</sub>	4.29 (95 %)	30	Gómez-Solís (2012)	
	PbSnO <sub>2</sub>	42.89 (80 %)	<250	Borhade (2012)	
Entopotalítica	Resinas de SnO <sub>2</sub> -TiO <sub>2</sub>	3-30		Coelho (2011)	
Fulucalantica	P25 Degussa	97	150	Hachem (2001)	
	Electrodos finos Ti/TiO <sub>2</sub>	53.5 (70%)	15-20	Guaraldo (2011)	
	Nanopartículas WO <sub>3</sub>	214	5760	Sánchez-Martínez (2011)	
	Bentonita intercalada de 1,10- fenantrolina	214 (100%)	160	Bentouami (2010)	
	Nanoelectrodo Pt/n-Si/Ag	1 (90.8%)	210	Qu (2010)	
	TiO <sub>2</sub>	3	300	Vautier (2001)	
Adsorción	Membranas de nanofibra (PVA)/SiO <sub>2</sub> )	1.07*10 <sup>-3</sup>		Li (2012)	
	Delta-FeOOH nanopartículas (Fenton)	107	200	Pinto (2012)	
	Cenizas volantes de carbón quemado (Zeolita)	>6 (>84%)	>45	De Carvalho (2011)	
	Birnesita electrodepositada sobre SnO <sub>2</sub>	10.7-107 (60%)	1440	Zaied (2011)	
Oxidación	Electroquímico (apareado en dos celdas)	(75.5-94.8%)		(Chou et al., 2011)	
	Anódo (BDD) o Foto-Fenton	(100/63 %)	420/600	Hammami (2012)	
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Ioduro	0.153	60		
	Ozonación	0.086	10	Daimazio (2007)	
	Electro-Fenton	940 mM		Flox (2006)	
	Hipoclorito en medio acuoso	0.085*10 <sup>-3</sup> (100%)	3 min	(F. M. de Urzedo et al., 2007)	
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + catalizador (Metales de transición)			Gemeay (2003)	
Coagulación	Electrodeposición	53.6-214.4*10 <sup>-6</sup>		Secula (2011)	

 Tabla 1.3.1A

 Métodos para la degradación fisicoquímica de Índigo Carmín

(a) ACC Fe (III): autoclaved cellular concrete impregnated with Fe(III) ions; (PVA)/SiO(2): thiol-functionalized polyvinyl alcohol; BDD: Boron doped diamond.

Tipos	Operaciónª	Concentracion	Tiempo	Referencia
11005	opolación	(µM)	(min)	Referencia
Microbianos	Fungus Pleatus Ostreatus	(0.107-0.0107) *10 <sup>-3</sup> (43-64%)		Kahraman (2012)
	Myrothecium verrucaria 3.2190 (Bilirrubina Oxidasa)	107 (98 %)	10000	Han (2012)
	Lacasa en esporas Bacillus licheniformis LS04	53.6 (80%)	60	Lu (2012)
	Desecho de tallos de uva (Trametes Stereum hirsutum y Coriolus antarcticus)	(93%)	5	Levin (2012)
	Cadena(WRF-1) de cáscara de cacahuetes del suelo y cianobacterias	31.5	20	Mishra (2011)
	Ganoderma weberianum TZCI	42.9 (83%)	60	Zhou (2011)
	Paenibacillus larvae	214.4 (100%)	480	Ramya (2007)
	Cultivo de Lacasa Trametes versicolor + VA 20mM	(>60%)	480	Lorenzo (2007)
	Lacasa + Mediador HBT ; RSM	129	90	Daassi (2012)
Enzimáticos	Lacasa de <i>Trametes versicolor</i> (micelio liofilizado)	214-8577*10 <sup>3</sup> (99.9-40.35%)	7200	(Cano et al., 2011)
	Lacasa de Citrobacter amalonaticus Y19	4289		Oh (2011)
	Lacasa de Scytalidium thermophilum			(Ben Younes et al., 2011)
	Lacasa3T93 mutada de wild type 591	107 (100 %)	55	Liu (2011)
	Lacasa de gamma-Proteobacterium JB( tierra aislada alkali-tolerante) + Mediadores (SGA, V,pHBA)	10		Singh (2007)
	Lacasa de Trametes villosa en líquido + ultrasonidos	0.021*10 <sup>-3</sup> (65%)	60	Basto (2006)
	Lacasa de Panus rudis	530 (81%)	30	Zhang (2006)

Tabla 1.3.1B Métodos para la biodegradación de Índigo Carmín

(a) VA: Violuric Acid; RSM: Response Surface metodology; HBT: 1-hydroxybenzotriazole;SGA: Siringaldehyde; V: Vanillin; pHBA: para-Hydroxybenzoic Acid.

Hoy en día, los pigmentos de origen natural no son utilizados. En 1897 fue Heumann quien inventó el método original de sintetizar Índigo. A su vez, el Índigo Carmín (IC) se sintetiza industrialmente (Figura 1.2) tratando con ácido sulfúrico el Índigo insoluble en agua. El pigmento IC, soluble en agua, se utiliza como un colorante alimentario artificial que pertenece a la clase de los indigoides, y aparece en forma de polvo de color azul oscuro. Índigo Carmín figura en la lista Europea de aditivos (E132) y puede ser ingerido por el hombre en pequeñas cantidades. Como efectos secundarios se ha descrito que puede causar nausea, vómitos, presión alta en sangre, irritación de piel, problemas respiratorios o reacciones alérgicas (Peica y Kiefer, 2008). La toxicidad de esta sustancia es muy discutida y varía según el país del que se trate, y no hay un consenso sobre si esta sustancia es cancerígena o no, pues la organización *Pesticide Action Network North America* (PANNA) supone que es cancerígena, mientras que la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos (ECHA) todavía no la considera como sustancia peligrosa. IC también es utilizado para la tinción de ropa *denim*, especialmente, *blue jeans*.

Incluso pequeñas cantidades de este colorante, pueden afectar la vida acuática animal y, por tanto, entrar en la cadena alimentaria y alcanzar a los seres humanos. Por consiguiente, la eliminación de IC de las aguas residuales de dichas industrias textiles, supone un gran desafío para muchas investigaciones. En ellas se han propuesto diversos métodos para la degradación química de IC, basados en reacciones fotocatalíticas, o bien en reacciones de adsorción, oxidación o electrocoagulación (Tabla 1.3.1.A). Además, se han propuesto métodos para la biodegradación de IC, bien microbianos con cultivos de bacterias u hongos, o bien enzimáticos con enzimas extraídas y/o purificadas a partir de diversos microorganismos (Tabla 1.3.1.B).

## 1.3.2 Remazol Brilliant Blue Royal

Remazol Brilliant Blue Royal (RBBR) es un colorante reactivo de tipo antraquinónico, muy utilizado industrialmente y fácil de obtener (Guimaraes et al., 2012) que representa una clase de contaminantes orgánicos recalcitrantes (Liu et al., 2009b; Zhang et al., 2007). Se conoce también como Reactive Blue (Montanaro y Petrucci, 2009). Se utiliza como material de partida en la producción de tintes poliméricos (Eichlerova et al., 2007; Eichlerova et al., 2006), y en la coloración de fibras celulósicas (Siddique et al., 2011b). Contiene un grupo alquilo sulfonato (Figura 1.3), que es el responsable de la unión con las fibras celulósicas bajo condiciones

alcalinas.

Sin un adecuado tratamiento de este colorante, al ser muy estable, puede permanecer en el medioambiente por un largo periodo de tiempo. La vida media de RBBR hidrolizado a pH 7.0 y 25 °C es alrededor de 46 años. (dos Santos et al., 2007). Los investigadores creen que tiene propiedades mutagénicas, debido a la presencia de los grupos electrofílicos vinylsulfona. Por tanto, es muy importante eliminarlo del agua. Para ello hay que desarrollar procesos para degradarlo, y así disminuir el impacto medioambiental causado por los efluentes que contienen este colorante (Guimaraes et al., 2012).







**Aspecto y estructura del Remazol Brilliant Blue.** (sulfato disódico de 3-(4-Amino-9,10-dihidro-3-sulfo-9,10-dioxoantracen-4-ilo)aminobenzenosulfonil)vinilo o Reactive Blue 19).

Reacción	Operación	Concentración (Eficacia %)	Tiempo	Referencia
	Carbón activado	79.8 mM (95%)	2 h	Sathishkumar et al (2012)
	Serrín y carbon activado	285-588 mg/g		Vijayaraghavan et al (2009)
	Nanopartículas de MgO	0.08-0.48 mM (98%)	5 min	Moussavi et al(2009)
	Oxígeno básico modificado en horno de escoria	0.8 mM	3h	Xue et al (2009)
	Scenedesmus quadricauda inmovilizada	0.04-0.32 mM		Ergene et al (2009)
	Polvo ZnO	1.6 mM	4 h	Ada et al (2009)
Adaaraián	Fibra de colágeno forrado con Fe(III)-	311.8 mg /g		Gu et al (2008)
Ausorcion	Carbón activado+ ultrasonidos	1.46 mM (100%)	18 min	Sayan et al (2008)
	Ceniza quitosano/aceite de palma	0.8 mM	24 h	Hasan et al(2008)
	Sílice modificada	0.48 mM (90%)		Andrzejewska et al(2007)
	Salvado	0.08-0.24 mg	24 h	Cicek et al (2007)
	Magnético	90%: 121 mg/g	1-2 min	Liao et al (2006)
	Bola micelar de un nuevo Penicillium oxalicum aislado	0.16 mM (91%)	80 min	Zhang et al (2003)
	Reactor discontinuo con Al₀Cl	0.06 mM (57%)	39 días	Mehrali et al (2010)
	Bentonita modificada con surfactante catiónico	0.33 mM	40 min	Ozcan et al (2007)
	Quitosano en agua para floculación	0.159 mM		Jiang et al 2011
	Ozonación	0.160 mM		Fanchiang et al (2009)
Ozonación	Ozonación+ Ultrasonidos	0.8 mM		He et al (2008)
		90%	30 min	Chen et al (2009)
	Oxoácido y bacterias(Pandoraea sp.)	0.8 mM	30 min	Kurosumi et al (2008)
0	Electrocoagulación y electrodos Fe	0.16 mM (96%)	10 min	Song et al (2008)
Ozonacion	Ozonación catalítica con CuS	0.16 mM(90%)	80 min	Pirgalioglu et al (2009)
	Ozono electrogenerado	0.0798 (100%)	3 min	Parsa et al (2012)
Hidrólisis	Alta presión y alta temperatura	0.16 mM (23%)	2h	Siddique et al (2009)
	ZrO <sub>2</sub> and ZrO <sub>2</sub> -TiO <sub>2</sub>	50 ppm (50%)	120 min	(Polisetti et al., 2011)
	Nanofibra TiO <sub>2</sub>	100%	2h	(Rezaee et al., 2009)
Fotooxidación	Proceso UV/K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	100 %	<30min	(Rezaee et al., 2008)
	Foto Fenton	0.16 mM (91%)	18 min	Guimaraes et al (2012)
	Microondas	0.16 mM (95%)	80 min	Shi et al (2007)
Oxidación	Electrogenerador de Cl <sub>2</sub> con electrodo Ti/PbO <sub>2</sub>		60 min	Mukimin et al (2012)
	Combinación de persulfato y Fe	0.1 mM	45 min	Le et al (2011)
	Electrólisis bajo 10 V + 1g/L NaCL	79.8 uM	30 min	Ho et al (2011)
	Electrodo de Boro con diamante	0.24 mM (100%)		Montanaro et al (2009)
	Fe-O <sub>2</sub> /aire	98%	5 min	Chang et al (2009)
	Bromato acídico en medio	0.10		
	homo/heterogéneo	0.19 11111		Genneay et al (2007)
	Fe y Fe,F con Ti-Pt/PbO2 electrodos	0.04 mM (100%)	8 min	Andrade et al (2007)
	Medio ácido (HCI)	0.64 mM		Rajkumar et al (2007)
	Cloro activo electrogenerado	0.1 mM (90%)	6 h	Yang et al (2005)

Tabla 1.3.2 A
Métodos fisicoquímicos para la degradación de Remazol Brilliant Blue Royal
------------------------
Métodos enzimáticos pa

Decesión (Concrecióna Operación)		Concentración	Tiempo	Deferencia
Reaccion /Separacion*	Operacion	μM	h	Referencia
Lacasa de podedumbre blanca Polyporus sp S133		0.319*10 <sup>-3</sup>		Hadibarata et al (2012)
Lacasa Trametes versicolor (TvL)	Reactor de membrana + PEG-TEMPO (9 usos)	79.8 (96%)	4.5	Mendoza et al (2011)
Lacasas de podedumbre blanca Cerrena unicolor/Trametes hirsuta	pH 4.5	0.159610 <sup>-3</sup> (80/45%)	19.5	Moilanen et al (2010)
Lipasa de TvL	Mediador VA	100 (70/100%)	288	Christian et al. (2005)
Lacasa TvL	pH 5.0	50-100		Champagne et al. (2010)
Lacasa TvL	Inmovilizada en Alginato (4 usos)	80-96		Ramsay et al (2005)
Lacasa de <i>Trametes pubescens</i> MB 89	Inmobilizada	0.212 (44 %)	42	Osma et al (2010)
Lacasa	Libre/Inmovilizada	36 (90/77%)	0.5/ 8	Champagne et al (2010)
Lacasa recombinante de Pichia methanolica		128 (90%)	16 h	Guo, Lu et al. (2008)
Peroxidasas DyP Aspergillus oryzae	Inmovilización en mesocelular de Sílice	240 (83%)		Shakeri et al. (2010)
Lacasa P. cinnabarinus	Mediadores (25-100 μM): ASG ,SGA, HNNS, NNDS	25 (80%)	0.5	Camarero et al (2005)
Peroxidasas rDyP Aspergillus oryzae	Reactor	8090 (94%)	12	Shakeri et al. (2008)
Peroxidasas rDyP Aspergillus oryzae	Reactor	102 g	11	Shakeri et al. (2007)
Lacasa y Mn Peroxidasa de hongos de podedumbre blanca		82%	0.5	Levin et al (2010)
Compostaje gastado de champiñones	4 mM mediador Alcohol Veratrílico	80-90%	4	Singh et al (2010)
Lacasas lignolíticas de hongos		160 (80-95%)	672	Baldrian et al (2006)
Lacasa del hongo <i>Lentinus edodes</i>		75 %	72	(Shanmuga m et al., 2009b)
Lacasa micelar de Irpex lacteus		239 (98.6%)	24	Svobodova et al (2008)
Mn Peroxidasa	Inmobilización de Irpex lacteus	40	24	Susla et al (2008)
Lacasa de Dichomitus. squalens	Cultivo inmovilizado de hongos	79.8 (94%)	24	Susla et al (2007)
Lacasa de Pleurotus ostreatus	Reactor de lecho fijo con mediador	50 (70%)	4	Palmieri et al (2005)
Lacasa de Pleurotus ostreatus		50	72	Palmieri et al (2005)

(<sup>b</sup>) PEG-TEMPO: *Poly(ethylene glycol supported by 2,2,6,6-Tetramethyl-piperidin-1-yl)oxyl ;* VA: Ácido viorúlico; ASG: Acetosiringona, SGA, Siringaldehido; HNNS: 2-nitroso-1-naphthol-4-sulfonic acid; *NNDS: 1-nitroso-2-naphthol-3,6-disulfonic acid;* ABTS:2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid); HBT: *Hydroxybenzotriazole.* 

<b>D</b> ''		Concentración	Tiempo		
Reaccion	Operacion <sup>®</sup>	μM	h	Referencia	
Oxidasas de Pleurotus ostreatus	Oxidación enzimática	50	72	Palmieri et al (2005)	
Lac ( <i>Trametes pubescens</i> )+ 40 U/L celobiosa deshidrogenasa	Oxidación enzimática	212	22	Enayatzamir et al (2009)	
Bilirubina Oxidasa	Mediador ABTS	128 (91.5%)/	0.4	(Liu et al., 2009b)	
Lacasa y Peroxidasa de Dichomitus squalens	Inmovilizado	62%	10	Pavko et al (2008)	
Lacasa y Peroxidasa de <i>Irpex lacteus</i>	Reactor de lecho por goteo y soporte micelar	239 (80-90%)	24	Pocedic et al (2009)	
Lacasa y Mn Peroxidasa de basidiomycetes de México		90%	24	Hernández-Luna et al (2008)	
Lacasa modificada de <i>Pichia pastoris</i> GS115	VA / Sin mediador con 0.6 mM Cu <sup>2+</sup>	40 (100 /100%)	2/6	Hu et al (2009)	
Ganoderma sp enzimas	Método de superficie de respuesta	39.9*10 <sup>3</sup> (95.3 %)		Fazli et al (2010)	
Lacasa de Ganoderma lucidum	lones metálicos y mediador	80 (80%)	1-24	Murugesan et al (2009)	
Lacasa y peroxidasa de Lentinus critinus y Castanella	Oxidación enzimática	2% Rbbr	336	(Moreira Neto et al., 2009)	
Complejo lignolítico enzimático de <i>Pleurotus ostreatus</i>	Oxidación enzimática	100%		(Gomes Machado y Matheus, 2006)	
Lacasa de Streptomyces coelicolor	Mediador ASG (1mM)	10-25 (21%)	1	Dube et al (2008)	
Lacasa y Peroxidasa de Ischnoderma resinosum	Mediatores VA and HBT	160 (80-90%)	1-24	Kokol et al (2007)	
Enzimas extracelulares Lacasa + Mn Peroxidasa	Oxidación enzimática	90 %	72 -96	Lee et al (2006)	
Lacasa + Mn Peroxidasa	Oxidación enzimática	180 (90%)	4	Mohorcic et al (2006)	

	Tabla 1.3.2B (continuación)	
Métodos enzimáticos	para la degradación de Remazol Brilliant Blue R	oyal

(<sup>b</sup>) TEMPO: 2,2,6,6-Tetramethyl-piperidin-1-yl)oxyl ; VA: Ácido viorúlico; ASG: Acetosiringona, SGA, Siringaldehido; HNNS: 2-nitroso-1-naphthol-4-sulfonic acid; NNDS: 1-nitroso-2-naphthol-3,6-disulfonic acid; ABTS:2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid); HBT: Hydroxybenzotriazole.

		Concentración	Tiempo	Referencia
Reaccion	Operacion	mM	días	
	Reactor microbiano hidrolítico	95.6 %		Wang et al (2011)
	Cianobacteria conteniendo hormona triacontanol	0.039 (30%)		Karacakaya et al (2009)
	Proceso cíclico aeróbico-hidrolítico	0.96 (90%)	1	Wang et al (2009)
	Biocapa hidrolítica-aerobica	0.96 (94.5%)	0.5	Wang et al (2007)
	Hongo acuático derivado de agua fresca	0.10	>1	Junghanns et al (2008)
	Phormidium sp. termófilas	0.13 (32%)		Sadettin et al (2007)
	Shewanella sp NTOU1 en condiciones anaeróbicas	1.60 (90-98%)		(Chi et al., 2009)
	Cultivo oxidación-reducción	0.48 (84%)		Lee et al (2006)
Microbianos	Anaeróbico bajo condiciones hipersalinas	87%		Lee et al (2005)
	Bajo condiciones metanogénicas	20.7-118.7 *10 <sup>3</sup>	>1	Lee et al (2004)
	Termofílica (55°C) y mesofílica (30°C)	0.15 (80%)	27	dos Santos et al (2005)
	Reductiva bajo condiciones metanogénicas	0.16 (88%)		Fontenot et al (2003)
	Hongo podedumbre blanca Dichomitus squalens	152*10 <sup>3</sup>	3	Eichlerova et al (2006)
	Hongo podedumbre blanca Dichomitus squalens	4.80	14	Eichlerova et al (2007)
	Microorganismo lignonítico aislado de isolated de abono	0.32 (<50%)		López et al (2006)
	Cultivo filtrado de Funalia trogii	160		Deveci et al (2004)

Tabla 1.3.2 C Métodos microbianos para la determinación de Remazol Brilliant Blue

Se han propuesto numerosos métodos físico-químicos para la degradación de RBBR (Tabla 1.3.2A). Entre ellos, se encuentran métodos que utilizan reacciones de adsorción, ozonación, hidrólisis, oxidación y fotooxidación (Tabla 1.3.2A). Además, se han descrito métodos enzimáticos en los que actúan oxidasas, sin o con mediadores (Tabla 1.3.2B). Por otra parte, se han investigado métodos microbianos, principalmente con cultivos de bacterias y hongos que contienen hidrolasas y oxidasas, bajo diversas condiciones de biodegradación (Tabla 1.3.2C).

### 1.3.3 Métodos de degradación de los colorantes

La decoloración de las aguas residuales se ha convertido en una de las mayores preocupaciones en la contaminación de los vertidos, pues muchas industrias utilizan colorantes para fines diversos. Muchos métodos y estrategias de tratamiento se han venido utilizando para degradar los colorantes y minimizar el riesgo. Así, un amplio rango de métodos físico-químicos se han utilizado desde hace tiempo, como métodos de oxidación por ozonación (Chen et al., 2009; Dalmazio et al., 2007; Fanchiang y Tseng, 2009; Gunes et al., 2012; He et al., 2008; Kurosumi et al., 2008; Parsa y Abbasi, 2012; Pirgalioglu y Ozbelge, 2009; Song et al., 2008); coagulaciónfloculación (Jiang et al., 2011; Secula et al., 2011); adsorción a través de distintos compuestos como quitosano, Al-Mg, nanopartículas y carbón activado, entre otros (Ada et al., 2009; Andrzejewska et al., 2007; Bentouami et al., 2010; Cestari et al., 2008; Cicek et al., 2007; Ergene et al., 2009; Gomez-Solis et al., 2012; Gu et al., 2008; Hasan et al., 2008; He et al., 2012; Li et al., 2012; Liao et al., 2006; Martinez-de la Cruz et al., 2012; Mehrali et al., 2010; Montero-Ocampo et al., 2012; Moussavi y Mahmoudi, 2009; Ozcan et al., 2007; Qu et al., 2010; Sathishkumar et al., 2012; Sayan y Edecan, 2008; Vautier et al., 2001; Vijayaraghavan et al., 2009; Xue et al., 2009; Zaied et al., 2011; Zhang et al., 2003); oxidación fotocatalítica (Bentouami et al., 2010; Borhade y Baste, 2012; Coelho et al., 2011; de Andrade et al., 2012; de Carvalho et al., 2011; Gemeay et al., 2007; Gomez-Solis et al., 2012; Guaraldo et al., 2011; Hachem et al., 2001; Hammami et al., 2012; Mandal y Bhattacharyya, 2010; Martinezde la Cruz et al., 2012; Montero-Ocampo et al., 2012; Pinto et al., 2012; Qu et al., 2010; Sanchez Martinez et al., 2011; Torres-Martinez et al., 2012; Vautier et al., 2001; Zaied et al., 2011); ultrasonidos (Siddigue et al., 2011a); oxidación electroquímica (Andrade et al., 2007; Gemeay et al., 2007; Hammami et al., 2012; Montanaro y Petrucci, 2009; Mukimin et al., 2012; Rajkumar et al., 2007; Yang et al., 2005); termopresión (Siddique et al., 2009); oxidación Fenton (Chang et al., 2009; Flox et al.,

2006; Ho et al., 2011; Le et al., 2011); fotoquímica más microondas (Shi et al., 2007) e hipoclorito en medio acuoso (F. M. de Urzedo et al., 2007; Ho et al., 2010). Sin embargo, estos tratamientos son generalmente caros, utilizan complicadas tecnologías y necesitan grandes demandas energéticas. Además, no suelen degradar de un modo efectivo tales contaminantes (Sarwan et al., 2012), e incluso pueden producir productos de reacción más tóxicos (Deveci et al., 2004).

Por tanto, se necesita explorar nuevos métodos más eficientes y económicos para cumplir las estrictas medidas medioambientales, siendo a su vez sostenible económica y medioambientalmente. La biodegradación es la técnica actual que está captando más atención (Ramya et al., 2008). Consiste en utilizar microorganismos (bacterias, hongos y cepas de levaduras principalmente) o enzimas, que pueden oxidar a una amplia variedad de colorantes sintéticos (Jadhav et al., 2008). El uso de bacterias está siendo muy estudiado, por ejemplo con Dichomitus squalens (Eichlerova et al., 2007; Eichlerova et al., 2006), lacasa sobre esporas de Bacillus subtilis (Cho et al., 2011), cianobacterias (Karacakaya et al., 2009), y el de hongos, como Pleatus ostreatus (Kahraman et al., 2012), Phormidium sp. Termófilas (Sadettin y Donmez, 2007), en cultivo filtrado de Funalia trogii (Deveci et al., 2004), entre otros microorganismos y procesos (Deveci et al., 2004; dos Santos et al., 2005; Fontenot et al., 2003; Han et al., 2012; Junghanns et al., 2008; Lee et al., 2005; Lee y Pavlostathis, 2004; Levin et al., 2012; Lopez et al., 2006; Lorenzo et al., 2007; Lu et al., 2012; Mishra et al., 2011; Ramya et al., 2008; Wang et al., 2009; Wang et al., 2007; Zhou et al., 2011). Se ha estudiado también la degradación de colorantes en reactores microbianos (Wang et al., 2011).

El uso de enzimas tiene considerables beneficios sobre el uso directo de microorganismos, ya que las preparaciones enzimáticas comerciales se pueden usar fácilmente con una dosis estandarizada, la aplicación es sencilla, y se puede modificar fácilmente de acuerdo a las propiedades del colorante a degradar. Sin embargo, la degradación microbiana puede ser más compleja (Forgacs et al., 2004), pues los microorganismos son más difíciles de almacenar y manipular. Los métodos enzimáticos encajan en una categoría intermedia entre los métodos químicos y los microbianos, pues necesitan procesos químicos basados en la acción de catálisis biológica, por tanto, tienen las ventajas de ambos métodos (Akhtar et al., 2005).

Los métodos de degradación enzimáticos tienen un mínimo impacto medioambiental, tiene bajos requerimientos energéticos y un sencillo control del

proceso, pueden operar sobre un amplio rango de pH, temperatura y fuerza iónica (Duran y Esposito, 2000; Torres et al., 2003). También pueden ser utilizados a altas o bajas concentraciones del contaminante, no necesitan una aclimatación de la biomasa, y generan escasos sedimentos (Kalpana et al., 2012; Karam y Nicell, 1997). Las enzimas actúan sobre el colorante, bien por precipitación o por transformación de los mismos en productos inocuos (de Souza et al., 2007). Así que se están haciendo muchos estudios sobre la biodegradación de colorantes con enzimas, y la mayoría están llevados a cabo con enzimas extracelulares del hongo de la podredumbre blanca (Ammar et al., 2006; Cano et al., 2011; Hadibarata et al., 2012; Levin et al., 2010; Lorenzo et al., 2006; Moilanen et al., 2010; Shanmugam et al., 2009a; Shanmugam et al., 2009b) que viene utilizándose desde los años 80, y la más popular es de Trametes versicolor (Champagne et al., 2010; Ramsay et al., 2005). La habilidad de degradación de compuestos aromáticos xenobióticos por este hongo, es debida a la acción de la enzima lacasa principalmente. El éxito de este hongo viene de la capacidad que tiene para degradar lignina, la cual es un polímero que posee una alta concentración de anillos aromáticos, con alto grado de polimerización. El mecanismo enzimático se da por la acción de enzimas oxidasas y peroxidasas, enzimas que no tienen una alta especificidad hacia los sustratos, y por tanto pueden actuar sobre distintos compuestos fenólicos y azo. Están apareciendo numerosos estudios de degradación con lacasa y otras formas de degradación, como cultivos o extractos de gamma-Proteobacterium JB (Singh et al., 2007), de Trametes villosa en líquido con ultrasonidos (Basto et al., 2007), de Panus rudis (Zhang et al., 2006), de Irpex Lacteus (Pocedic et al., 2009; Svobodova et al., 2008), de Pleurotus ostreatus (Palmieri et al., 2003; Palmieri et al., 2005a), de Trametes pubescens con celobiasa deshidrogenasa (Enavatzamir et al., 2009), de basidiomicetos de México (Hernandez-Luna et al., 2008), de Ganoderma (Fazli et al., 2010a, b; Murugesan et al., 2009), de Lentinus critinus y Castanella (Moreira Neto et al., 2009), de Streptomyces coelicolor (Dube et al., 2008), y de Ischnoderma resinosum (Kokol et al., 2007), entre otras (Ben Younes et al., 2011; Oh et al., 2011).

Adicionalmente, se ha comprobado en diversos estudios que, debido a la composición de la pared celular de ciertos hongos, y a la afinidad de algunos colorantes con compuestos de esta pared, se puede dar un fenómeno de bioadsorción de colorantes una vez diluidos. Otras enzimas estudiadas en la degradación de colorantes son las peroxidasas, como Manganeso peroxidasa (Lee et al., 2006; Mohorcic et al., 2006; Susla et al., 2008), de lignina, de rábano picante, de nabo, de

soja, microperoxidasas, DyP *de Thanatephorus cucumeris Dec1* (Husain y Husain, 2008; Sugano et al., 2009), lipasas de *Trametes versicolor* (Christian et al., 2005), y Bilirubina oxidasa (Liu et al., 2009a).

Además, las enzimas libres se pueden utilizar inmovilizadas, como lacasa de TvL (Ramsay et al., 2005,(Champagne y Ramsay, 2010), de *Trametes pubescens MB 89* (Osma et al., 2010), y *de Dichomitus squalens* (Pavko y Novotny, 2008; Susla et al., 2007). Se pueden usar en reactores de lecho fijo (Palmieri et al., 2005b).

También se pueden utilizar enzimas modificadas genéticamente, como lacasa recombinante de *Pichia methanolica* (Guo et al., 2008), peroxidasas recombinantes de *rDyP Aspergillus oryzae* (Shakeri y Shoda, 2007, 2010; Shakeri et al., 2008), segregada modificada de cadena *Pichia pastoris GS115* (Hu et al., 2009), y lacasa mutada 3T93 del tipo nativo 591 (Liu et al., 2011). También enzimas procedentes de compostajes y biomasa, como el compostaje de champiñones (Singh et al., 2010), y de hongos descompuestos de desperdicios (Baldrian y Snajdr, 2006), etc.

Así que en este trabajo nos centraremos en el estudio de la degradación de colorantes, por medio de las enzimas lacasas y peroxidasas de rábano picante y de soja, pues son las enzimas más utilizadas y que más ventajas poseen. Además, con el uso de mediadores, el llamado sistema enzima-mediador, aplicado principalmente a lacasa, se puede aumentar la eficiencia de degradación, como ya se ha estudiado en el caso de la deslignificación de la pulpa de papel (Camarero et al., 2007), blanqueo de la pulpa (Fillat et al., 2010; Moldes et al., 2008), decoloración de distintos colorantes textiles (Camarero et al., 2005; Daassi et al., 2012; Li et al., 2009; Mendoza et al., 2011; Tavares et al., 2009), y degradación de otros tóxicos como pesticidas (Torres-Duarte et al., 2009).

## **1.4 FENOLES**

Los compuestos fenólicos se emplean en una gran variedad de industrias químicas, como son la producción de resinas, nylon, plásticos, antioxidantes, aditivos de aceite, drogas, pesticidas, colorantes, explosivos, desinfectantes, biocidas, etc. y su producción anual total es de 50000 t (Riedel et al., 1993). La contaminación de las aguas y del suelo por estos vertidos, es un problema medioambiental muy importante, debido a su alta toxicidad incluso a concentraciones muy bajas, a que no son biodegradables, y a la gran frecuencia de uso de estos compuestos en la industria (Santos et al., 2002). La Organización Mundial de la salud cifra en 1 mg/L, la máxima concentración permisible de algunos compuestos fenólicos en el agua potable. Sin embargo, a veces se imponen límites de efluentes descargados más severos, llegando a 0.5 mg/L (Peretz et al., 2012). Estos compuestos también están incluidos en la lista americana de la EPA (Environmental Protection Agency), y en la directiva europea 76/464/ECC sobre sustancias peligrosas (Orejuela y Silva, 2002).

Por tanto se necesitan métodos analíticos efectivos y sensibles, para medir concentraciones muy bajas de estos compuestos, y así detectar pérdidas minoritarias de los fenoles en las aguas residuales, que a largo plazo pudiesen repercutir en un coste económico importante. Además, en el caso de los contaminantes fenólicos, se podría poder evitar el paso de los mismos al ser humano a través de la cadena alimentaria, y la alteración del medio ambiente. Estos métodos analíticos también serían útiles en ensayos de gestión de la calidad, de fármacos fenólicos y de suplementos alimenticios con fitoquímicos fenólicos.

A continuación se mencionarán diversos métodos analíticos descritos en la bibliografía, para el análisis químico de destacados contaminantes, fármacos y fitoquímicos fenólicos, los cuales serán determinados posteriormente (Capítulo 7) en esta Memoria, con un nuevo y sensible método de bioanálisis enzimático.

# 1.4.1. Contaminantes fenólicos

El fenol es la molécula más simple de una familia de compuestos, en donde el grupo hidroxilo –OH se une al anillo bencénico. Los fenoles tienen propiedades similares a los alcoholes, pero forman enlaces de hidrógeno más fuertes. El fenol tiene

una estructura química  $C_6H_5OH$  y sus derivados son R- $C_6H_4OH$ , donde R representa un grupo metilo, un halógeno (Karim y Fakhruddin, 2012), etc convirtiéndose en compuestos tales como los cresoles (p-cresol), halofenoles (clorofenol, bromofenol, iodofenol) y bisfenoles (Bisfenol A) (Fig. 1.4.1).



### FIGURA 1.4.1

Estructura química de los contaminantes fenólicos determinados en este trabajo.

El fenol puro es un sólido cristalino que huele a desinfectante. Es un compuesto muy generalizado desde la antigüedad, pero debido a su toxicidad está en desuso. En la actualidad, fenol y p-cresol se utilizan en medicina como cauterizadores y desinfectantes, pues tienen gran poder de penetración en la piel. Como efectos locales agudos, producen irritación dérmica (dermatitis), del tracto respiratorio y los ojos e incluso necrosis, y en mayor cantidad puede producir depresión del sistema nervioso central (IARC, 1989) (arritmias, ataques epilépticos y coma), cáncer de pulmón (Morimoto et al., 1976) y daño en los riñones e hígado. Su concentración permisible en las aguas es de 1 µgL<sup>-1</sup> (Karim y Fakhruddin, 2012).

El bisfenol A (BPA) se usa en la industria química como antioxidante o material

de partida, para numerosos tipos de plásticos como policarbonatos y resinas como polisulfona, epoxi, oxido de polifenileno y poliéster insaturado. Estos materiales se usan ampliamente en la fabricación de biberones, en recipientes de bebidas, y en el revestimiento de las latas de comida. Por tanto, el Bisfenol A puede pasar a la comida (Kawamura et al., 1999), debido a la hidrólisis del polímero durante un tratamiento térmico. Es un compuesto muy importante a nivel industrial y, ante sus usos, es un compuesto omnipresente que puede estar pasando al ser humano, de forma inadvertida a nivel de trazas (Yin et al., 2009). BPA no es biodegradable, es muy resistente a la degradación química, y por tanto su concentración en el medio ambiente suele ser alta (Wang et al., 2009a). Tiene efectos perjudiciales en la salud, pues es un contaminante alterador endocrino (Olea et al., 1996), produciendo anomalías en el sistema reproductivo y endocrino (Hu et al., 2009b), como disminución de la calidad del semen humano (Carlsen et al., 1995) y anomalías en el feto (Brock et al., 2001), además de la producción de varios tipos de cáncer, y diversas acciones pleiotrópicas en el cerebro y en el sistema cardiovascular (Steinmetz et al., 1998). Por tanto, BPA se debe controlar en el agua, aunque aún no está legislado. Sin embargo, está incluido en el Anexo II de la directiva 2008/105/EC, como una futura sustancia regulada en "la lista de las 33 sustancias prioritarias". Además, la directiva establece que el límite de cuantificación del método debe ser 30% del EQS (Environmental Quality Standard) (Salgueiro-Gonzalez et al., 2012).

Dentro de los halofenoles, el 4-clorofenol (4-CP) es conocido por ser un componente generalizado de las aguas industriales e incluso naturales, con efectos tóxicos y carcinogénicos en la salud humana, estando en la lista de contaminantes prioritarios por la UE y por la US-EPA. 4-CP se utiliza en la producción de tintes, drogas, pesticidas y fungicidas (Pop et al., 2008). Además puede aparecer por la cloración de fenoles no clorados presentes en la industria (como los anteriores fenol y p-cresol, por ejemplo). En 1982 se estableció su máximo permitido en aguas potables en 0.5 µgL<sup>-1</sup>(Peng et al., 2007). El 4-iodofenol (4-IP) puede alterar el normal funcionamiento de la glándula tiroidea en humanos, dada su similitud en estructura química a las hormonas tiroideas (Kannamkumarath et al., 2004). En el agua, se analizan los AOX (*adsorbable organic halogens*), y es un buen indicador de la calidad del agua en términos de contaminación industrial (Twiehaus et al., 2001).

Así, debido a los efectos adversos de estos contaminantes y restricciones legales, numerosos métodos han ido apareciendo para la medida de estos compuestos, intentando llegar cada vez a mayores sensibilidades. A continuación, se detallan

diferentes métodos estudiados recientemente para el fenol (Tabla 1.4.1.1). Entre ellos, los métodos electroquímicos (Huang et al., 2009), tales como la potenciometría (El-Kosasy et al., 2003), amperometría (Chang et al., 2002; Kochana et al., 2008; Korkut et al., 2008; Li et al., 2005; Mulazimoglu y Yilmaz, 2010; Shan et al., 2002) y voltametría (Mulazimoglu y Yilmaz, 2010). Dentro de los métodos ópticos, se encuentran la quimioluminiscencia (Xu et al., 2012), espectrometría de masas (Lee et al., 2002), fluorescencia (Wu et al., 2012) y absorbancia (Fan et al., 2008; Fatibello et al., 2002; Ni et al., 2011; Wu et al., 2008b; Xu et al., 2008; Zhang et al., 2011b). La determinación de p-cresol (Tabla 1.4.1.2) abarca métodos electroquímicos, voltamétricos (Berge-Lefranc et al., 2008; Hu et al., 2012), amperométricos y potenciométricos. Dentro de los métodos ópticos, cabe resaltar los de absorbancia (Asan y Isildak, 2003) y espectrometría de masas. La tabla de determinación de bisfenol A (Tabla 1.4.1.3) también incluye métodos electroquímicos, como la voltametría (Huang et al., 2011; Xia et al., 2010; Yin et al., 2011; Zhang et al., 2012), y amperometría (Yin et al., 2011(Portaccio et al., 2010; Wang et al., 2009a; Zhang et al., 2009b). Entre los métodos ópticos se ha utilizado la quimioluminiscencia (Zhuang et al., 2008), fluorimetría (Miao et al., 2009), espectrometría de masas (Chen et al., 2008; Chokwe et al., 2012; Dirtu et al., 2008; Jiang et al., 2011; Kawaguchi, 2008; Ogura et al., 2009; Song et al., 2011; Wu et al., 2009) y absorbancia (Jiang et al., 2011, (Atasever et al., 2013; Fan et al., 2008; Hu et al., 2009b; Lu et al., 2010; Mei et al., 2011). Para la determinación de los halofenoles (Tabla 1.4.1.4) se han descrito métodos electroquímicos, como voltametría (Chu y Zhang, 2012; Yue et al., 2012), potenciometría y amperometría (Pop et al., 2008). Dentro de los métodos opticos, se determinan por espectrometría de masas, (Kannamkumarath et al., 2004), emisión de plasma (Twiehaus et al., 2001) y absorbancia (Chimuka et al., 2007; Higashi y Fujii, 2009; Peng et al., 2007; Quintana et al., 2006; Sarafraz-Yazdi et al., 2010).

			Intervalo	LOD	
Extracción/Reacción <sup>a</sup>	Operación <sup><sub>b</sub></sup>	Detección	(nM)	(nM)	Referencia
$Ph + O_2 \xrightarrow{Electrodo} HQ$	CTAB/MMT- CPE	Electroquímico	101-3010	60	(Huang et al., 2009)
Ph LLE (tampón pH 12)	pón pH 12) PR-MCPPES- CV Voltametría		10- 1000000	10	(Mulazimog lu y Yilmaz, 2010)
$Ph + O_2 \xrightarrow{TYR} HQ \to Q$	IME-TiSG	Amperometría	440- 11000	130	(Kochana et al., 2008)
$Ph + H_2O_2 \xrightarrow{HRP} HQ$	CNT/PPy/ HRP	Amperometría	16-44*10 <sup>3</sup>	3.5	(Korkut et al., 2008)
$\begin{array}{c} Ph + O_2 \xrightarrow{TYR} HQ \xrightarrow{TYR} Q\\ Q \xrightarrow{Electrodo} C \end{array}$	RBTyrGF	Amperometría/ Voltametría	50-71000	15	(Li et al., 2005)
$O_2 \longrightarrow H_2 O_2 \xrightarrow{HRP} H_2 O$	HRP-SPCE- TYRPCS	Amperometría	25-45000	2.5	(Chang et al., 2002)
$Ph + O_2 \xrightarrow{TYR} Q$	PABES	Amperometría	4-18000	4	(Shan et al., 2002)
Ph EOS	PVCMME	Potenciometría	1-100 *10 <sup>4</sup>	10000	(El-Kosasy et al., 2003)
$Ph+H_2O_2 \xrightarrow{(Mn^WDP)_2O/NaOH} Ph^{\bullet} + (Mn^{UI}DP)_2O + 2H^{+}$	FI-CL	Quimio Iuminiscencia	o 43-4250		(Xu et al., 2012)
$Ph + H_2O_2 \xrightarrow{TCPO} PO$	LC-POCL	Quimio Iuminiscencia	Quimio Iminiscencia 74-5319		(Orejuela y Silva, 2002)
Ph EOS	CG-FID	MS	2.13-21.3 *10 <sup>5</sup>	6400- 10600	(Lee et al., 2002)
Ph EOS	IC/ED	$F_{410}^{320}$	1.06- 21.3*10⁵	39	(Wu et al., 2012)

Métodos para la determinación de fenol

Métodos para la determinación de fenol						
Extracción/Reacciónª	Operación <sup>b</sup>	Detección	Intervalo	LOD	Referencia	
	operation	Deteodion	nM	nM	Referencia	
$Ph_{red} + KBrO_3 + RhB \xrightarrow{NaAc-HCl} Br^- + Ph_{oxid} + H_2O$	KG	Δ	1.62-		(Ni et al.,	
	NO	A <sub>557</sub>	21*10 <sup>4</sup>	6380	2011)	
I BME		Δ	106-		(Zhang et	
	TIFLU	<b>A</b> 274	10626	32	al., 2011a)	
11 E		Δ			(Fan et al.,	
		<sup>2</sup> <b>1</b> 269		21	2008)	
HS-SDME		Δ	9/_115		(Wu et al.,	
113-3DML	TIFLO	<sup>2</sup> <b>1</b> 269	54-115	22	2008b)	
UAHS-LPME	HPLC	$A_{269}$	1.06-31.9		(Xu et al.,	
			*104	4790	2008)&	
$Ph + H_2O_2 \xrightarrow{ZP} HQ$	FIS	A <sub>269</sub>	2-40*10 <sup>₅</sup>		(Fatibello et	
		207		80000	al., 2002)	

#### Tabla 1.4.1.1 (Continuación)

(a) Ph: Fenol; HQ: Hidroquinona; LLE: *Liquid liquid Extraction*; TYR: Tirosinasa o Polifenol oxidasa; Q: o-Quinona; HRP: Peroxidasa de rábano; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de Hidrógeno; C: Catecol; H<sub>2</sub>O: Agua; TCPO: 2,4,6-trichlorophenyloxalate; LPME: Two-step liquid-phase microextraction; ILE: Ionic Liquid Extraction; HS-SDME: Headspace single drop microextraction; UA-HS-LPME: Ultrasound-assisted headspace liquid phase microextraction; ZP : Peroxidasa de calabacín. EOS: Extraction with organic solvent.

(b) CTAB/MMT-CPE: Montmorillonite calcium modified with cetyltrimethylammonium bromide used to modify the carbon paste electrode; PR-MCPPES-CV : Procaine modified carbon paste electrode surface by cyclic voltammetry; IME-TiSG: Enzyme immobilized in titania sol-gel; CNT/PPy/HRP: Carbon nanotube-polypyrrole with HRP composite; RBTyrGF: Reagentless biosensor based on Tyrosinase entrapped within gelatine film; HRP-SPCE-TYRPCS: Horseradish peroxidase modified screen-printed carbon electrodes coupled with immobilized Tyrosinase prepared using polycarbamoylsulfonate hydrogels; PABES: Poly azure B clay enzyme sensor, PVCMME: Polyvinylchloride matrix membrane electrode; FI-CL: Flow injection chemiluminescence; LC POCL: Liquid chromatography with peroxyoxalate chemiluminescence; CG-FID: Capillary

gas chromatography coupled with flame injection; MS: Mass spectrometry;  $F_{em}^{ex}$ : Intensidad de fluorescencia en la longitud de emision

obtenida con la indicada longitud de excitación; IC/ED/FD : lon chromatography-online electrochemical derivatization;  $A_{\lambda}$ : Absorbancia a la longitud de onda indicada; KS: Kinetic spectrophotometric; HPLC: High performance liquid chromatography; FIS : Flow injection spectrophotometric.

Métodos para la determinación de p-cresol							
Extracción/Reacción a	Operación <sup>b</sup>	Detección	Intervalo	LOD	Referencia		
Extraccion/inteaccion	Operación	Detección	(nM)	(nM)	Referencia		
PC EOS	RGO-MWNTs	Voltametría	5000- 430000	15	Hu et al. (2012)		
$pC + O_2 \xrightarrow{Electrode} Q$	ZME	Voltametría	2000000		Bergé- LeFranc (2008)		
$pC + O_2 \xrightarrow{TYR} HQ \to Q$	$pC + O_2 \xrightarrow{TYR} HQ \rightarrow Q$ IME-TiSG Amperometría		220-7700	140	Kochana et al. (2008)		
$pC + H_2O_2 \xrightarrow{HRP} HQ$	CNT/PPy/ /HRP	Amperometría	128000- 832000	24000	Korkut et al (2008)		
$pC + O_2 \xrightarrow{TYR} Q$	PABES	Amperometría	0.4-2600	0.4	Shan & Mousty (2002)		
$O_2 \xrightarrow{Electrode} H_2 O_2 \xrightarrow{ZP} H_2 O$	HRP-SPCE- TYRPCS	Amperometría	35-38000	5	Chang & Rawson (2002)		
$4 - ClP + O_2 \xrightarrow{TYR} HQ \rightarrow Q$	$4 - ClP + O_2 \xrightarrow{TYR} HQ \rightarrow Q \qquad \text{EBS}$		0-629	29	Adamski et al. (2010)		
PC EOS	PVCMME	Potenciometría	10000- 1000000	10000	El-Kosasy et al. (2003)		
PC EOS	TiO <sub>2</sub> -CPE	Electroquímico	150-20000	80	Zhang et al. (2011)		
UAHS-LPME pC	HPLC	$A_{232}$	10600- 319000	5460	Xu & Yao(2008)		
$pC + O_2 \xrightarrow{TYR} Cat \xrightarrow{TYR} Q$ $Q \xrightarrow{Electrode} Cat$	RBTYRGF	$A_{232}$	100-36000	71	Li & Xue (2005)		
$pC + BC \longrightarrow dBC$	HPLC	A <sub>232</sub>		2.77	Asan & Isildak. (2003)		
PC EOS	CG	MS-FID	18500- 184960	5550	Lee & Kumasawa. (2002)		
$pC + H_2O_2 \xrightarrow{ZP} HQ$	FIS	$A_{232}$	200000- 4000000	80000	Fatibello et al. (2002)		

Tabla 1.4.1.2 étodos para la determinación de p-creso

(a) pC: p-Cresol; Q: 3-metil-1,4-benzoquinona ; HQ: Hidroquinona ;TYR: Tirosinasa o polifenoloxidasa; HRP: Peroxidasa de rábano ; ZP: Peroxidasa de calabacín; UAHS-LPME: Ultrasound assisted headspace liquid microextraction; Cat: Catecol BC: Benzoyl chloride; dBC: Benzoyl chloride derivatives; EOS: Extraction with organic solvent.

(b) RGO-MWNTs :Reduced grapheme oxide and multiwall carbon nanotubes hybrid materials; ; ZME: Zeolite modified electrode; IME-TISG: Enzyme immobilised in titania sol-gel; CNT/PPy/HRP: nanotube-polypyrrole with HRP composite; PABES:Poly azure B clay enzyme sensor ; HRP-SPCE-TYRPCS: Horseradish peroxidase modified screen-printed carbon electrodes coupled with immobilized tyrosinase prepared using polycarbamoylsulfonate hydrogels; EBS: Enzymatic biosensor; PVCMME: Polyvinylchloride matrix membrane electrode; TiO<sub>2</sub>-CPE:Mesoporous TiO<sub>2</sub> to prepare modified carbon paste electrode; HPLC: High Pressure Liquid Chromatography; RBTYRGF: Reagentless biosensor based on Tyrosinase entrapped within gelatin film; MS: Mass spectrometry; FID: Flame injection detection; FI-UV: Flow injection

spectrophotometric; GC: gas chromatography;  $A_{j}$  = Absorbancia a la longitud de onda indicada.

Métodos para la determinación de Bisfenol A							
Extracción/	Operación <sup>b</sup>	Detección	Intervalo	LOD	Referencia		
Reacciónª	operación	Deteodion	(nM)	(nM)	Referencia		
BPA ILLE	Arg-G-NC	Voltametría	5-40000	1.1	(Zhang et al., 2012)		
BPA MISPE	MWCNTs- GNPS	Voltametría	113- 8210000	3.6	(Huang et al., 2011)		
BPA EOS	ITO-E	Voltametría/ Fluorescencia	500- 12000	290	(Xia et al., 2010)		
BPA EOS	GCE-LDH- SDS	Amperometría	8-2800	2	(Yin et al., 2011)		
BPA EOS	Ti-CPE	Amperometría	150- 45000	150	(Portaccio et al., 2010)		
$BPA + O_2 \xrightarrow{Electrodo} BPA_{ox}$	MS-ES	Amperometría	220-8800	38	(Wang et al., 2009a)		
BPA EOS	MIT/EPM-ES	Amperometría	600- 55000	200	(Zhang et al., 2009b)		
BPA EOS	Luminol	Quimiolumi niscencia	440- 22000		(Zhuang et al., 2008)		
BPA EOS	HPLC	$F_{301}^{230}$	10-1010	2.5-29	(Miao et al., 2009)		
BPA CPCX/CPEP	GC	MS		0.8	(Wu et al., 2009)		
BPA EOS	LC	MS		<4380	(Ogura et al., 2009)		
BPA SBSE-TD	GC	MS		2.2	(Kawaguchi, 2008)		
BPA SPE y derivación	GC	MS	0.9-4.4	0.44	(Chokwe et al., 2012)		
BPA SPE	GC	ECNI/MS	3.11	1.2	(Dirtu et al., 2008)		
BPA EOS	HPLC	Absorbancia-MS		46	(Song et al., 2011)		
BPA EOS	HPLC	A <sub>285</sub>	6.5-876	2.54	(Jiang et al., 2011)		
BPA EOS	CE	A <sub>214</sub>	13141- 2190197	8	(Mei et al., 2011)		
BPA EOS	CL	$_{A_{320}}$ / $F_{278}^{450}$	300- 80000	80	(Lu et al., 2010)		
BPA HSPM-ME-CE	MEKC	DAD190-600	22-880	7.9	(Hu et al., 2009b)		

Tabla 1.4.1.3

(a) BPA: Bisfenol A; BPA ox: Producto de oxidación de Bisfenol A; ILLE: Ionic liquid liquid Extraction; MISPE: Molecularly imprinted solid-phase extraction; EOS: Extraction with organic solvent; CPCX/CPEP: Cleanert PCX and PEP polymer for solid phase extraction; SPE: Solid phase extraction; SBSE-TD: Stir bar sorptive extraction and thermal desorption. ILE: Ionic liquid extraction; HSPM-ME-CE: Hybrid silica polymeric monolith-based in-tube microextraction and capillary electrophoresis.

(b) Arg-G-NC: Arginine functionalized graphene nanocomposite; MWCNTs-GNPS: Multi-walled carbon nanotubes and gold nanoparticles; ITO-E : Indium-tin oxide Electrode; GCE-LDH-SDS: Glassy Carbon Electrode modified with layered double hydroxide and anionic surfactant (sodium dodecyl sulfate); Ti-CPE: Thionine-modified carbon paste electrode; MS-ES : Mesoporous silica-based electrochemical sensor; MIT/EPM-ES: Electrochemical sensor based on molecular imprinting technique and electropolimerization membrane; HPLC: High performance liquid chromatography; GC: Gas Chromatography; MS: Mass spectrometry detection; LC: Liquid Chromatography; ECNI/MS: Coupled to electron-

capture negative-ionization mass spectrometry; CE: Capillary electrophoresis; CL: Chemiluminiscence;  $F_{em}^{ex}$ : Intensidad de fluorescencia en la longitud de emission obtenida con la indicada longitud de excitación; MEKC: Micelar electrokinetic chromatography; DAD: Diode array Detector.

Métodos de determinación de 4-Halofenoles							
Extracción/ Reaccióna	Oneraciónb	Detección	Intervalo	LOD	Referencia		
	Operaciona	Deleccion	(nM)	(nM)	Kelefencia		
	NP-HAp-	Voltametría	10-100	1	(Chu y Zhang 2012)		
	GCE	Voltametria	10-100	-	(Ond y Zhang, 2012)		
4-CIP EOS	CZE	Voltametría	18-70*10 <sup>8</sup>	81*10 <sup>6</sup>	(Yue et al., 2012)		
4-CIP EOS	PVCMME	Potenciometría	10-	10*10 <sup>3</sup>	(El-Kosasy et al., 2003)		
			100*10 <sup>3</sup>				
$4 - ClP + O_2 \xrightarrow{TYR} HQ \rightarrow Q$	EBS	Crono-	0-621	29	(Adamski et al., 2010)		
		amperométrico					
$4 - ClP + O_2 \xrightarrow{TYR} HQ \rightarrow Q$	IME-TISG	Amperometría	220-	170	(Kochana et al., 2008)		
			13000				
$4 - ClP + H_2O_2 \xrightarrow{HRP} HQ$	CNT/PPy/	Amperometría	1600-	300	(Korkut et al., 2008)		
	HRP		14400				
$4 - ClP + O_2 \xrightarrow{Electrode} Q$	EG-B-CE	Amperometría		1000	(Pop et al., 2008)		
4-IP SPMF	CE-ICP	MS	17-9010	17	(Kannamkumarath et		
		-			al., 2004)		
4-CIP EOS	MW-	PED	357-7143		(Twiehaus et al., 2001)		
	IHePES	'ES			· · · · ·		
$(PCD): 4 - ClP \xrightarrow{NBD-F} dClP$	HPLC	$A_{225}$		31	(Higashi y Fujii, 2009)		
4-CIP SLME	HPLC	DAD	389—622	78	(Chimuka et al., 2007)		
		Δ	78 15557	30	(Sarafraz-Yazdi et al.,		
	TIFLO	<sup>2</sup> <b>1</b> <sub>225</sub>	10-10001	55	2010)		
4-CIP HF-LPME	HPLC	A <sub>269</sub>	39-3110	4	(Peng et al., 2007)		
4-BrP SPE	HPLC	Α	110-380		(Quintana et al., 2006)		

#### Tabla 1.4.1.4

(a) TYR: Tirosinasa o polifenoloxidasa; Q: 3-metil-1,4-benzoquinona; 4-CIP: 4-clorofenol; HQ: Hidroquinona; HRP: Peroxidasa de Rábano; NBD-F: 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol; dCIP : Clorofenol derivados; 4-IP: 4-lodofenol; 4-BrP: 4-Bromofenol; 4 FP: 4-Fluorofenol; SPME: Online solid phase microextraction; PCD: Precolumn derivatization; SPME :Solid phase microextraction; HF-LPME: Hollow fiber supported ionic liquid membrane extraction; SPE: Solid-phase extraction; EOS: Extraction with organic solvent.

(b) NP-HAp-GCE: Nano-porous hydroxyapatite glassy carbon electrode; CZE : Capillary zone electrophoresis; PVCMME: Polyvinylchloride matrix membrane electrode; EBS: Enzymatic Biosensor; IME-TISG: Enzyme immobilized in titania sol-gel; CNT/PPy/HRP: Carbon nanotube-polypyrrole with HRP composite; EG-B-CE : Expanded graphite based composite electrode; CE-ICP: Capillary electrophoresis inductively coupled plasma; MS: Mass spectrometry; MW-IHePES: Microwave-induced helium plasma excitation source; PED: Plasma emission

detector; HPLC: High performance liquid chromatography; GC-ECD: Gas chromatography with electron capture detector;  $A_{\lambda}$ : Absorbancia a la longitud de onda indicada; DAD: Diode array detector.

## 1.4.2. Fármacos fenólicos

Los fármacos fenólicos pueden pasar a los vertidos industriales en pequeña cantidad por fugas o averías, que pueden pasar inadvertidas a corto plazo, pero que a la larga puede llegar a generar grandes pérdidas, pues tienen gran valor añadido. El análisis de estos fármacos también es útil en ensayos de gestión de la calidad, en diversas etapas de su procesado industrial. Entre los fármacos fenólicos, se van a analizar en este trabajo (Figura 1.4.2) los alquilfenoles 4-terc-butilcatecol (4-TBC) y 4-terc-butilfenol (4-TBP), el paracetamol o acetaminofeno (APAP), la hidroquinona (HQ) y la arbutina (AR).





Estructura química de los fármacos fenólicos determinados en este trabajo.

Se ha comprobado que altas concentraciones de los alquilfenoles tienen efectos estrogénicos, tóxicos y cancerígenos (Barse et al., 2006). Los alquilfenoles se están utilizando extensamente durante décadas, por eso se encuentran de forma generalizada en las aguas residuales y subterráneas. Por tanto, en 2003 se creó la directiva europea 2003/53/CE que limitaba su concentración a 0.1 % (Fernandez-Sanjuan et al., 2012). Dentro de ellos, El 4-TBC es un compuesto derivado del catecol. Se utiliza en la industria de los polímeros (Thorneby-Andersson et al., 2000), como estabilizador e inhibidor de la polimerización de butadieno, acetato de vinilo, estireno y otras cadenas reactivas de monómeros (Kemmere et al., 1999), como estabilizador en la producción de espuma de poliuretano, como antioxidante en la producción de gomas sintéticas, polímeros y derivados de aceite, y como agente purificador para la catálisis de aminoformiato. La exposición en la piel a altas concentraciones de este compuesto, puede producir leucoderma que es un tipo de despigmentación (Thorneby-Andersson et al., 2000). El 4-TBP es derivado del fenol, también se utiliza como material de partida o intermedio en la industria de resinas, y altas concentraciones pueden ser causa de enfermedades degenerativas en la piel (Kosaka et al., 1991). Sin embargo, bajas concentraciones de 4-TBP y 4-TBC, pueden actuar como sustratos suicidas de tirosinasa, y como potenciales fármacos antitumorales contra el melanoma.

AP es el fármaco más utilizado como analgésico y antipirético (reductor de fiebre). También se usa en el post-tratamiento del cáncer o en los post-operatorios (Mazloum-Ardakani et al., 2012). Sin embargo, si se utiliza en grandes dosis puede provocar la acumulación tóxica de metabolitos, que pueden llegar a producir necrosis hepáticas agudas, induciendo a morbidez e incluso la muerte. Así que es muy importante controlar la cantidad de paracetamol en las preparaciones farmacéuticas (Ye et al., 2012b).

La hidroquinona se usa frecuentemente como reactivo industrial en la fabricación de gomas, plásticos, fármacos, y en cosméticos como despigmentante. También está presente en la orina y otras muestras biológicas, y se puede utilizar como indicador del riesgo ocupacional a los contaminantes fenólicos (Cao et al., 2012), Se cree que altas concentraciones de HQ produce leucemia (Regev et al., 2012) y problemas graves en la piel como ocronosis exógena, por un uso inapropiado de cosméticos despigmentantes sin receta médica (Tan et al., 2008a) y sin regulaciones legales. Este ingrediente cosmético se utiliza mucho en países asiáticos y africanos, donde el uso de estas cremas con una gran cantidad de hidroquinona

**Tesis Doctoral** 

1. Introducción

(>3%), durante largos periodos puede dar lugar a esta enfermedad, que ha tenido mucha repercusión en poblaciones negras (que quieren aclarar su piel) pero también se ha dado en otros grupos étnicos con piel sensible, que usan dosis más bajas de HQ (2%) en periodos cortos (< 6 meses) (Cao et al., 2012). Es necesario por tanto controlar la cantidad de hidroquinona, que se utiliza en los cosméticos y fármacos.

AR es una hidroquinona glicosilada abundante en las hojas de muchas plantas de especies distintas como el trigo, el peral y la gayuba entre otros. Se ha demostrado que arbutina es segura y no causa efectos adversos como toxicidad e irritación (Kang et al., 2011). Además, puede controlar la formación de melanina y la desaparición de manchas en la piel (Wei et al., 2007). Por ello se ha utilizado en la cosmética como agente blanqueante de la piel en Japón desde 1988, y de aquí se extendió al resto del mundo (Zen et al., 2011). AR actúa como antioxidante y despigmentante (Hori et al., 2004) y recientemente se ha comprobado que es efectiva en el postinflamatorio de la hiperpigmentación, por tanto se ha abierto un camino en los procesos inflamatorios aún en investigación (Lee y Kim, 2012). Sin embargo, arbutina puede tener efectos dañinos en la piel si se utiliza en exceso, por tanto su cantidad en cosméticos está regulada y la máxima concentración permitida de AR es un 7% (Chang y Chang, 2003). La arbutina (Tabla 1.4.2.1) se determina por métodos electroquímicos como la voltametría, y por métodos ópticos como la quimioluminiscencia, espectrometría de masas (Kong et al., 2010) y absorbancia (Barsoom et al., 2006; Huang et al., 2004; Lin et al., 2005; Thongchai et al., 2007, 2009). Para el caso de la hidroquinona (Tabla 1.4.2.2) los métodos electroquímicos utilizados (Ahammad et al., 2010; Kan et al., 2009; Zhang et al., 2009c) abarcan la voltametría (Amiri et al., 2012; de Oliveira y Vieira, 2006; de Oliveira et al., 2004; Du et al., 2011; Li et al., 2009b; Liu et al., 2011; Shervedani et al., 2009; Wang et al., 2010b; Yang et al., 2009; Zhang et al., 2009a; Zhang et al., 2009d) y amperometría (Zhang et al., 2009a). Entre los ópticos, se ha empleado la fluorescencia (Andreu-Navarro et al., 2012; Li et al., 2009a; Pistonesi et al., 2010) y la absorbancia (Stege et al., 2009; Uddin et al., 2011).

La determinación del paracetamol (Tabla 1.4.2.3) se ha realizado con métodos muy sensibles como los electroquímicos (Cervini y Gomes Cavalheiro, 2009; Mazloum-Ardakani et al., 2012; Odaci et al., 2006; Ye et al., 2012a), dentro de los cuales destacan la voltametría (Fanjul-Bolado et al., 2009; Fatibello et al., 2001; Liu et al., 2012; Muralidharan et al., 2009; Sotomayor et al., 2008; Vieira et al., 2003; Zhang et al., 2010) y amperometría (Silva et al., 2011b). Entre los métodos ópticos se han aplicado la espectrometría de masas (Meyer et al., 2011), espectrofotometría

(Bakeeva et al., 2010), fluorescencia (Li et al., 2012a; Madrakian et al., 2009) y absorbancia (Hadad et al., 2009; Solangi et al., 2011; Valero et al., 2003).

En cuanto a 4-TBC y 4-TBC (Tabla 1.4.2.4), se han desarrollado métodos analíticos amperométricos (Adamski et al., 2010; Kochana et al., 2008; Wu et al., 2008a), voltamétricos (Perez-Alonso et al., 2000), y cromatográficos con detección mediente espectrometría de masas (Adamski et al., 2010; Atapattu y Rosenfeld, 2011; Inoue et al., 2002; Kawaguchi et al., 2005; Kochana et al., 2008; Lopez-Darias et al., 2010; Perez-Alonso et al., 2000; Shu et al., 2012; Wu et al., 2012; Wu et al., 2008a; Xiao et al., 2009), fluorescencia (Wu et al., 2012) y absorbancia (Inoue et al., 2002; Kochana et al., 2003; Lopez-Darias et al., 2002; Kochana et al., 2008; Lopez-Darias et al., 2002; Kochana et al., 2009), fluorescencia (Wu et al., 2012) y absorbancia (Inoue et al., 2002; Kochana et al., 2008; Lopez-Darias et al., 2010; Shu et al., 2012).

metodos para la determinación de arbutina							
Extracciónª /Reacción	Operación¢	Detección	Intervalo	LOD	Referencia		
	operación	Detección	(nM)	(nM)	Referencia		
$AR + MnO_2 \xrightarrow{oxidación} AR_{ox} \xrightarrow{reducc.CE} AR_{red}$	OD-DES	Voltametría	367- 5509642	110	(Zen et al., 2011)		
$AR + MnO_4^- \xrightarrow{H-CHO} Mn^{+2} + AR_{OX}$	HPI C	Quimio-	1837-	735	(Wei et al. 2007)		
		luminiscencia	183655	100	(1101 01 01 01., 2001)		
AR LLE	UPLC	MS/MS	147-7346	132	(Kong et al., 2010)		
$A \mathbf{R} \perp A \perp A \mathbf{P}$ (CN) <sub>6</sub> Fe <sup>3+</sup> /OH <sup>-</sup> > <b>P</b> P	FI	A	3673-	147	(Thongchai et al.,		
		514	110193		2009)		
AR LLE	HPLC	A		73	(Thongchai et al.,		
		222		10	2007)		
$AR + IO_{1}^{-} \longrightarrow AR_{ov} + IO_{2}^{-}$	A	A	91827-	91827	(Barsoom et al.,		
- 4 0A - 5	300-500	514	459137		2006)		
AR LLE	OL-MDS-	$A_{254}$	100000-	15000	(Lin et al., 2005)		
	HPLC	254	20000000		(,,)		
AR LLE	HPLC	A <sub>280</sub>		55096	(Huang et al., 2004)		

Tabla 1.4.2.1

(a) AR: Arbutina; AR<sub>ox</sub>: Producto de oxidación de Arbutina; LLE: Liquid liquid extraction;4-AP: 4-aminoantipirina; RP: Producto rojo.
 (b) OD-DES: Online derivatization and disposable electrochemical sensor; HPLC-UV: High performance liquid chromatography; UPLC: Ultra

performance liquid chromatography; MS/MS : Tandem mass spectrometry;  $A_{\lambda}$  : Absorbance at the indicated wavelength; FI: Flow injection; OL-MDS: On-line microdialysis sampling.

Métodos para la determinación de hidroquinona							
Eutropolána (Dopoplán	Onorrosiánh	Detección	Intervalo		Deferencia		
Extraccion <sup>®</sup> /Reaccion	Operacions	Deteccion	(nM)	(nM)	Referencia		
$HQ \xrightarrow{Electrode} BQ$	CN-CHIT-HSA-CE	Voltametría	800- 100000	200	(Amiri et al., 2012)		
$HQ \xrightarrow{HRP} BQ$	HRP-BS-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -CHIT	Voltametría/ Amperometría	5- 70000	1	(Liu et al., 2011)		
$HQ \xrightarrow{Electrode} BQ$	GR/GCE	Voltametría	1000- 50000	15	(Du et al., 2011)		
$HQ \xrightarrow{Electrode} BQ$	SPCE-SWV	Voltametría	100- 50000	50	(Wang et al., 2010b)		
$HQ \xrightarrow{Electrode} BQ$	LDHf/GCE (DPV)	Voltametría	600- 6000000	100	(Li et al., 2009b)		
$HQ \xrightarrow{Electrode} BQ$	Poly-p-ABA/CGE	Voltametría	1200-600000	400	(Yang et al., 2009)		
$HQ \xrightarrow{Electrode} BQ$	PCV-GCE	Voltametría	4000- 3200000	80	(Zhang et al., 2009d)		
$HQ + H_2O_2 \xrightarrow{SG} BQ$	IECHBP(SWV)	Voltametría	250000- 5500000	2000	(de Oliveira y Vieira, 2006)		
$HQ + H_2O_2 \xrightarrow{POD} BQ$	IECM/CGE (DPV)	Voltametría	250000- 2400000	25000	(de Oliveira et al., 2004)		
HQ LLE	ULCCdSE	Electroquímico	600-5000000	11	(Cao et al., 2012)		
$HQ \xrightarrow{Electrode} BQ$	GCE	Electroquímico	500- 200000	160	(Ahammad et al., 2010)		
HQ LLE	ANN/BS	Electroquímico		15	(Zhang et al., 2009c)		
$ICG_{red} + HQ \xrightarrow{Laccase} ICG_{OX}$		$F_{806}^{764}$	50- 2000	10	(Andreu-Navarro et al., 2012)		
HQ LLE	MLRM	Espectro- fluorimetría	181- 1810	181	(Pistonesi et al., 2010)		
$PY + H^+ + BrO_3^- \xrightarrow{HQ} PY_{ox} + Br^-$	CRF	Fluorimetría	14532-40145	13	(Li et al., 2009a)		
$HQ \xrightarrow{AMV} BQ$		Absorbancia	227- 18164	64	(Uddin et al., 2011)		
HQ CPE	MEKCC	DAD		1.8	(Stege et al., 2009)		

Tabla 1.4.2.2

(a) HQ: Hidroquinona; BQ: o-Benzoquinona; HRP: Peroxidasa de rábano; SG: *Solanum gilo* como fuente de peroxidasa; POD: Extractos crudos de muchos vegetales (mandioca, maíz, ginger, guayava, piña, acelgas y chirimoya) como fuente de peroxidasa; ICG: Indocianina verde; AMV: Amonio meta-vanadato; PY: Pironina ; PY<sub>ox</sub>: Producto oxidado de PY; CPE: *Cloud point extraction*; LLE:*Liquid liquid extraction*.

(b) CN-CHIT-HSA-CE: Carbon nanoparticle-chitosan high surface area composite electrode; HRP-BS-Al-O<sub>3</sub>-CHIT :Horseradish peroxidase biosensor based on alumina nanoparticles-chitosan nanocomposites; GR/GCE : Glassy carbon electrode modified with Graphene; SPCE-SWV: Screen-printed carbon electrode and square wave technique; LDHf/GCE: Zn/Al layered double hydroxide film on glassy carbon electrode; Au-SA2MBI-Ag+ SAM : Imobilized silver on the topside of gold-5-amino-2-mercaptobenzimidazole self-assembled monolayer; PCV-GCE: Poly(crystal-violet) (PCV) electroactive film electrodeposited on a glassy carbon electrode; IECHBP: Immobilized enzyme in the chitosan biopolimer, IECM/CGE: Immobilized enzyme in a prepared chitosan matrix incorporated in a carbon paste electrode; ULCCdSE :Ultrathin crystalline CdSe

nanosheets; ANN/BS: Artificial neural networks combined with a biosensor;  $F_{em}^{ex}$ : Intensidad de fluorescencia en la longitud de emisión obtenida con la indicada longitud de excitación; MLRM: Multiple linear regression model; CRF: Catalitic resonance fluorescence; MEKCC:

Micellar electrokinetic capillary chromatography; DAD: Diode Array Detector.

Tabla 1.4.2.3
Métodos para la determinación de paracetamol

Extracción/Reacciónª	Operación <sup>ь</sup>	Detección	Intervalo (nM)	LOD (nM)	Referencia
	NMW-CPE	Electroquímico	5000- 2000000	89.5	(Mazloum-Ardakani et al., 2012)
$AP \xrightarrow{Electrode} AOBQ + +2H^+ + 2e^-$	LNT-CFO/GCE	Electroquímico	500- 901000	190	(Ye et al., 2012b)
AP LLE	MIPs/GPU-ME	Electroquímico		67	Cervini et al (2009)
$AP + O_2 \xrightarrow{LAC} AOBQ$	IE-DOPS	Electroquímico	3.2-20 (MED) 13-99 (no MED)		Odaci et al. (2006)
AP LLE	P-CCA/GCE (CV /DPV)	Voltametría		10	(Liu et al., 2012)
AP LLE	PEG y Nano- AuCPE	Voltametría	0.33-463.05	10	(Zhang et al., 2010)
$AP LLE$ $AP \xrightarrow{Electrode} AOBQ$	PPy/GCE	Voltametría	331-1654	298	(Muralidharan et al., 2009)
$AP \xrightarrow{Electrode} AOBQ$	NMDFeTPyPz/ GCE	Voltametría	4000- 420000	1200	(Sotomayor et al., 2008)
$AP + H_2O_2 \xrightarrow{ZUC} AOBQ$ $AOBQ \xrightarrow{Electrode} AP$	EMCPBS	Voltametría	120000- 2500000	69000	(Vieira et al., 2003)
$AP + O_2 \xrightarrow{TYR} AOBQ$ $AOBQ \xrightarrow{Electrode} AP$	EMVGBS	Voltametría	120000- 5800000	88000	(Fatibello et al., 2001)
$AP \xrightarrow{Electrode} AOBQ$	CNMSPCE	Amperometría/ Voltametría	250-100000 2500- 1000000	100 1000	(Fanjul-Bolado et al., 2009)
$AP \xrightarrow{Electrode} AOBQ$	FIA-MPA	Amperometría	6615- 994377	662	(Silva et al., 2011b)

	-		-		
Futuro osi é n/Do o osi é nº		Intervalo	LOD	Deferencia	
Extraccion/Reaccion <sup>a</sup>	Operacion	Deteccion	nM	nM	Referencia
AP LLE	GC	MS	66151- 1323014		(Meyer et al., 2011)
MADMSO	SP			3308	(Bakeeva et al., 2010)
AP LLE		$F_{em}^{ex}$	10-160	4.2	(Li et al., 2012a)
AP LLE	SF	$F_{380-550nm}^{300-350nm}$	26460- 132301	10716	(Madrakian et al., 2009)
AP LLE	CE	A <sub>260</sub>	33075- 3307500	6615	(Solangi et al., 2011)
AP LLE	RP-HPLC	A <sub>214</sub>	13230- 760733	132	(Hadad et al., 2009)
$AP + O_2 + MBTH \xrightarrow{TYR} AOBQ$	HPLC-UV	A <sub>443</sub>	10000- 1400000		(Valero et al., 2003)

### Tabla 1.4.2.3 (continuación)

Métodos para la determinación de paracetamol

(a) AP: Acetaminofeno, 4-acetilaminofenol o paracetamol; 4-AOBQ: 4-acetamino-o-benzoquinona; LAC: Lacasa; ZUC: Extracto crudo de calabacín; (*Cucurbita pepo*); TYR: TIrosinasa o Pollfenol oxidasa; MADMSO: *Micellar aqueous dimethylsulfoxide media*; MBTH: 3-metill-2-benzotiazolinona hidrazona.

(b ) NMM-CPE: nanostructured mesoporous material carbon paste electrode;  $F_{em}^{ex}$  : Intensidad de fluorescencia en la longitud de emisión

obtenida con la indicada longitud de excitación; LNT-CFO/GCE: LaNi<sub>0.5</sub>Ti<sub>0.5</sub>O<sub>3</sub> nanoparticle-modified glassy carbon electrode; MIPs/GPU-ME: Methacrylate polymer molecularly imprinted with paracetamol incroporated into a graphite-polyurethane matrix to prepare modified electrodes; IE-DOPS: Immobilized enzyme on a dissolved-oxygen probe surface; CV /DPV : Cyclic voltammetry or differential pulse voltammetry; P-CCA/GCE : Polycalconcarboxylic aci modified glassy carbon electrode; PEG y Nano-AuCPE: Poly glutamic acid and gold nanoparticles modified carbon paste electrode; PPy/GCE: Nano polypyrrole modified glassy carbon electrode; ); NMDFeTPyPz/GCE: Glassy carbon electrode surface with a Nafion (R) membrane doped with iron tetrapyridinoporphyrazine; EMCPBS: Carbon paste biosensor modified with enzyme; EMVGBS: Biosensor based on vaseline/graphite modified with avocado tissue (Persea americana) as the source of polyphenol oxidase (Enzyme); CNMSPCE: Carbon nanotubes modified screen-printed carbon electrodes; FIA-MPA :Flow injection analysis with multiple pulse amperometry; GC : Gas chromatography; MS: Mass spectrometry; SP: Spectrophotometric; SF: Spectrofluorometric; CE: Capillary electrophoresis; RP-HPLC: Reverse phase High performance liquid chromatography.

Métodos para la determinación de 4-tercbutilfenol y 4-tercbutilcatecol							
Extracción/Reacciónª	Oneración <sup>b</sup>	Detección	Intervalo	LOD	Referencia		
	operación	Deleccion	(nM)	(nM)	Neierencia		
$4 - TBC \xrightarrow{TYR/Electrode} o - TBQ$	Tvr-BS	Amperometría	0_650	27.0	(Adamski et al.,		
	Tyl-D0	Amperometria	0-050	21.5	2010)		
$A - TBC - \frac{TYR/LAC}{2} > 0 - TBO$		Amperometría	2000-		(Kochana et al.,		
$4-IBC \longrightarrow 0-IBQ$	IE-D3	Amperometria	89000		2008)		
	MMEKC	Amporomotría	33000-	7088	(Wu et al.,		
	WIWIERC	Amperometria	160000	7900	2008a)		
4-TBC LLE	CCEMEs	Voltametría	1000-	430	(Perez-Alonso		
	OOI ME3	Voltametha	100000	400	et al., 2000)		
					(Atapattu y		
4-TBP SPE y derivación	GC	MS	6.66-266	33.31	Rosenfeld,		
					2011)		
HSS $(4$ -TBP + propil acetato)	NACE	Quimio-	63.29-	63 29	(Xiao et al.,		
	NAOL	luminiscencia	19973	00.20	2009)		
4-TRP_SBSF/Derivación	TD-GC	MS		0 13	(Kawaguchi et		
	10 00	Mo		0.10	al., 2005)		
4-TBP SDME/DI I ME	HPI C	A	16 6-138 7	6 66	(Lopez-Darias		
		228	10.0 100.1	0.00	et al., 2010)		
4-TBC MS-USAEME	UPI C	A	33-	3 99	(Shu et al.,		
1 TBO MO OONEME	5	2 2/5	66578	0.00	2012)		
4-TBP	IC-ED-ED	$F^{^{260-440}}$	665779-	13	(Wu et al.,		
		1 350-450	66578	10	2012)		
4-TBP SPF	LC-FD	CAD	33-6657	0.13	(Inoue et al.,		
				0.10	2002)		

Tabla 1.4.2.4

(a) 4-TBC: 4-tercbutilcatecol; o-TBQ: o-tercbutilbenzoquinona; TYR: Tirosinasa o polifenoloxidasa; LAC: Lacasa; LLE: Liquid liquid extraction; 4-TBP 4-tercbutilfenol; HSS: Head Space programmed temperature; SBSE: Stir bar sorptive extraction; SDME/DLLME: Single-drop microextraction and dispersive liquid–liquid microextraction; MS-USAEME : Manual shaking-enhanced, Ultrasound-assisted emulsification microextraction.

(b) Tyr-BS: Tyrosinase based biosensor; IE-BS: Immobilized enzyme in a biosensor; MMEKC: Miniaturized micellar electrokinetic chromatography; CCFMEs: Cylindrical carbon fibre microelectrodes; GC: gas chromatography; NACE: Nonaqueous capillary electrophoresis; TD: Thermal desorption; HPLC: High performance liquid chromatography; UPLC: Ultraperformance liquid chromatography; IC-ED: Ion chromatography-online electrochemical derivatization;  $F_{em}^{ex}$ : Intensidad de fluorescencia en la longitud de emisión obtenida con la indicada longitud de excitación; LC-ED: Liquid chromatography with multi-electrode array detector; SPE: Solid phase extraction; CAD: Colorimetric array detection.

# 1.4.2. Fitoquímicos fenólicos

Los fitoquímicos son metabolitos secundarios que se encuentra naturalmente en las plantas (phyto significa planta en griego), y son útiles para la supervivencia de la planta, pues la defienden ante el ataque microbiano, y el consumo por los hervíboros (Liu et al., 2008). Por ello, algunos fitoquímicos tienen intensas propiedades organolépticas, como el color violeta intenso de los arándanos o el olor del ajo. El término se aplica habitualmente a los metabolitos secundarios, con importancia biológica sin ser establecidos como nutrientes esenciales (FDA, 2009). Dentro de los fitoquímicos tienen especial interés los fitoquímicos fenólicos, metabolitos muy abundantes en plantas y beneficiosos para la salud. Numerosos estudios preclínicos revelan que estos compuestos tienen una gran acción protectora hacia numerosas condiciones patológicas, sobre todo hacia aquellas que tienen que ver con el estrés oxidativo, como las enfermedades cardiovasculares y los desórdenes metabólicos. Además, estos polifenoles pueden suprimir el tejido adiposo a través de su acción antiangiogénica, y modulando el metabolismo de los adipocitos. Otros beneficios están relacionados con infecciones, el cáncer y los procesos autoinmunes y neurodegenerativos. Los polifenoles juegan también un papel muy importante como indicadores de la calidad de los vegetales donde se encuentran, influyendo en el color, el aroma, la textura y atributos sensoriales de bebidas como vinos, zumos, café y té (de Carvalho et al., 2008). Estas saludables propiedades han favorecido la creciente producción, de suplementos alimenticios con fitoquímicos fenólicos, cuyo análisis químico es útil para garantizar la calidad de estos productos comerciales.

Los polifenoles analizados en este trabajo, tienen de uno a varios grupos fenólicos con otros sustituyentes aromáticos. En cuanto a su estructura (número de anillos fenólicos y el tipo de grupos que se unen al anillo), estos polifenoles pueden agruparse en distintas clases (Gonzalez-Castejon y Rodriguez-Casado, 2011) (Figura 1.4.3):

- Ácidos hidroxicinámicos como los ácidos ferúlico, cafeico y clorogénico
- Fenil propanoides como el tirosol.
- Cumarinas como la esculetina.
- Taninos hidrolizables como el galato de metilo y el ácido elágico.

1. Introducción





Estructura química de los fitoquímicos fenólicos determinados en este trabajo.

Tabla 1.4.3.1								
Métodos para la determinación de ácido ferúlico y ácido elágico								
Extraccióna /Poposión	Oporosiónh Dotosoi		Intervalo	LOD	Poforoncia			
	Operacion	Deleccion	(nM)	nM)	Referencia			
$EA LLE;$ $EA \xrightarrow{Electrode} EA_{ox}$	CGE-SWV	Voltametría	100-1500	10	(Cuartero et al., 2011)			
EALLE	CE	Amperometría	1030- 61798	178	(Li et al., 2011)			
FA LLE	CE	Amperometría	1030- 514975	479	(Jin et al., 2009)			
FA ULLE	CZE	Amperometría	257- 25749	51	(Zhang et al., 2008)			
$FA \xrightarrow{HRP/TYR} Q \xrightarrow{Electrode} FA$	IE/SNGC	Amperometría		1.6/0.82	(ElKaoutit et al., 2008)			
FA ULLE	HPLC	EC	824- 82396	38	(Liang et al., 2009)			
ULLE	HPLC	MS/MS	11.84-1184	3.09	(Xie et al., 2011)			
EA LLE	UPLC/Q-TOF- HCMS-DAD	MS / $A_{ m 260}$	8141- 407060	2080	(Gasperotti et al., 2010)			
$\begin{array}{c} EA + Na_2B_4O_7 \xrightarrow{MeOH} \\ Complejo \end{array}$	Fluorescencia	$F^{447}_{387}$	25-750	4	(Sadecka y Tothova, 2012)			
FA MEPS	UHPLC-DAD	A <sub>280</sub>	5150- 128747	438	(Goncalves et al., 2012)			
FA LLE	HPLC	DAD	2575- 205.994	103	(Weon et al., 2012)			
FA ILDLPME	HPLC	A	0.66- 13390	0.05	(Wang et al., 2012)			
FA HLBS	UHPLC-DAD	A		72	(Silva et al., 2011a)			
FA LPME/BE	HPLC			1287439	(Wang et al., 2009b)			
FALLE	FASS-Sweep- -MEKC			21	(Li et al., 2008)			

Tabla 1.4.3.1 (Continuación)								
Métodos para la determinación de ácido ferúlico y ácido elágico								
Extracción <sup>a</sup> /Reacción	Operación <sup>b</sup>	Detección	Intervalo	LOD	Referencia			
		Detteren	nM	nM				
FALLE	HPLC	Α	23594-	728	(Qu et al., 2012)			
		21	377237	0	(000 00 0, 20 . 2)			
$FA \xrightarrow{HRP/H_2O_2} O - I$	IF/STY-DVB-PGA	A	5941-	500	(Isik et al. 2011)			
		- 510	49510	000				
FAILLE	FALLULE HDLC 4 5760-		5760-		(Dhooghe et al.,			
		<sup>2</sup> <b>1</b> 254	69193		2011)			
		Δ	6618200-	2200100	(Shinde et al.,			
	TIFEG	A <sub>280</sub>	66182000	3309100	2008)			
ΕΔΙΙΕ	BESC	Δ	131702-	7280	(Zhou et al.,			
	ы бо	<sup>2</sup> <b>1</b> <sub>254</sub>	1053617	7200	2008a)			
FALLE	RP-HPI C	Δ		32/13	(Teresa Diez et			
		2 280		0240	al., 2008)			
EA LILLE + Evanoración		Δ	16545-	4633	(del Moral et al.,			
		<sup>1</sup> <b>1</b> 360	330910	4000	2007)			
	HPLC/Espectro	ΔΙΔ		331/662	(Bala et al. 2006)			
	fotométrico	fotométrico A <sub>255</sub> / A <sub>360</sub>		3317002				

(a) EA: Ácido Elágico; EA<sub>ox</sub>=Compuesto oxidado del Ácido Elágico; FA: Ácido Ferúlico; LLE: Liquid liquid extraction; ULLE: Ultrasonication and liquid liquid extraction; HRP: Peroxidasa de rábano; TYR: Tirosinasa o Polifenol oxidasa; Q: o-quinona; MEPS: Microextraction by packed sorbent; ILDLPME: Ionic liquid dispersive liquid phase microextraction;HLBS: Hydrophilic-lipophilic balanced sorbent ; LPME/BE: Liquid phase microextraction with back extraction; XAD-7: Styrene-divinylbenzene resin; Q-I: Producto coloreado quinona-imina a 510 nm; DMSO: Dimetil sulfoxido.

(b) CGE-SWV: Carbon glassy electrode with square-wave voltammetry; CE: Capillary electrophoresis; CZE: Capillary zone electrophoresis; IE/SNGC: Immobilized enzyme on sonogel-carbon based biosensor; HPLC: High performance liquid chromatography; CE: Electrochemical; MS/MS: Tandem mass spectrometry; UPLC-Q-TOF-HCMS-DAD: Ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole, hybrid

orthogonal acceleration time-of-flight tandem mass spectrometer and diode array detector, A2 = Absorbancia a la longitud de onda

indicada;  $F_{em}^{ex}$ : Intensidad de fluorescencia en la longitud de emisión obtenida con la indicada longitud de excitación; UHPLC-DAD:

Ultrahigh pressure liquid chromatography with a photodiode array; FASS-Sweep-MEKC: Field amplified sample stacking and sleeping micellar electrokinetic chromatography; IE/STY-DVB-PGA: Inmobilized enzyme on styrene-divinylbenzene-polygluteraldehyde; BFSC: Bare fused-silica capillary; RP: Reverse phase; IP: Ion pair.

Métodos para la determinación de ácido cafeico						
Extracción <sup>a</sup>	Operación <sup>b</sup>	Detección	Intervalo	LOD	Poforonoia	
/Reacción	Operación	Deleccion	(nM)	(nM)	Referencia	
$CA \xrightarrow{Electrode} Q$	PbFE	Voltametría	10-500	4	(Tyszczuk et al., 2011)	
CALLE	CE-AD	Amperometría	2220- 133215	2680	(Li et al., 2011)	
CA ULLE	CE-ED	Amperometría	956-477807	500	(Jin et al., 2009)	
CA ULLE	CZE	Amperometría	555-55506	167	(Zhang et al., 2008)	
CA ULLE	HPLC	EC	824-82396	21	(Liang et al., 2009)	
$CA \xrightarrow{LAC/TYR/HRP} Q$ $Q \xrightarrow{Electrode} CA$	IE/SNGC	Amperometría		0.3/7.9/1.1	(ElKaoutit et al., 2008)	
CALLE	HPLC-DAD-ESI	$A_{252}$ -MS	22202- 716030	166.52	(Ruan et al., 2012)	
CA ULLE	HPLC-DAD-ESI	$A_{252}$ -MS	1388-55506	111.01	(He et al., 2011a)	
CA ULLE	HPLC	MS/MS	86.03-8603	11.66	(Xie et al., 2011)	
CALLE	LC-ESI	MS/MS		11982	(Wang et al., 2008a)	
CA PPT-DD	HPLC	MS/MS	55.5-55500		(Tang y Sojinu, 2012b)	
CALLE	LVSS-sweeping- MEKC	A <sub>213</sub>	5.6-87.1	155.4	(Huang et al., 2012)	
CA S/A-HE	HPLC-DAD	A <sub>252</sub>		444.05	(Sahin et al., 2011)	
CA TRBSS-LPME	HPLC	A <sub>252</sub>	122-59947	5.55	(Wang et al., 2010a)	

### Tabla 1.4.3.2

	Métodos para la determinación de ácido cafeico							
Extracciónª	Operación <sup>b</sup>	Detección	Intervalo	LOD	Referencia			
/Reacción	operación	Detection	(nM)	(nM)	Kelefenela			
CA LLE	HPLC	A <sub>252</sub>	2822- 423358	56	(Li et al., 2009c)			
ULLE	RPLC	DAD	2220- 2220249	27.8	(Lu et al., 2009)			
ULLE	CZEARBM	DAD	13877- 555062	422	(Cheung y Zhang, 2008)			
RLLE	HPLC	DAD	8159- 326155	266	(Tan et al., 2008b)			
CA LPME/BE	HPLC			138766	(Fu et al., 2009)			
CA SPE XAD-4+ ILLE	HPLC	A <sub>327.5</sub>		1665	(Liu et al., 2008)			
CA ULL	CZE-UV y HPLC	A <sub>323</sub>		110 y 166	(Kvasnicka et al., 2008)			
CA LLE	FASS-Sweep-MEKC			28	(Li et al., 2008)			

#### Tabla 1.4.3.2 (Continuación)

a) CA: Ácido Cafeico; ULLE: Ultrasonication and liquid liquid extraction; TYR: Tirosinasa o polifenol oxidasa; Q: o-quinona; LAC: Lacasa de Trametes versicolor; HRP: Peroxidasa de rábano; DMSO: Dimetil sulfóxido; LLLE: Liquid liquid extraction; PPT-DD: Protein precipitation treatment and Direct dilution; S/A-HE: Solvent acid hydrolysis extraction; RTBSS-LPME: Time-resolved binary-solvent synergy liquid-phase microextraction; RLLE: Refluxing liquid extraction; XAD-4: Styrene-divinylbenzene resin;
 (b) PbFE: Lead film electrode; CE-AD: Capillary electrophoresis with amperometric detection; CE-ED: Capillary electrophoresis with electrochemical determination; CZE: Capillary zone electrophoresis; EC: Electrochemical detection; HPLC: High performance liquid chromatography, IE/SNGC: Immobilized enzyme on sonogel-carbon based biosensor; MS: Mass spectrometry; HPLC-DAD-ESI: High performance

liquid chromatography with diode array detector and electrospray ionization interface mass spectrometer;  $A_{\lambda}$  = Absorbancia a la longitude de

onda indicada; LC-ESI: Liquid chromatography coupled to electrospray; MS-MS :Tandem mass spectrometry; LVSS-sweeping-MEKC: Large volume sample stacking-Swepping micellar electrokinetic chromatography; RPLC: Reverse phase liquid chromatography; CZEARBM: Capillary zone electrophoresis with the addition of running buffer modifiers; FASS-Sweep-MEKC: Field amplified sample stacking and sleeping micellar electrokinetic chromatography

El ácido ferúlico (FA; ácido 3-metoxi-4-hidroxicinámico), es uno de los mayores constituyentes fenólicos en el aceite de salvado de arroz, y tiene fuerte actividad antioxidante *in vitro* (Sudheer et al., 2007b). Se ha encontrado en otros cereales como avena, trigo y en granos de café, manzanas, cacahuetes, naranjas, piña y alcachofa (Nicholson et al., 2008). El ácido ferúlico tiene propiedades hipolipidémicas, y puede ser efectivo en disminuir el riesgo de obesidad, inducida por una dieta grasa (Son et al., 2010). Reduce los niveles de colesterol en suero, protege contra el daño en el hígado, y es un potente inhibidor de la proliferación tumoral *in vitro* (Srinivasan et al., 2007; Wilson et al., 2007).

El ácido cafeico (CA; ácido 3,4-dihidroxicinámico) está ampliamente distribuido en plantas superiores como glicósidos, ésteres y en forma libre. Su éster, es un componente del própoleo, un producto de las colmenas de abejas, que tiene propiedades anticarcinogénicas e inmunomodulatorias. CA es uno de los componentes esenciales en la defensa de la planta ante infecciones, exhibe potente y selectiva actividad inhibidora contra la integrasa del virus de inmunodeficiencia tipo I (HIV-I), y puede inhibir su replicación con moderada actividad anti-HIV en cultivos (Tyszczuk et al., 2011). También se puede utilizar para combatir el asma, y enfermedades alérgicoinflamatorias (Uang et al., 1995).

El ácido clorogénico (CGA), un éster formado entre los ácidos cafeico y quinico, es el principal polifenol encontrado en el café. El café es una bebida farmacológicamente activa gracias a estos polifenoles, y se ha comprobado que tiene beneficiosos efectos neurológicos, en desórdenes metabólicos, en respuestas psicoactivas y en funciones del riñón. El contenido en CGA es un importante indicador de su calidad, y muestra gran dependencia con el grado de tostado, el tipo de tostador y el método de infusión pues el tostado degrada del 32-52 % de CGA en los granos de café, y es fácilmente hidrolizado a ácido cafeico y quínico, compuestos responsables del sabor amargo y astringente (Fernandes et al., 2009). Por tanto, la determinación de CGA es un aspecto muy importante en el control de calidad del producto final, pues sus características aromáticas determinan su valor comercial (de Carvalho et al., 2008) Además, CGA es un ingrediente potencial de plantas medicinales, por ejemplo, la planta medicinal Epidogrammitis drymoglossoides (Baker) Ching (L. drymoglossoides), miembro de la familia de Polypodiaceae, la cual se usa para el tratamiento de numerosas enfermedades en la medicina tradicional china. Por tanto, la medida de CGA es también importante en plantas medicinales como control de calidad (Wen et al., 2012).

Métodos para la determinación del ácido clorogénico						
Extracciónª /Reacción	Operación <sup>b</sup> Detección		Intervalo	LOD	Referencia	
	operación	Detection	(nM)	(nM)	Referencia	
$CGA \xrightarrow{Surfact.C_{19}H_{42}N^+} CGA_{red}$	ססט	Voltametría	990-	236	(de Araujo et al. 2009)	
	DIT	Voltametria	10400	200		
$CGA \xrightarrow{TYR} Q \xrightarrow{Electrodo} CGA$	S////	Voltametría	3480-	015	(Fernandes et al.,	
	300	Voltametria	49500	515	2009)	
$CGA \xrightarrow{Cu(II)} Q \xrightarrow{Electrodo} CGA$	SWV	Voltametría	5000-	800	(de Carvalho et al.,	
	0	Voltamouna	145000	000	2008)	
$CGA + H_2O_2 \xrightarrow{POD} CGA$	IE-SWV	Voltametría	4890-	802	(Moccelini et al., 2008)	
	12 0111	Voltamound	48500	002	(	
CGALLE	HPLC-DAD-	AMS	6491-	169	(Ruan et al. 2012)	
	ESI	252	208856	100	(14411 07 411, 2012)	
CGA ULLE	HPLC-DAD-	$A_{252}$ -MS	1129-	169	(He et al., 2011a)	
	ESI	252 -	44029		(	
CGA ULLE	HPLC	MS/MS	28.2-	5.65	(Xie et al., 2011)	
			1411			
CGA S/A-HE	HPLC-	A <sub>252</sub>		367	(Sahin et al., 2011)	
CGA LLE	HPLC-DAD-	DAD v MS		1581	(Saleem et al., 2009)	
	APCI				(	
CGA MAE	nano-LC-	MS	2.3-5.6	1.41	(Hu et al., 2009a)	
	ESI				(,	

Tabla 1.4.3.3

Métodos para la determinación del ácido clorogénico						
Extracciónª /Reacción	Operación <sup>b</sup> Detecció		Intervalo	LOD	Referencia	
	operación	Detection	(nM)	(nM)	Referencia	
CGA LLE	LC-ESI	MS-MS		1062	(Wang et al., 2008b)	
CGALLE	CE-DAD	A	28224-	6490	(Eukuiietal 2010)	
	02 07 0	200	211679	0100		
CGA TRBSS-LPME	LC	Aasa	14.1-	2.82	(Wang et al., 2010a)	
		252	38102		(	
CGA ULLE	HPLC	DAD	3387-	28.2	(Lu et al., 2009)	
			338686		(	
CGA ULLE	HPLC	DAD	4064-	1129	(Xu et al., 2009)	
	_		259660		( , ,	
CGA SPE C18 column + LLE	HPLC	Absorbancia		0.84	(Hrobonova et al.,	
					2009)	
CGA SPE- XAD-7+ LLE	HPLC	A <sub>327.5</sub>		564	(Liu et al., 2009a)	
CGA ULLE	CZE o	Ann		706 o	(Kvasnicka et al., 2008)	
	HPLC	325		56	(	
CGA RU E	HPLC-DAD	DAD	219638-	23	(Tan et al., 2008b)	
	19 0/10	2.10	8783269	_0	(101101011, 20000)	

### Tabla 1.4.3.3 (Continuación)

(a) CGA: Ácido Clorogénico; CGA<sub>red</sub>: Producto de reducción del CGA; TYR: Tirosinasa o Polifenol oxidasa; Q: o-quinona; POD: Peroxidasa de brotes de soja;CGA<sub>ox</sub>: Producto de oxidación de CGA; XAD-7: Styrene-divinylbenzene resin; LLE: Liquid liquid extraction; DMSO: Dimethyl sulfoxide; S/A-HE: Solvent acid hydrolysis extraction; MAE: Microwave-assisted extraction; ULLE: Ultrasonication and liquid liquid extraction; SPE: Solid phase extraction

(b) DPP: Differential-pulse voltammetry;; SWV: Square wave voltammetry; MS: Mass spectrometry; IE: Immobilized enzyme; HPLC-DAD-ESI : High performance liquid chromatography with diode array detector and electrospray ionization interface; HPLC-DAD-APCI: High performance liquid chromatography with diode array detector equipped with atmospheric pressure chemical and mass selective ionization; HPLC;: High performance liquid chromatography ; MS/MS: Tandem mass spectrometer; CE: Capillary electrophoresis; RTBSS: Time-resolved binary-solvent synergy liquid-phase microextraction;; nano-LC-ESI: Nano-liquid chromatography-electrospray ionization;  $A_{\lambda}$  = Absorbance at the indicated wavelenght;; CZE-UV: Capillary zone electrophoresis with ultraviolet-visible detection; LC-ESI: Liquid chromatography coupled to electrospray. **Tesis Doctoral** 

El tirosol (TOL; 4-(2-hidroxietil)fenol) es un componente del aceite de oliva virgen, especialmente el recién prensado o el extra virgen, que contribuye a su poder antioxidante, antiinflamatorio y antiaterosclerótico. Este compuesto junto con otros derivados, contribuye considerablemente a la estabilidad oxidativa del aceite, ayuda a preservar las defensas celulares antioxidantes, e induce la supervivencia de las proteínas, probablemente a través de acumulación intracelular (Rodriguez-Gutierrez et al., 2011), y además es responsable del amargor y astringencia del aceite de oliva (Bonoli et al., 2003). El tirosol, como otros polifenoles, se encuentra en plantas usadas en la medicina tradicional china, como es en *Rhodiola rosea L*, que se usa ampliamente para tratar la fatiga, el asma, hemorragias, anemias, impotencia y desórdenes del sistema nervioso. Al ser el tirosol uno de los biocomponentes mayoritarios, se utiliza para evaluar la calidad de los fármacos de estas plantas (Chen et al., 2011).

Esculetina (ESC; 6,7-dihidroxicumarina) es una aglicona que proviene de la esculina, y es una de las cumarinas más simples, con dos grupos hidroxilos en los carbonos 6 y 7 que sirven de diana para la O-metilación u O-glicosilación. Está presente en plantas medicinales chinas como Oleaceae Fraxinus rhynchophylla, F. chinensis, F. szaboana y F. stylosa, principalmente distribuidas en el norte de China. Estas plantas están listadas oficialmente en la Farmacopea China, pues se ha comprobado que es eficaz en el tratamiento de la diarrea y de la disentería en China, durante más de 2000 años. También se ha comprobado en Corea, Japón e India, que tratan la artritis y gota mejorando la secreción de ácido úrico. Es uno de los mayores bioactivos presentes en estas plantas, y tiene fuerte actividad antioxidante y fotoprotectora. También posee múltiples efectos inmunomodulatorios en linfocitos murinos, y en macrófagos peritoneales de hígados de rata, incluyendo actividad antiinflamatoria, inhibición de la actividad lipoxigenasa y tirosinasa, atrapador de radicales hidroxilo y supresor de peroxidación de lípidos (Li et al., 2012b). Se encuentra también en otras plantas como Artemisiae scoparia, Artemisiae capillaries, Ceratostigma willmottianum y Citrus limonia, que también tiene múltiples beneficios. Por tanto, el control de esculetina en estas y otras plantas, puede favorecer el efecto farmacológico deseado, ayudando a prevenir el uso incorrecto de las medicinas tradicionales asiáticas. También proporciona información útil para identificar qué plantas se pueden considerar medicinales o no, dependiendo de la cantidad de compuesto bioactivo que lleven (Yun et al., 2012).

102

Métodos para la determinaciónde esculetina, tirosol y galato de metilo							
Extracción/Bosocióna	Oporacióna		Intervalo	LOD	Poforonoia		
	Operacion	Deleccion	(nM)	(nM)	Referencia		
FIASE ESC	CE	Amperometría		273	(Gan et al., 2012)		
LLE dESC	GN-IL-VB	Voltametría	400-9860	100	(Zapp et al., 2011)		
LLE TOL	HPLC	Fluorescencia		50.66	(Pineiro et al., 2011)		
LLE ESC	CZE-ILIFD	$F_{520}^{488}$	150000- 4420000	7800	(Wang et al., 2007)		
SPE TOL	HPLC-MS/MS	MS	3.2	1.8	(Orozco-Solano et al., 2012)		
LLE TOL	UHPLC-MS/MS	MS	10-1000	15.2	(Gregus et al., 2010)		
LLE TOL	LC-ESI MS/MS	MS		14.5	(Bazoti et al., 2006)		
MAE TOL	HPLC-APCI-MS	MS		58	(Wang et al., 2006)		
SPE ESC	HPLC-MS/MS	MS	7-898	7	(Li et al., 2012b)		
LLE ESC	LC-ESI MS	MS	70.1-1010	70.17	(Liu et al., 2009b)		
LLE ESC	HPLC-DAD- ESI-MS	$A_{ m 254}$ / MS	28.2	8	(Zhou et al., 2008b)		
LLE TOL	HPLC	$A_{200}$	362- 361888	83	(Rodriguez-Gutierrez et al., 2011)		

Tabla 1.4.3.4

Métodos para la determinación de esculetina, tirosol y galato de metilo					
Extracción/Reacciónª	Operaciónª	Detección	Intervalo	LOD	Referencia
			(nM)	(nM)	
LLE TOL	HPLC	$A_{200}$	362-	83	(Rodriguez-Gutierrez et
			361888		al., 2011)
LLE ESC	HPLC-UV	A <sub>335</sub>		132	(Adam et al., 2009)
ULLE TOL	RP CEC-DAD	$A_{200}$	9047-	4524	(Aturki et al., 2008)
			1447555		
DLLME GAME	RRLC	A <sub>205-220</sub>	361888-	6.15	(Ma et al., 2011)
			5790220		
RP-DLLME GAME	HPLC	Absorbancia		231	(Hashemi et al., 2011)
LLE GAME	HPLC	A <sub>254</sub>	54300-		(Fecka, 2009)
			543000		
Precipitación GAME	MEKC	$A_{254}$		1000	(Hsieh et al., 2006)

#### Tabla 1.4.3.4 (Continuación)

(a) ESC: Esculetina; TOL: Tirosol; GAME: Galato de metilo;SPE: Solid phase extraction;LLE: Liquid liquid extraction; ULLE: Ultrasonication and liquid liquid extraction; MAE: Microwave-assisted extraction;FIASE: Far infrared-assisted solvent extraction; DLLME: Dispersive Liquid-Liquid Microextraction.

(b) HPLC: High Pressure Liquid Cromatography; MS/MS: Tandem mass spectrometry;  $A_{\lambda}$  = Absorbancia a la longitude de onda

indicada; UHPLC: ultra high performance liquid chromatography in connection with tandem mass spectrometry; RP CEC: Reversed phase capillary electrochromatography; DAD: Diode Array Detector; LC-ESI MS/MS: Liquid chromatographyelectrospray ionization-tandem mass spectrometry; HPLC-APCI-MS: Liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry; CE: Capillary Electrophoresis; GN-IL-VB: Gold nanoparticles dispersed on lonic Liquid applied on a Voltammetric Biosensor; RRLC: Rapid Resolution Liquid Chromatography; RP-DLLME : Reversed-phase dispersive liquid-liquid

microextraction;  $F_{em}^{ex}$ : Intensidad de fluorescencia en la longitud de emisión obtenida con la indicada longitud de excitación;

CZE-ILIFD : Capillary zone electrophoresis with indirect laser-induced fluorescente detection; MEKCC: Micellar electrokinetic capillary chromatography.
El ácido elágico (EA; 2,3,7,8-tetrahydroxybenzopyrano[5,4,3-cde]benzopyran-5-10-dione), un dímero derivado del ácido gálico, se encuentra en numerosas frutas como la granada, fresa, arándano, frambuesa y frutos secos como la nuez, usualmente en forma de taninos hidrolizables llamados elagitaninos (Sudheer et al., 2007a). Es uno de los polifenoles más estudiados (Sadecka y Tothova, 2012), debido a sus múltiples efectos farmacológicos, como anticancerígeno, antibacteriano y antiinflamatorio. Puede inhibir también a varias enzimas modificadoras de ADN incluyendo a topoisomerasas I y II, girasa y polimerasa, y también inhibe el crecimiento de células cancerígenas (Thulstrup et al., 1999). Actúa también como antioxidante, cuyos grupos hidroxilo pueden neutralizar los radicales peroxilo (Gil et al., 2000). Un ejemplo donde se utiliza la determinación de EA es en el brandy, licor que proviene del vino, madurado como mínimo un año en contenedores de madera de roble, o medio año en barricas de roble. Durante este proceso de envejecimiento el contenido en EA aumenta, probablemente por extracción directa de EA libre, e hidrólisis de elagitaninos de la madera. Así pues, el contenido de EA es muy importante para la evaluación de la autenticidad del brandy, como un marcador del envejecimiento en la madera, para la diferenciación de brandies de acuerdo con la especie botánica de la que proceden, el origen geográfico de la madera y la calidad de los productos finales (sabor, olor y color)(Sadecka y Tothova, 2012).

El galato de metilo (GAME) es un tanino hidrolizable que se encuentra en plantas como *Klainedoxa gabonensis Pierre ex Engl. (Irvingiaceae),* en la *Rosa canina* y ulmaria y tiene efectos antimicrobiano y antioxidante (Fecka, 2009; Wansi et al., 2010). Se ha comprobado que la planta ulmaria tiene propiedades astringentes, antiácidas, anti-úlceras, anti-reumáticas, propiedades inmunomodulatorias y citotóxicas aunque no hay evidencias de datos humanos (Spiridonov et al., 2005). Por otro lado, la rosa canina inhibe la oxidación de lípidos *in vitro* y reduce la quimioluminiscencia y quimiotaxis de los leucocitos. Hay pruebas que señalan que el fármaco de rosa canina mejora la movilidad, reduce el dolor en articulaciones y puede aliviar los síntomas de osteoartritis (Fecka, 2009).

Los métodos más utilizados para la determinación del ácido ferúlico y ácido (Tabla 1.4.3.1), comprenden métodos electroquímicos (Liang et al., 2009),tanto voltametricos (Bala et al., 2006; Cuartero et al., 2011), como amperométricos (ElKaoutit et al., 2008; Jin et al., 2009; Li et al., 2011; Zhang et al., 2008). Entre los métodos ópticos, se han utilizado la espectrometría de masas (Gasperotti et al., 2010; Xie et al., 2011) y la absorbancia (Bala et al., 2006;(del Moral et al., 2007; Dhooghe et

al., 2011; Goncalves et al., 2012; Isik et al., 2011; Li et al., 2008; Qu et al., 2012; Shinde et al., 2008; Silva et al., 2011a; Teresa Diez et al., 2008; Wang et al., 2012; Wang et al., 2009b; Weon et al., 2012; Zhou et al., 2008a)

En la determinación del ácido cafeico (Tabla 1.4.3.2) se han descrito los métodos electroquímicos, voltamétricos (Tyszczuk et al., 2011) y amperométricos (ElKaoutit et al., 2008; Jin et al., 2009; Li et al., 2011; Zhang et al., 2008). Entre los ópticos destacan la espectrometría de masas (He et al., 2011a; Ruan et al., 2012; Tang y Sojinu, 2012a; Wang et al., 2008a) y la absorbancia (Cheung y Zhang, 2008; Fu et al., 2009; Huang et al., 2012; Kvasnicka et al., 2008; Li et al., 2009c; Lu et al., 2009; Sahin et al., 2011; Tan et al., 2008b; Wang et al., 2010a).

En cuanto al ácido clorogénico (Tabla 1.4.3.3), la determinación electroquímica se ha realizado por voltametría (de Araujo et al., 2009; de Carvalho et al., 2008; Fernandes et al., 2009; Moccelini et al., 2008) .Dentro de los métodos ópticos, se ha aplicado la espectrometría de masas (Fukuji et al., 2010; He et al., 2011a; He et al., 2011b; Hrobonova et al., 2009; Hu et al., 2009a; Lu et al., 2009; Ruan et al., 2012; Saleem et al., 2009; Wang et al., 2008b; Xie et al., 2004; Xu et al., 2009), la absorbancia (Hrobonova et al., 2009; Kvasnicka et al., 2008; Liu et al., 2008; Sahin et al., 2011; Tan et al., 2008b; Wang et al., 2010a).

Por último, las determinaciones de esculetina, tirosol y galato de metilo (Tabla 1.4.3.4), abarcan dos métodos electroquímicos, un método voltamétrico (Zapp et al., 2011) y otro amperométrico (Gan et al., 2012), para la determinación de esculetina. Entre los métodos ópticos, destacan la espectrometría de masas para la determinación de tirosol (Bazoti et al., 2006; Gregus et al., 2010; Orozco-Solano et al., 2012; Wang et al., 2006) , la fluorescencia para las determinaciones de tirosol (Pineiro et al., 2011) y de esculetina (Wang et al., 2007), y la absorbancia para las determinaciónes de tirosol (Rodriguez-Gutierrez et al., 2011), de esculetina (Adam et al., 2009; Hashemi et al., 2011; Ma et al., 2011; Zhou et al., 2008b) y de metil galato (Hsieh et al., 2006).



### 2. OBJETIVOS

#### 2.0 OBJECTIVES

In base to the bibliography reviewed and the previous experience of the research team, these are the general and specific objectives proposed in this Thesis Memory.

#### 2.0.1 General objectives

The study of the existing bibliography and the realization of preliminary assays, that permit the proposition of a reaction mechanism with its corresponding kinetic analysis, to develop an experimental design for the characterization of the enzymatic system of interest, in order to overcome other methods described by other authors.

**Chapter 4**. Kinetic characterization and optimization of a spectrophotometric method, for the enzymatic biodegradation by peroxidases, of the dyes Indigo Carmine (IC) and Remazol Brilliant Blue Royal (RBBR).

**Chapter 5.** Kinetic characterization and optimization of the IC biodegradation, by enzyme-mediator systems in the presence of natural mediators.

**Chapter 6.** Kinetic characterization and optimization of the RBBR biodegradation, by laccase-mediator systems with natural mediators.

**Chapter 7**. Kinetic characterization and optimization of the determination of bioactive phenols, by using a spectrophotometric and ultrasensitive method of enzymatic bioanalysis.

#### 2.0.2 Specific objectives

#### Chapter 4.

4.1) Preliminary spectrophotometric and chromatographic assays, on the IC and RBBR biodegradation catalyzed by peroxidases. Identification of the characteristic wavelengths of the main reagents, products and intermediates of the biodegradation.

4.2) Study of the pH effect on the enzymatic biodegradation of IC and RBBR, for choosing of the optimal pH in further assays.

4.3) Planning of a reaction mechanism, kinetic analysis and experimental design, useful to check the reliability of the mechanism, as well as for the kinetic characterization of the biodegradation of IC and RBBR.

4.4) Study of the effects on the reaction of concentrations of

enzyme/substrate/hydrogen peroxide, and statement of experimental dependences of the relevant kinetic parameters.

4.5) Optimization of the reaction of enzymatic biodegradation of IC and RBBR, and comparison with the results obtained with other methods proposed in the bibliography.

#### Chapter 5.

5.1) Realization of preliminary assays to study the biodegradation of IC by the enzyme-mediator systems, and the natural mediators MSG, SGA, SGO and ASG.

5.2) Study of the pH effect for the biodegradation of IC by the corresponding enzyme-mediator systems.

5.3) Approach of a possible reaction mechanism, kinetic analysis and experimental design, with different dependences with respect to the experimental variables of the enzyme-mediator systems.

5.4) Experimental confirmation of the kinetic behavior proposed for IC biodegradation, and kinetic characterization of the enzyme-mediator systems.

5.5) Determination of the appropriate reaction conditions, for the enzymatic biodegradation of IC, in the presence of the selected natural mediators. Contrast of the results obtained with that of other methods reported in the literature.

#### Chapter 6.

6.1) Preliminary studies of the assay conditions for enzymatic biodegradation of RBBR by enzyme-mediator systems, with the natural mediators MSG, SGA, SGO and ASG.

6.2) Study of the pH effect on the biodegradation of RBBR by the chosen enzyme-mediator systems.

6.3) Statement of a reaction mechanism, whose kinetic analysis and experimental conditions, lead to the characterization of the biodegradation of RBBR by the respective enzyme-mediator systems.

6.4) Study of the effects of the initial concentrations of enzyme/RBBR/mediator, and experimental confirmation of the expected kinetic behavior.

6.5) Optimization of the assay conditions for the RBBR biodegradation, by the studied enzyme-mediator systems. Comparison with the methods described by other authors.

#### Chapter 7

7.1) Preliminary spectrophotometric assays of the oxidation of phenols by peroxidase, in the presence of ascorbic acid, as coupling reductant and monitoring biomolecule.

7.2) Development of a reaction mechanism, kinetic analysis and experimental design, useful for kinetic characterization of the spectrophotometric and ultrasensitive method of enzymatic bioanalysis of phenols.

7.3) Checking of the reliability of the proposed reaction mechanism, from the effects of the initial concentrations of reagents, using model phenols.

7.4) Selection of the more appropriate assay conditions, for the ultrasensitive determination of phenols. Application to several phenols with biotechnological interest, overcoming to other methods reported in the bibliography.

#### 2.1 OBJETIVOS

Los antecedentes descritos por otros autores así como la experiencia previa del equipo de investigación, han conducido al planteamiento de los siguientes objetivos generales y específicos.

#### 2.1.1 Objetivos generales

Estudio de la bibliografía especializada y realización de ensayos preliminares que permitan la proposición de un mecanismo de reacción sometido a análisis cinético, que aporte expresiones útiles para un diseño experimental, aplicable para comprobar la validez del mecanismo de reacción planteado, así como para la caracterización cinética de los sistemas enzimáticos investigados, superando a otros métodos descritos en la bibliografía.

**Capítulo 4**. Caracterización cinética y optimización de la biodegradación enzimática por peroxidasas, de los colorantes Índigo Carmín (IC) y Remazol Brilliant Blue Royal (RBBR), mediante un método espectrofotométrico.

**Capítulo 5**. Caracterización cinética y optimización de la biodegradación de IC, por sistemas enzima-mediador en presencia de mediadores naturales.

**Capítulo 6**. Caracterización cinética y optimización de la biodegradación de RBBR por sistemas enzima-mediador en presencia de mediadores naturales.

**Capítulo 7**. Caracterización cinética y optimización de la determinación de fenoles con aplicaciones biotecnológicas, mediante un método espectrofotométrico y ultrasensible de bioanálisis enzimático.

#### 2.1.2 Objetivos específicos

#### Capítulo 4.

4.1) Realización de ensayos espectrofotométricos y cromatográficos

preliminares, sobre la biodegradación de IC y de RBBR catalizada por peroxidasas, identificando las longitudes de onda características de los principales reactivos, productos, y especies intermedias de la reacción.

4.2) Estudio sobre el efecto del pH en la biodegradación enzimática de IC y de RBBR, para elegir los pHs óptimos en los posteriores ensayos.

4.3) Planteamiento de un mecanismo de reacción, cuyo análisis cinético proporcione un diseño experimental útil para comprobar la validez del mecanismo propuesto, y para la caracterización cinética de la biodegradación de IC y RBBR.

4.4) Estudio de los efectos sobre la reacción de la concentración de colorante/enzima/peróxido de hidrógeno, y establecimiento de las dependencias experimentales de los parámetros cinéticos más significativos.

4.5) Optimización de la reacción de biodegradación enzimática de IC y de RBBR, por HRP y SBP, y comparación con ensayos previos de la bibliografía.

#### Capítulo 5.

5.1) Realización de ensayos espectrofotométricos y cromatográficos preliminares, sobre la biodegradación de IC con sistemas enzima-mediador, con los mediadores naturales MSG, SGA, SGO y ASG.

5.2) Estudio del efecto del pH sobre la biodegradación de IC, por los sistemas enzima-mediador investigados.

5.3) Propuesta del mecanismo de biodegradación de IC, análisis cinético y diseño experimental, con distintas dependencias respecto a las variables experimentales de los sistemas enzima-mediador considerados.

5.4) Confirmación experimental de la validez del mecanismo cinético propuesto, y caracterización cinética de la biodegradación enzimática de IC, por los sistemas enzima-mediador investigados.

5.5) Determinación de las condiciones de reacción más apropiadas para la biodegradación enzimática de IC, en presencia de los mediadores naturales estudiados, y contraste con otros métodos propuestos en la bibliografía.

#### Capítulo 6.

6.1) Ensayos espectrofotométricos y cromatográficos preliminares de la biodegradación de RBBR, por sistemas enzima-mediador con los mediadores naturales MSG, SGA, SGO y ASG.

6.2) Investigación del efecto del pH sobre la biodegradación de RBBR, catalizada por los sistemas enzima-mediador estudiados.

6.3) Establecimiento de un mecanismo de reacción, análisis cinético y diseño experimental, que permita predecir e interpretar las dependencias experimentales,

respecto a las concentraciones iniciales de los reaccionantes.

6.4) Estudio de los efectos de las concentraciones iniciales de los reaccionantes, y confirmación experimental del comportamiento cinético previsto.

6.5) Optimización de las condiciones de reacción, para la biodegradación de RBBR por los sistemas enzima-mediador seleccionados, y comparación con otros métodos descritos en la bibliografía.

#### Capítulo 7.

7.1) Ensayos espectrofotométricos preliminares de la oxidación de fenoles por peroxidasa, en presencia de ácido ascórbico como reductor acoplado y biomolécula detectora.

7.2) Desarrollo de un mecanismo de reacción, análisis cinético y diseño experimental, útil para la caracterización cinética del sistema de bioanálisis enzimático ultrasensible de fenoles.

7.3) Comprobación de la validez del mecanismo de reacción planteado, a partir de los efectos de las concentraciones iniciales de los reaccionantes, utilizando fenoles modelo.

7.4) Selección de las condiciones de reacción más convenientes, para la determinación ultrasensible de fenoles, y aplicación a diversos fenoles de interés biotecnológico, superando a otros métodos propuestos en la bibliografía.

A continuación se describirán los principales materiales y métodos utilizados, seguidos del desarrollo de los resultados experimentales y su discusión, correspondientes a cada uno de los objetivos propuestos en esta Tesis Doctoral.



# Materiales

# y métodos

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### 3.0 MATERIALS AND METHODS: SUMMARY

#### 3.0.1 Reagents and materials

Soybean peroxidase (SBP) and the isoenzyme C from horseradish peroxidase (HRP) were obtained from Sigma-Aldrich-Fluka (Madrid, Spain) and laccase from *Trametes villosa* (TvL) was supplied by Novozymes (Madrid, Spain). All substrates (pollutants, mediators and oxidants) and other chemical reagents were purchased from different suppliers like Sigma-Aldrich-Fluka (Madrid, Spain), Fisher (Madrid, Spain), Merck (Darmstadt, Germany), Scharlau (Sentmenat, Spain) and Panreac (Barcelona, Spain). HPLC solvents were obtained from Scharlau and deionized water was obtained by reverse osmosis with a Milli-RX+MilliQ-Reference equipment (Millipore Corp., Bedford, MA).

#### 3.0.2 Spectrophotometric assays

Spectrophotmetric assays were done in a visible-ultraviolet Perkin-Elmer Lambda 35 spectrophotometer, interfaced on-line with a PC compatible microcomputer controlled by the UV-Winlab software (Figure 3.1). Other data acquisition in endpoint or kinetic assays, were recorded with an absorbance microplate reader SpectraMax 340PC384 (Molecular Devices), in the visible wavelength range, interfaced on-line with PC compatible microcomputer controlled by the SoftMax Pro 5.2 (Molecular Devices, Figure 3.2).

#### 3.0.3 Liquid chromatography

Identification of the reaction components of decolorization by the retention time and the monitoring of the reaction, were done on a HPLC Agilent 1200 Rapid Resolution, with analytical reverse phase and a photodiode array detector, run on Agilent ChemStation software. The HPLC column was a Zorbax Eclipse C18 600 bar with 4.6x50 mm and 1.8  $\mu$ m of particle diameter. The chosen method for the separation of the compounds with a flow rate of 1 ml min<sup>-1</sup> was : 0% MeCN 0-1 min, 40 % MeCN 1-3 min, 3-4 min 60 % MeCN and 4-6 min 100 % MeCN. Each five minutes 1  $\mu$ L of the reaction was injected on the HPLC with the method previously described. (Figure 3.3).

#### 3.0.4 Enzymatic biodegradation of dyes

Biodegradations of the dyes Indigo Carmine and Remazol Brilliant Blue Royal were carried out with two kinds of enzymes, peroxidases (SBP and HRP) as main research and laccase (TvL) to compare biodegradation yields of them. Dyes were dissolved in aqueous solution. Optimum pH for all different reactions were studied throught three different buffers sodium citrate (pH 2.5-5.0), acetate buffer (3.5-5.5) and phosphate buffer (5.5-8.5), 10 mM all of them. Reactions were done in plastic vials with a volume of 5 ml, and aliquots were taken each five minutes from the initial time ( zero) to one hour, stopping the reaction with acetic acid 100% to avoid secondary reactions. Samples were microfiltered with 0.22  $\mu$ m PTFE filters, and injected on the HPLC to monitoring the reaction.

#### 3.0.5 Enzymatic bioanalysis of phenols

A new spectrophotometric method has been developed for the enzymatic bioanalysis of phenols with biotechnological applications. The method has been initially applied to determination of 10-300 nM bisphenol A (BPA) or 4-tertbutylcatechol (TBC), with 8-240 nM HRP and 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in 10 mM pH 6.5 sodium phosphate buffer at 25°C. The assay medium contained ascorbic acid (AA) as coupling reductant and monitoring biomolecule.

Then, 240 nM HRP, 3  $\mu$ M AA and 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in 10 mM pH 6.5 sodium phosphate buffer at 25°C, were chosen as optimal assay conditions, for the determination of 10-300 nM of the analyzed phenol. Several phenolic pollutants, drugs and phytochemicals with antioxidant activity, have been sensitively determined.

#### 3.0.6 Statistical analysis

All determinations were carried out at least by triplicate assays, from which mean values were averaged and given along with their standard deviations.

Linear and non-linear regression fittings were carried out using the Marquardt's algorithm, implemented in the SigmaPlot 8 program (Systat, 2006).

#### **3.1 REACTIVOS**

Peroxidasa de soja (SBP) y la isoenzima C de peroxidasa de rábano picante (HRP), fueron adquiridas a Sigma-Aldrich-Fluka (Madrid, España). Lacasa de *Trametes villosa* (TvL) fue amablemente donada por Novozymes (Madrid, España).

Los distintos contaminantes, mediadores, oxidantes y demás reactivos

químicos utilizados para la elaboración de los experimentos que se detallan en esta Memoria, fueron de grado analítico y comprados a diferentes proveedores: Sigma-Aldrich-Fluka (Madrid, España), Fisher (Madrid, España), Merck (Darmstadt, Alemania), Scharlau (Sentmenat, España) o Panreac (Barcelona, España). Acetonitrilo y otros disolventes de calidad gradiente para HPLC, además de disolventes de calidad GC, fueron proporcionados por Scharlau (Sentmenat, España). El agua de laboratorio utilizada en los ensayos fue agua purificada de tipo I (18 MΩ x cm) mediante ósmosis inversa, electrodiálisis y posterior desionización con un sistema Milli-RX+MilliQ-Reference (Millipore Corp., Bedford, MA).

#### 3.2 INSTRUMENTACIÓN

# 3.2.1 Ensayos espectrofotométricos de ultravioleta-visible (UV/Vis)

Los espectros de absorción de luz y ciertos ensayos cinéticos, fueron llevados a cabo mediante un espectrofotómetro ultravioleta-visible de doble haz Perkin-Elmer Lambda 35, acoplado a un ordenador PC compatible con el software de control UV-Winlab. El sistema óptico consta de una lámpara de deuterio y otra de wolframio, que producen un haz de luz de 15 mm, un monocromador cóncavo con 1053 líneas/mm y un detector fotomultiplicador para cada cubeta (muestra y referencia), operando en un intervalo de longitudes de onda entre 190 y 1100 nm, con una reproducibilidad de  $\pm$  0.1 nm. La selección de la lámpara que ilumina las cubetas se ajustó automáticamente a 326 nm. En los ensayos se utilizaron velocidades desde 7.5 hasta 2880 nm/min. En los ensayos cinéticos se utilizaron intervalos de respuesta comprendidos entre 10 y 40 datos/segundo.

Los datos recogidos de cada estudio fueron analizados inicialmente por medio del programa de control instrumental UV-WinLab (Perkin-Elmer Instruments), el cual facilitó su posterior exportación en formato ASCII. Estos archivos fueron importados y sometidos a análisis estadísticos con el programa SigmaPlot (Systat, 2006). Los experimentos fueron realizados por triplicado, obteniendo datos de media y desviación estándar para cada condición de ensayo, los cuales se muestran en las figuras y tablas correspondientes.

Otros ensayos cinéticos y de punto final, se realizaron en un lector de placas multipocillo de doble haz SpectraMax 340PC<sup>384</sup> (Molecular Devices), en el intervalo del espectro visible, conectado a un ordenador compatible con el software de control SoftMax Pro 5.2. (Molecular Devices). El equipo consta de un monocromador que

permite un ajuste de 1 nm, operando en el rango de longitudes de onda entre 340 y 850 nm, con una reproducibilidad de  $\pm$  0.2 nm. Además, permite trabajar en un intervalo de temperaturas desde 25 hasta 45 °C.

Los datos obtenidos en cada ensayo fueron analizados inicialmente por medio del programa de control instrumental SoftMax Pro 5.2. Data Analysis Software (Molecular Devices). Estos archivos fueron importados y sometidos a análisis estadísticos con el programa SigmaPlot (Systat, 2006). Los experimentos fueron realizados por triplicado, obteniendo datos de media y desviación estándar para cada condición de ensayo, los cuales aparecen en las figuras y tablas correspondientes.



#### **FIGURA 3.1**

#### Perkin-Elmer Lambda 35





**Molecular Devices Spectramax 340PC** 

# 3.2.2 Ensayos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La separación de metabolitos mediante cromatografía líquida se llevó a cabo en un cromatógrafo HPLC (Cromatografía Líguida de Alta Resolución) Agilent 1200 Resolution varios módulos: Rapid con Reservorio para disolventes. Microdesgasificador electrónico de vacío (G1379B) que permite la desgasificación en línea de los disolventes constituyentes de la fase móvil, mediante unas membranas especiales permeables a gases. Bomba binaria (G1312B) que proporciona gradiente de mezcla a alta presión; consta de dos bombas idénticas integradas en una carcasa; cada bomba es de doble pistón en serie, donde el primero se desplaza a una velocidad doble del segundo, más un complejo sistema fluídico para disminuir la variación de la presión, con el fin de aumentar la reproducibilidad de los tiempos de retención de los metabolitos en los sucesivos cromatogramas. Inyector automático SL de alto rendimiento (G1367C), que ofrece una elevada velocidad y escaso efecto memoria con un diseño de flujo continuo, velocidad de invección de muestra mejorada usando el modo de invección solapada, volúmenes de retraso mínimos para gradientes rápidos y equilibrio rápido al desviar el inyector automático después de la inyección de la muestra, así como diferentes tipos de contenedores de muestras. Compartimento termostatizado de columna TCC SL (G1316B), que permite el calentamiento y refrigeración Peltier desde 15 hasta 100 °C con altas velocidades de refrigeración. Detector de conjunto de fotodiodos (G1315C), formado por una lámpara de deuterio y otra de wolframio para las zonas ultravioleta y visible-infrarrojo cercano, respectivamente; el rango de longitudes de onda está comprendido entre 190-950 nm, con un intervalo de muestreo inferior a 1 nm; consta de una serie de 1024 fotodiodos individuales y un circuito de control colocado sobre un soporte cerámico, capaz de generar cromatogramas en 3D, con la ventaja de poder determinar los máximos y mínimos absolutos y relativos de cada molécula en un solo cromatograma. Por último, un colector de fracciones a escala semipreparativa (G1364C), permite recoger las moléculas previamente separadas en la columna para un posterior análisis con otras técnicas como cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría infrarroja (IR), etc.



#### Agilent 1200 Rapid Resolution (Ultra-HPLC) with ChemStation Software

#### 3.3 BIODEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE COLORANTES

La biodegradación de contaminantes clorofenólicos se investigó con dos tipos de enzimas, peroxidasa (SBP y HRP) como enzima principal del estudio, y lacasa (TvL), para contrastar los rendimientos de biodegradación, de los colorantes Índigo Carmín (IC) y Remazol Brilliant Blue Royal (RBBR). La reacción se realizó en una disolución acuosa con distintas concentraciones de cada parámetro (enzima, colorante, mediador y peróxido de hidrógeno) para optimizar las condiciones. La evaluación del pH óptimo de la reacción se estudió mediante tampones, citrato sódico (pH 2.5 a 5.0), acetato sódico (pH 3.5 a 5.5) y fosfato sódico (pH 5.5 a 8.5) a una concentración 10 mM. Los experimentos se realizaron a una temperatura constante de 25 °C. Las alícuotas se tomaron cada 5 min. durante 1 hora, parando la reacción enzimática y las reacciones químicas secundarias con ácido acético puro. Después, fueron microfiltradas con microfiltros de PTFE y 0.22 µm, e inyectadas en un cromatógrafo HPLC-DAD para monitorizar la reacción. Para la separación de las diferentes moléculas se utilizó una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 600 bar (4.6 x 50 mm, 1.8 µm). La velocidad de flujo fue 1 ml/min. La fase móvil estuvo constituida por  $H_2O$  (A) y acetonitrilo (B), cuyo gradiente de elución fue el siguiente: 0-0.1min 30-60 % B, 0.1-1.1 min 60 % B, 1.1-1.4 min 60-30 % B. La elución fue seguida a diferentes longitudes de onda, tomando el máximo de absorción más sensible de cada

molécula. Ocasionalmente, el procedimiento fue escalado en una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm x 250 mm, 5 µm) con alta capacidad de muestra. Los picos correspondientes a los colorantes y sus productos de degradación, fueron recogidos en un colector de fracciones Agilent. Después, las fracciones fueron tratadas con sulfato sódico, para retirar su contenido en agua, antes de posteriores estudios con GC-MS, para confirmar sus estructuras.

#### 3.3.1 Biodegradación de IC con peroxidasas

La reacción enzimática se realizó en tubos de plástico con una concentración de enzimas HRP y SBP que varió entre 1.27-15.25 nM y 3.05-36.61 nM respectivamente, la concentración de contaminante entre 8.47-101.69  $\mu$ M y la de peróxido de hidrógeno entre 20 y 240  $\mu$ M , todo ello a pHs óptimo de 10 mM de tampón citrato de 3.0 a 25 °C.

#### 3.3.2 Biodegradación de RBBR con peroxidasas

La reacción se realizó en tubos de plástico con una concentración de enzimas HRP y SBP que varió entre 2.5-30 nM, la concentración de contaminante entre 10-120  $\mu$ M y la de peróxido de hidrógeno también entre 10 y 120  $\mu$ M, todo ello a pH óptimo de 10 mM de tampón citrato de pH 5.0 y 4.0 para HRP y SBP respectivamente, a 25 °C.

### 3.3.3 Biodegradación de IC con sistemas lacasa/peroxidasamediador

Las condiciones de estudio para la degradación de IC con mediador fueron las siguientes: Se comparó el estudio a 25 °C de SBP entre 18.3-219.66 nM y peróxido de hidrógeno entre 20 y 240  $\mu$ M con el de TvL entre 5.02-60.2 nM para la degradación de IC entre 8.47 y 101.69  $\mu$ M y una concentración de mediador MSG entre 0.48 y 5.70  $\mu$ M a pH 5.0 para TvL y entre 47.5 y 569.5  $\mu$ M a pH 8.0 con SBP, de mediador ASG entre 0.31 y 1.90  $\mu$ M a pH 5.0 con TvL y entre 47.5 y 569.5  $\mu$ M a pH 7.5 con SBP, de mediador SGA entre 0.792 y 9.492  $\mu$ M a pH 5.0 con TvL y entre 47.5 y 569.5  $\mu$ M a pH 7.0, y de mediador SGO entre 0.15 y 1.74  $\mu$ M a pH 5.0 con TvL y entre 47.5 y 569.5  $\mu$ M a pH 7.5 con SBP.

#### 3.3.4 Biodegradación de RBBR con sistemas lacasa-mediador

Las condiciones de estudio para la degradación de RBBR con el sistema lacasa/mediador fueron entre 2 -24  $\mu$ M de colorante, entre 30- 359 nM para la enzima y entre 0.5 -6  $\mu$ M de mediador, a pH 6.0 para MSG, a pH 5.5 para ASG y SGO, y a pH 5.0 con SGA, a temperatura ambiente.

#### 3.4 BIOANÁLISIS ENZIMÁTICO DE FENOLES

Se ha desarrollado un nuevo método espectrofotométrico, útil para el bioanálisis enzimático de fenoles de interés biotecnológico. Inicialmente, se ha comprobado la aplicabilidad del método sobre dos fenoles modelo, bisfenol-A (BPA) y 4-tercbutilcatecol (TBC). Se han investigado los efectos de las concentraciones iniciales de enzima HRP 8-240 nM, de ácido ascórbico (AA) como reductor acoplado y biomolécula detectora 1-30  $\mu$ M, y de los propios fenoles modelo BPA y TBC 10-300 nM. Las reacciones han tenido lugar en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100  $\mu$ M, en tampón fosfato sódico 100 mM pH 6.5 a 25 °C.

Posteriormente, se han escogido como condiciones óptimas de ensayo HRP 240 nM, AA 3  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100  $\mu$ M, en tampón fosfato sódico 100 mM pH 6.5 a 25°C, para la determinación de 10 a 300 nM del fenol analizado. En concreto, se han determinado contaminantes fenólicos como BPA, fenol y p-cresol. También contaminantes halofenólicos como 4-F-,4-Cl-,4-Br- y 4-I-fenol. Además, fármacos fenólicos como TBC, 4-tercbutilfenol,arbutina, hidroquinona y paracetamol. Finalmente, fitoquímicos fenólicos como los ácidos ferúlico,cafeico, clorogénico y elágico,junto con galato de metilo,esculetina y tirosol, todos ellos con reconocida capacidad antioxidante.

#### 3.5 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LACASA Y PEROXIDASAS

La actividad enzimática de las enzimas utilizadas en los ensayos de degradación se comprobó en el espectrofotómetro mediante el grado de oxidación del sustrato DMP a la longitud de onda 468 nm. Para ello la cantidad de enzima que produce 1 mmol de producto, DMBQ, por minuto se tomó como una unidad. Se utilizaron cuvetas de plástico de 1 mL.

Para la actividad de SBP, se midió la oxidación de 4 mM DMP mediante 4.6 nM SBP con 1 mM  $H_2O_2$  en 10 mM tampón fosfato pH 6.0 a 25 °C. La actividad enzimática correspondió a 7.3 UE/L.

Para la actividad de HRP, se midió la oxidación de 4 mM DMP mediante 3.81 nM HRP con 1 mM  $H_2O_2$  en 10 mM tampón fosfato pH 7.5 a 25 °C. La actividad enzimática correspondió a 9.32 UE/L.

Para la actividad de TvL, se midió la oxidación de 0.286 mM DMP mediante 28.2 nM TvL en 10 mM tampón acetato pH 4.0 a 25 °C. La actividad enzimática correspondió a 28.2 UE/L.

#### 3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de regresión permite evaluar los parámetros implicados en una ecuación algebraica o diferencial a partir de datos experimentales. El método más utilizado para el ajuste de funciones lineales y no lineales es el de los mínimos cuadrados. Para el caso de ajuste de funciones no lineales es necesario conocer unas estimaciones iniciales de los parámetros que se mejoran en iteraciones sucesivas (Endrenyi, 1981; Motulsky y Christopoulos, 2004).

Una función "f" con "n" datos, "k" variables independientes y "p" parámetros puede expresarse como (Watts, 1994):

$$Y_i = f(z, u_i)$$

Utilizando la notación matricial:

$$Y_i = (Y_1,...,Y_n)^T$$
  
 $u = (u_1,...,u_k)^T$   
 $z = (z_1,...,z_p)^T$ 

En lo sucesivo, los superíndices "T" y "-1"corresponden a las matrices transpuesta e inversa, respectivamente.

En la práctica, existe diferencia entre los valores calculados,  $Y_i$ , y los experimentales,  $y_i$ , debido al error experimental o residuo  $E_i$ .

$$y_i = f(\mathbf{z}, \mathbf{u}_i) + E_i$$

El método de los mínimos cuadrados establece que el mejor ajuste entre los datos experimentales y calculados corresponde al conjunto de parámetros z característico del mínimo de la función suma de los residuos al cuadrado, S(z):

$$S(\mathbf{z}) = [\mathbf{y}_i - \mathbf{f}(\mathbf{z}, \mathbf{u}_i)]^2$$

#### 3.6.1 Regresión no lineal

Los ajustes por regresión no lineal pueden realizarse a través de los análisis en gradiente y de los algoritmos tipo Gauss-Newton. Los primeros métodos exploran el espacio de los parámetros buscando la dirección en la que tiene lugar la máxima variación de la función, respecto a todos ellos. A continuación, evolucionan en la **Tesis Doctoral** 

dirección opuesta a la anterior, mejorando los valores de los parámetros en iteraciones sucesivas del método. Estos procedimientos no requieren estimaciones iniciales muy próximas a **z**, pero requieren largo tiempo de cálculo, características opuestas a las de los algoritmos tipo Gauss-Newton.

Los algoritmos de Gauss-Newton introducen una aproximación lineal de la función en un entorno próximo a los valores de los parámetros calculados en cada iteración (Watts, 1994). Así, en base a las estimaciones **z**<sup>i</sup>, se calculan los incrementos **B**<sup>i+1</sup> que conducen a las estimaciones mejoradas **z**<sup>i+1</sup>:

#### $z^{i+1} = z^i + B^{i+1}$

La expresión que define al vector de incrementos de parámetros en cada iteración abarca diversos componentes:

#### $\mathbf{B} = (\mathbf{V}^{\mathsf{T}} \mathbf{W} \mathbf{V})^{-1} (\mathbf{V}^{\mathsf{T}} \mathbf{W} \mathbf{D}) = \mathbf{A}^{-1} \mathbf{C}$

Así pues, cada iteración requiere una nueva evaluación de los residuos D y de las derivadas V, respecto a las estimaciones en curso de los parámetros z y actualizadas mediante los incrementos B.

La ponderación **W** asociada a cada dato determina la contribución específica del mismo al ajuste global de todos los valores experimentales. Los factores de ponderación están inversamente relacionados con las varianzas respectivas de cada punto, obtenidas a partir de varias repeticiones para cada dato experimental (Endrenyi, 1981):

$$w_i = 1 / s_i^2$$

La fiabilidad del ajuste se realiza mediante la región de confianza correspondiente al nivel de significación  $\alpha$  (Watts, 1994):

 $(\mathbf{z}-\mathbf{z})^{\mathsf{T}} \mathbf{V}^{\mathsf{T}} \mathbf{V}(\mathbf{z}-\mathbf{z}) \leq p \mathbf{S}(\mathbf{z}) \mathbf{F}(\mathbf{p},\mathbf{n}-\mathbf{p}, \alpha) / (\mathbf{n}-\mathbf{p})$ 

Esta región es un elipsoide *p*-dimensional en el espacio de los parámetros con centro **z**, interpretación geométrica asociada al concepto estadístico de matriz de correlación (Endrenyi, 1981). Esta expresión abarca la varianza experimental, S(**z**)/(n-p), estimada para el número de grados de libertad del ajuste (n-p), así como los valores de la distribución F de Fisher.

Entre los mejores métodos de regresión no lineal, se encuentra un algoritmo de Gauss-Newton que incorpora cierta proporción de búsqueda en gradiente (Marquardt, 1963). La contribución del proceso en gradiente se introduce en la anterior expresión de **B** a través de la matriz **A** cuyos elementos diagonales contienen la constante L. A la constante L se le asigna un valor inicial de 10<sup>-3</sup> (Marquardt, 1963) que puede aumentar o disminuir en factores de diez, durante las sucesivas iteraciones. Este algoritmo se encuentra implementado en el programa informático SigmaPlot (Systat,

2006), utilizado en esta Memoria.

#### 3.6.2 Regresión lineal

La minimización de la suma de los residuos al cuadrado para una función lineal simple o múltiple, conduce directamente a expresiones algebraicas que definen los parámetros correspondientes (Endrenyi, 1981; Watts, 1994) Así, a partir de las anteriores expresiones para las matrices **z** y **B** se obtiene:

 $\mathbf{z} = (\mathbf{x}^{\mathsf{T}} \mathbf{W} \mathbf{x})^{-1} (\mathbf{x}^{\mathsf{T}} \mathbf{W} \mathbf{y})$ 

Siendo igualmente aplicables los conceptos de ponderación y fiabilidad anteriormente descritos.

El programa informático SigmaPlot (Systat, 2006) también permite que el algoritmo de Marquardt (Marquardt, 1963) sea aplicado al ajuste de datos experimentales a funciones lineales.

#### 3.6.3 Pruebas de significación estadística

Las pruebas de significación estadística (Systat, 2005) son procedimientos estadísticos útiles para la comparación de los valores experimentales, obtenidos mediante diferentes métodos de análisis químico. Habitualmente se establece como suposición de partida la hipótesis nula o negativa (*HN*), es decir, que no hay diferencia significativa entre los valores experimentales obtenidos con los métodos químicos empleados. A continuación, se determina el valor experimental de un parámetro estadístico, el cual se contrasta con su correspondiente valor tabulado, considerando una probabilidad estadística de referencia ( $\alpha$ ) y los grados de libertad ( $\upsilon$ ) equivalentes al número de datos (*n*) menos el número de parámetros (*p*) implicados en la prueba.

Una probabilidad estadística ( $\alpha$ ) alta aumenta el riesgo de rechazar la *HN* cuando es cierta (error de Tipo I), mientras que un bajo valor de  $\alpha$  incrementa la probabilidad de concluir que no hay diferencia cuando existe realmente (error de Tipo II). Por ello, un valor óptimo recomendable suele ser  $\alpha$ =0.05, indicativo de una fiabilidad estadística del 95 %.

#### 3.6.3.1 Prueba t de Student

La prueba de significación estadística *t* de Student (Systat, 2005) consiste en la determinación del parámetro estadístico *t*, que representa la relación entre la diferencia de las medias de dos grupos de datos y el error estándar de la diferencia de sus medias. El valor experimental de este parámetro estadístico se contrasta con su

respectivo valor tabulado. En el caso de que lo supere, se rechaza la HN:

$$t_{exp} > t_{\upsilon,\alpha} \neq HN$$

Es decir, se considera que existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos conjuntos de datos, con una fiabilidad estadística  $\alpha$ .

El algoritmo de cálculo también permite determinar otro parámetro estadístico asociado *P*, con una aplicabilidad similar. En este caso, la existencia de una diferencia estadísticamente significativa entre los dos conjuntos de datos requiere:

$$P_{exp} < 0.050 \neq HN$$

que su valor experimental sea inferior a un valor de referencia constante, con una fiabilidad estadística del 95 %.



# Biodegradación enzimática por peroxidasas de Índigo Carmín y Remazol Brilliant Blue Royal

## 4. BIODEGRADACIÓN ENZIMÁTICA POR PEROXIDASAS DE ÍNDIGO CARMÍN Y REMAZOL BRILLIANT BLUE ROYAL

### 4.0 BIODEGRADATION OF THE DYES IC AND RBBR BY POD: SUMMARY

This chapter describes a new ecofriendly alternative for removal Remazol Brilliant Blue (RBBR) and Indigo Carmine by soybean (SBP) and horseradish (HRP) peroxidases. Thus, studies for optimization of reaction conditions (pH, concentration of enzymes/substrates/hydrogen peroxide) have been proposed.

Preliminary studies were carried out by different analytical techniques to understand the main processes that take place during the reaction. Spectra from spectrophotometer (Figure 4.1) and from HPLC assays (Figure 4.2) have been obtained. The chemical structure of reagents and products are represented in Figures 4.3 and 4.4.

In the case of biodegradation of IC, the optimum pH was 3.0 for the reaction of degradation at 25 °C and 10 mM citrate buffer (Figure 4.5). In the case of RBBR, the optimal pHs in 10 mM citrate buffer were pH 4.0 for SBP and pH 5.0 for HRP (Figure 4.6). The studied effects to degrade IC or RBBR in 30 min. reaction were the enzyme/substrate/hydrogen peroxide concentration (Figures 4.7-4.9, 4.10-4.12, 4.13-4.15 respectively). In all the biodegradation studies more than 95% was effectively removed in less than thirty minutes. The molar ratio of  $[C]_0 / [H_2O_2]_0$  was 1.1 and the intermediate products of reaction and the kinetic mechanisms were studied. IC and RBBR have a first enzymatic degradation product CR (radical colorant) and, after several non enzymatic reactions, innocuous products were formed. The optimum reaction conditions showed that soybean and horseradish peroxidase, were effective in

removing IC and RBBR in laboratory a wider range of pH 2-3.5 and 3.5-5.5 respectively. HRP and SBP 30 nM can degrade around 120  $\mu$ M of IC and 50  $\mu$ M of RBBR, in less than 30 minutes by 1 mM  $H_2O_2$ .

#### 4.1 ENSAYOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Se ha demostrado que la enzima lacasa, perteneciente a la clase de las oxidorreductasas al igual que las peroxidasas HRP y SBP, es eficaz degradando los colorantes IC y RBBR.

En el caso de IC, se identificó un producto de la degradación de IC como Isatina sulfonato (IS) con  $\lambda_{max}$  a 235 nm y 400 nm (Singh et al., 2007). Por lo que primero se procedió a obtener los espectros UV/visible para identificar los máximos de absorbancia representativos de cada sustancia, IC e IS, al variar el pH (Figuras 4.1 A y B). Se observó que IC tiene máximos de absorbancia a varias longitudes de onda (210, 250, 285 y 610 nm), siendo significativa su alta absorbancia en la zona visible a 610 nm, que le comunica su propiedad de colorante azul, respecto a su absorbancia en la zona ultravioleta. En cuanto a IS también se obtuvieron varios máximos de absorbancia a distintas longitudes de onda (210, 250, 295 y 400 nm), mostrando una absorbancia apreciable a 400 nm indicativa de su color amarillo, aunque menos intensa que la absorbancia en la zona ultravioleta, por lo cual no es útil como colorante amarillo. Los resultados indican que las diferencias de pH y tipo de tampón no suponen cambios importantes en los espectros de absorbancia de IC e IS. Estas propiedades ópticas resultan de interés para posteriores estudios de biodegradación enzimática, tanto espectrofotométricos como cromatográficos con detección de absorción de luz. En el caso de RBBR, también se identificaron las longitudes de onda apropiadas para la detección de la decoloración del sustrato RBBR (595nm), y de la aparición de un producto intermedio rojizo (450nm). Estas longitudes de onda se utilizaron en posteriores experimentos espectrofotométricos y cromatográficos.

La capacidad de HRP y SBP para biodegradar el colorante IC y RBBR, no ha sido investigada hasta la fecha. Por tanto, se hizo un estudio espectrofotométrico preliminar con cada enzima, a través de espectros iterativos realizados a distintos tiempos de reacción (Figuras 4.1 C y D). Se comprobó la disminución de absorbancia a las longitudes de onda más representativas del colorante, 285 nm y 610 nm y se observó la formación de un compuesto amarillento con dos máximos de absorbancia a 210 nm y 250 nm, propiedades características de IS. Los resultados demostraron la

alta actividad biodegradativa de ambas enzimas. En 30 min, HRP consiguió decolorar más del 85% de IC (Figura 4.1 C) y SBP más del 90% (Figura 4.1 D). Por lo tanto, se profundizará en estas reacciones enzimáticas a través de posteriores estudios cromatográficos. Los ensayos preliminares de la oxidación de RBBR por  $H_2O_2$  catalizada por HRP y SBP, proporcionaron información sobre la viabilidad de degradación de dicho colorante. Para ello, se utilizaron unas condiciones de biodegradación de RBBR similares para ambas enzimas (Figuras 4.1 E y F) registrando espectros iterativos. Se observó la alta actividad biodegradativa de ambas enzimas, y una mayor decoloración con HRP, pues tras 30 min. de reacción, HRP y SBP degradaron el 85% (Figura 4.1.E) y el 69 % (Figura 4.1.F) de RBBR, respectivamente.

#### 4.2 ENSAYOS CROMATOGRÁFICOS

Las biodegradaciones enzimáticas de IC y de RBBR catalizadas por HRP y SBP, fueron también estudiadas utilizando cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC-DAD) para separar y, a ser posible, identificar los principales reactivos participantes en el proceso. Se retiraron muestras alícuotas a distintos tiempos de las reacciones y se inyectaron en un cromatógrafo Agilent 1200 Rapid Resolution, obteniendo cromatogramas tridimensionales (Figura 4.2 A,B,E,F). Se contrastaron los tiempos de retención y los espectros de absorbancia de las muestras problema, con los de muestras patrón, identificando así las distintas sustancias en los cromatogramas. Para el caso de IS, se comprobó la gran similitud de los espectros de absorbancia de IC e IS, obtenidos en sus respectivas fases móviles de los cromatogramas (Figura 4.2 C-D), con los previamente registrados en los ensayos espectrofotométricos (Figuras 4.1 A-B).

En el caso de IC, utilizando bajas concentraciones de colorante, se observó su completa biodegradación hasta IS en 30 min. (Figura 4.2 A-B). Sin embargo, en altas concentraciones de IC, también se detectó la formación de un producto intermedio rojo (RP), caracterizado por su elevada absorbancia en la zona ultravioleta y su menor absorbancia en la zona visible con máximo a 550 nm (Figuras 4.2 C-D).



Espectros de absorbancia a distintos valores de pH 10 mM de IC 50.85  $\mu$ M (A) e IS 101.69  $\mu$ M (B) y reacciones enzimáticas de IC 50.85  $\mu$ M con 6.36 nM HRP (C) y 11.44 nM SBP (D), registrando el primer espectro a 1 min y los demás cada 3 min, durante 30 minutos de reacción. Degradación de RBBR 0.5 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM CB 10mM pH 5.0 con HRP 30 nM (E) o SBP 30 nM (F), registrando espectros iterativos cada 3 min. durante 15 min. Las flechas muestran los cambios de absorbancia con el tiempo.



Cromatogramas HPLC de la reacción de biodegradación de IC catalizada por HRP (A,C) y SBP (B,D) y de RBBR catalizada con HRP (E) y SBP (F). Cromatogramas tridimensionales (A, B, E, F) y Espectros de absorbancia para IC, IS y RP (C) y (D). Condiciones de reacción: 1.22 mM IC, HRP 190 nM (A, C) y por SBP 229 nM (B,D) ambos en tampón CB 10 mM pH 3.0 a 25 °C ( 30 min. de reacción). Ambas reacciones con  $H_2O_2$  2 mM y 0.48 mM RBBR, 1.90  $\mu$ M HRP (E), en 1 mM  $H_2O_2$  y tampón CB 30 mM pH 5.0 a 25 °C, al tiempo inicial (E) y a los 5 min. de reacción (F).







Ο





#### **FIGURA 4.3**

Estructura química de indigoides. (IC) Índigo Carmín. (ICR) Índigo Carmín Radical. (DIC) dihidroíndigo carmín. (IS) Isatina sulfonato. (IAS) Ácido isático sulfonato. (AAS) Ácido antranílico sulfonato. (RP) Producto rojo.

Se requieren largos tiempos de reacción para la descomposición no enzimática de IS y RP hasta productos incoloros y biodegradables como ácido isático sulfonato (IAS) y ácido antranílico sulfonato (AAS), de acuerdo con otros autores (Campos et al., 2001b; Kandelbauer et al., 2008; Podgornik et al., 2001; Singh et al., 2007).

Por tanto, se ha demostrado por primera vez la biodegradación enzimática de IC catalizada por HRP y SBP, en ausencia de mediadores, a través de un proceso paralelo al descrito por otros autores con otros sistemas lacasa-mediadores (Campos et al., 2001a; Campos et al., 2001b; Kandelbauer et al., 2008; Singh et al., 2007) o peroxidasa-mediadores como LiP-Alcohol veratrílico o bien MnP-MnSO<sub>4</sub> (Podgornik et al., 2001). Estos autores han establecido que la biodegradación directa de IC por lacasas o peroxidasa-mediadores como LiP-Alcohol veratrílico o bien MnP-MnSO<sub>4</sub> (Podgornik et al., 2001). En este caso, la enzima oxida directamente al mediador y éste oxida al colorante IC de manera no enzimática, hasta la aparición de un primer producto detectable amarillo (IS) que evoluciona lentamente hasta productos incoloros y biodegradables como IAS y AAS. También han comprobado que, a elevadas concentraciones de IC y dependiendo del pH, puede aparecer un producto intermedio rojo (RP), el cual también se descompone lentamente hasta IS, IAS y AAS.

El producto intermedio rojo (RP) no se detectó en los estudios espectrofotométricos previos (Figuras 4.1 C-D), porque se presenta únicamente en altas concentraciones de IC (mM), muestra escasa absorbancia a 550 nm y ésta se encuentra superpuesta con la próxima e intensa banda de absorbancia a 610 nm de IC. Además, se descompone con mayor rapidez a valores de pH superiores a 3.0 (datos no mostrados). Los ensayos cromatográficos se realizaron con elevada concentración de IC (1.22 mM) y permitieron separar los componentes del medio de reacción, así como obtener sus respectivos espectros de absorbancia (Figuras 4.2 C-D). La estructura dimérica de RP fue determinada utilizando técnicas de cromatografía en capa fina, espectrofotometría UV-visible y <sup>1</sup>H-RMN (Podgornik et al., 2001). Concuerda con su formación ante altas concentraciones de IC, donde las interacciones bimoleculares son más probables.

Por todo ello, considerando los resultados experimentales propios además de los obtenidos por otros autores (Campos et al., 2001a; Campos et al., 2001b; Kandelbauer et al., 2008; Podgornik et al., 2001; Singh et al., 2007), se propone el siguiente proceso de biodegradación enzimática de IC, desencadenada por la reacción enzimática catalizada por HRP o SBP y continuada por una serie de reacciones no enzimáticas acopladas:

$$IC + H_2O_2 - 2e^- - 2H^+ \xrightarrow{HRP/SBP} ICR + 2H_2O$$

$$(4.1)$$

$$ICR \Longrightarrow DIC \longrightarrow 2IS \longrightarrow 2IAS \longrightarrow 2AAS$$
(4.2)

$$ICR + IC \longrightarrow RP \longrightarrow 4IS \longrightarrow 4IAS \longrightarrow 4AAS$$
 (4.3)

$$AAS \rightarrow \rightarrow \text{Productos}$$
 (4.4)

La reacción enzimática (Reacción 4.1) ocasiona la oxidación de Índigo Carmín (IC) hasta un doble catión radical (ICR), quien evoluciona mediante reacciones no enzimáticas acopladas (Reacción 4.2), tautomeriza hacia dihidroíndigo carmín (DIC), que se descompone en dos moléculas de isatina sulfonato (IS), cada una de las cuales se transforma inicialmente en ácido isático sulfonato (IAS) y después en ácido antranílico sulfonato (AAS). En elevadas concentraciones de IC y a pH ácido como pH 3.0, se propone una ruta minoritaria (Reacción 4.3) para la descomposición no enzimática de ICR, el cual reacciona con moléculas de IC todavía presentes en el medio de reacción, generando el producto dimérico RP, quien se transforma posteriormente en cuatro moléculas de IS, especie que origina IAS y AAS. Finalmente, ASS evoluciona mediante reacciones no enzimáticas hacia productos inocuos (Reacción 4.4). Las estructuras de estas sustancias se muestran en la Figura 4.3.



Estructura química del colorante antraquinónico Remazol Brilliant Blue Royal (RBBR; (3-(4-Amino-9,10-dihidro-3-sulfo-9,10-dioxoantracen-4-il)aminobenzenosulphonil)vinil sulfato disódico).

En el caso de la degradación de RBBR (Figura 4.4) catalizada por HRP y SBP, se obtuvieron los cromatogramas 3D y se representó sólo la reacción de HRP, puesto que la de SBP era muy parecida (Figura 4.2 E-F). Para ello, se utilizó una disolución concentrada de sustrato y de enzima para ser capaces de ver bien todos los picos, tanto de sustrato como de producto. Se tomó una alícuota al tiempo inicial y otra cinco minutos después, cuando la reacción tomó un color intenso rojizo-marrón. Se observa claramente que el RBBR aparece a un t<sub>R</sub>= 4 minutos (Figura 4.2 E), y que a los 5 minutos de reacción, disminuye el colorante y empieza a salir un producto a un t<sub>R</sub>= 2 min (Figura 4.2 F).

De estos ensayos preliminares se llega a las mismas conclusiones que las propuestas por otros investigadores acerca de los productos intermedios de reacción (Liu et al., 2009) usando de peroxidasa, a la bilirrubina oxidasa. Ellos proponen un producto intermedio en la oxidación de RBBR, el 2-2´-disulfonil azobenceno (DSAB), basado en otras investigaciones previas con un colorante de estructura similar, degradado también con una peroxidasa (Sugano et al., 2009), con longitudes de onda del producto (400-500 nm) y color rojizo-marrón de la reacción. Además, la reacción tendrá el mismo mecanismo de reacción al realizarse con una peroxidasa. Por tanto, estos tres factores comunes haces que concluyamos lo mismo que los autores previos (Liu et al., 2009; Sugano et al., 2009), en cuanto al producto intermedio de reacción, proponiendo un proceso global de biodegradación con una reacción enzimática (4.5 A) seguida de un conjunto de reacciones no enzimáticas ( 4.5 B):

$$RBBR + H_2O_2 - 2e^- + 2H^+ \xrightarrow{HRP/SBP} RBBRR + 2H_2O$$
(4.5 A)

$$RBBRR \to DSAB \to Productos \tag{4.5 B}$$

Así que el mecanismo de reacción que siguen ambos colorantes (C) degradados por peroxidasas y en ausencia de mediador, se puede generalizar según el proceso (4.6), que comienza con la formación enzimática de un colorante radical, CR (Reacción 4.6 A), el cual evoluciona mediante una serie de reacciones no enzimáticas acopladas (Reacción 4.6 B):

$$C + H_2O_2 - 2e^- - 2H^+ \xrightarrow{HRP/SBP} CR + 2H_2O$$

$$(4.6 \text{ A})$$

$$CR \rightarrow \rightarrow \text{Productos}$$
 (4.6 B)

hacia diversos productos intermedios y finales, inocuos para su eliminación en vertidos industriales.

A continuación se realizaron conjuntos de ensayos cinéticos, sobre la biodegradación enzimática de los colorantes catalizada por HRP y SBP. Se estudió la influencia del pH y de las concentraciones iniciales de enzima, sustrato y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, manteniendo constantes el resto de las condiciones experimentales. De este modo pudo comprobarse cómo afectaba la variación de estos factores a varios parámetros cinéticos. Entre ellos, la velocidad de reacción en el estado estacionario ( $V_{ss}$ ), la constante aparente de velocidad de biodegradación de colorante ( $\gamma$ ), y la cantidad de colorante biodegradado al final de cada ensayo, usualmente igual a su concentración inicial [C]<sub>o</sub>.

#### **4.3 INFLUENCIA DEL PH**

Los ensayos cinéticos acerca de la influencia del pH sobre la biodegradación enzimática del colorante IC, catalizada por HRP (Figura 4.5 A) y SBP (Figura 4.5 B), se realizaron registrando durante 30 min la disminución de absorbancia a 610 nm ( $A_{610}$ ) en diversos tampones. Concretamente, tampón citrato sódico (CB) 10 mM pH 2.0 hasta 6.5 y en tampón fosfato sódico (PB) 10 mM pH 5.5 hasta 8.5, en ambos casos cada 0.5 unidades de pH. Se observó que la biodegradación enzimática de IC no fue apreciable en PB desde pH 5.5 hasta 8.5, tampoco en el intervalo de pH común entre PB y CB desde pH 5.5 hasta 6.5, ni en CB con pH  $\geq$  4.0. La decoloración de IC solamente fue significativa en CB con valores de pH comprendidos entre 2 y 3.5.

Analizando la velocidad inicial del proceso, considerada equivalente a la velocidad de estado estacionario de la reacción enzimática,  $V_{ss}$  (Figura 4.5 C), se confirmó la mayor rapidez de actuación de HRP y SBP a valores de pH ácido entre 2.0 y 3.5. Sin embargo, los valores habituales de pH óptimo para ambas enzimas se encuentran próximos a la neutralidad (Hamid y Khalil ur, 2009; Ryan et al., 2006). Es posible que los grupos sulfonato presentes en la estructura de IC (Figura 4.3) se encuentren como tales, desprotonados y con carga negativa ( $SO_3^-$ ) a pH 4.0 y superiores, mientras que podrían estar parcialmente protonados y sin carga ( $SO_3H$ ) a pH 3.5 e inferiores, lo cual explicaría la mayor actividad catalítica de HRP y SBP a estos valores ácidos de pH. Por otra parte, ambas enzimas mostraron mayor estabilidad a valores de pH 3.0 y superiores, en ensayos discontinuos de control de actividad, tras su incubación en distintos tampones y valores de pH (datos no mostrados). Por todo ello, los ensayos posteriores de biodegradación enzimática de IC, se realizaron en CB 10 mM pH 3.0.


**FIGURA 4.5** 

Efecto del pH sobre la biodegradación enzimática de IC catalizada por HRP (A) y SBP (B) y velocidad de reacción de ambas reacciones a distinto pH (C). (A) HRP 19.07 nM, IC 144.34  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 mM en CB 10 mM pH 2.0-6.5, o PB 10 mM pH 5.5-8.5 y (B) SBP 22.88 nM, IC 113.27  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 mM en CB 10 mM pH 2.0-6.5 o PB 10 mM pH 5.5-8.5.(C) (**■**) HRP 19.07 nM y. (□) SBP 22.88 nM.



Efecto del pH sobre la biodegradación enzimática de RBBR catalizada por HRP y SBP. Velocidad de reacción ( $\mu$ M/s) de ambas reacciones a distinto pH. HRP/SBP 103.25 nM, RBBR 24  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 mM en CB 10 mM pH 2.0-6.5 o PB 10 mM pH 5.5-8.5.

En el caso de RBBR, los ensayos cinéticos acerca de la influencia del pH se realizaron a una absorbancia de 595 nm en los mismos tampones (Figura 4.6). Se observó que la biodegradación enzimática de RBBR no fue apreciable en PB entre pH 2-4 y 2-3.5 ante CB y entre pH 6-8.5 y 5.5-8.5 ante PB, para HRP y SBP respectivamente (Figura 4.6). Por tanto, la decoloración de RBBR fue significativa en CB con valores de pH comprendidos entre 4-5.5 y 3.5-5 respectivamente, para HRP y SBP.

Analizando la velocidad inicial del proceso (Figura 4.6), se confirmó la mayor rapidez de actuación de HRP y SBP a valores de pH ácido entre 3.5 y 5.5 aproximadamente. Sin embargo, los valores habituales de pH óptimo para ambas enzimas se encuentran próximos a la neutralidad (Hamid y Khalil ur, 2009; Ryan et al., 2006). Es posible que este comportamiento se deba en parte, al grado de protonación de los grupos sulfonatos presentes en RBBR (Figura 4.4). Sin embargo no es el único factor, puesto que el intervalo de pH óptimo de HRP y SBP ante RBBR (Figura 4.6), no es tan ácido como ante IC (Figura 4.5C). Por tanto, también deben contribuir otros elementos estructurales de ambos colorantes, como anillos, heteroátomos y sustituyentes (Figuras 4.3 y 4.4). Por otra parte, ambas enzimas mostraron mayor estabilidad a valores de pH 3.0 y superiores, en ensayos discontinuos de control de actividad, tras su incubación en distintos tampones y valores de pH (datos no mostrados). Por todo ello, los valores de pH óptimo para la biodegradación de RBBR con HRP y SBP, son 5.0 y 4.0 para HRP y SBP, respectivamente.

## 4.4 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE ENZIMA

Posteriormente, se realizaron ensayos cinéticos de biodegradación de ambos colorantes con distintas concentraciones iniciales de HRP (Figura 4.7 A para IC y Figura 4.7 C para RBBR) y SBP (Figura 4.7 B para IC y Figura 4.7 B para RBBR), comprobándose la completa decoloración al final de las reacciones. No obstante, las menores concentraciones de enzima necesitaron largos tiempos de reacción, mientras que los mayores valores de  $[E]_0$  completaron la biodegradación de los colorantes en menos de 30 min.

Los registros experimentales obtenidos durante 30 min se ajustaron satisfactoriamente mediante regresión no lineal a una ecuación uniexponencial decreciente:

$$\begin{bmatrix} C \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} C \end{bmatrix}_0 e^{-\gamma t} \tag{4.7}$$

La lentitud de las reacciones con las bajas concentraciones de enzima, originó valores no fiables de la amplitud del colorante decolorado en 30 min, mientras que ésta se mantuvo constante a altos valores de  $[E]_0$ , tanto para IC (Figura 4.8) como para RBBR (Figura 4.9), con ambas peroxidasas (HRP y SBP). Sin embargo, los valores de la constante de velocidad de biodegradación de los colorantes, $\gamma$ , indicativa de la rapidez de la decoloración de C, aumentaron linealmente con  $[E]_0$  (Figuras 4.8 y 4.9). Un comportamiento cinético similar también se obtuvo con los datos experimentales de la velocidad inicial del proceso de biodegradación, que equivale a la velocidad de estado estacionario de las biodegradaciones enzimáticas de IC (Figura 4.8) y RBBR (Figura 4.9), catalizadas por HRP y SBP.

Estos resultados confirman que la reacción enzimática (Reacción 6A) es la etapa determinante de la velocidad, en el proceso global de la biodegradación de IC y de RBBR (Reacciones 6A y 6B), desencadenado por HRP y SBP. En la reacción de ambas peroxidasas, la enzima cataliza la oxidación del sustrato reductor, el colorante C, por el sustrato oxidante, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, siendo la expresión analítica de su velocidad de estado estacionario:

$$V_{ss} = \frac{k_{cat} [E]_0 [H_2 O_2]_0 [C]_0}{K_m^C [H_2 O_2]_0 + K_m^{H_2 O_2} [C]_0 + [H_2 O_2]_0 [C]_0} \approx \frac{k_{cat} [E]_0 [C]_0}{K_m^C + [C]_0}$$
(4.8)

#### Magdalena Parra Carrillo



Efecto de [HRP]<sub>0</sub> (A, C) y [SBP]<sub>0</sub> (B,C) sobre la biodegradación enzimática de IC(A,B) y RBBR (C,D): Registros cinéticos de A durante 30 min. Condiciones de reacción: (A) HRP 1.27-15.25 nM, IC 116.61  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 mM en CB 10 mM pH 3.0,(B) SBP 3.05-36.61 nM, IC 93.14  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 mM en CB 10 mM pH 3.0, (C) HRP 2.5-30 nM, RBBR 50  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 mM en CB 10 mM pH 5.0 y (D) SBP 2.5-30 nM, RBBR 50  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 mM en CB 10 mM pH 4.0.



**FIGURA 4.8** 

Efecto de  $[HRP]_0$  (A) y  $[SBP]_0$  (B) sobre la biodegradación enzimática de IC representando los parámetros cinéticos  $[IC]_0$ ,  $\gamma$  y  $V_{ss}$  vs.  $[E]_0$  durante 30 min. Condiciones de reacción: (A) HRP 1.27-15.25 nM, IC 116.61  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 mM en CB 10 mM pH 3.0 y (B) SBP 3.05-36.61 nM, IC 93.14  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 mM en CB 10 mM pH 3.0,





Efecto de [HRP]<sub>0</sub> (A) y [SBP]<sub>0</sub> (B) sobre la biodegradación enzimática de RBBR representando los parámetros cinéticos [RBBR]<sub>0</sub>,  $\gamma$  y V<sub>ss</sub> vs. [E]<sub>0</sub> durante 30 min. Condiciones de reacción: (A) HRP 2.5-30 nM, RBBR 50  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 mM en CB 10 mM pH 5.0 y (B) SBP 2.5-30 nM, RBBR 50  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 mM en CB 10 mM pH 4.0.

Esta expresión corresponde a un mecanismo de reacción enzimática bisustrato Bi-Bi-Ping-Pong, simplificable a un mecanismo de reacción monosustrato de Michaelis-Menten, cuando la concentración inicial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es saturante respecto a su propia constante de Michaelis,  $[H_2O_2]_0 \gg K_m^{H_2O_2}$  (Fenoll et al., 2005; Gilabert et al., 2004a; Gilabert et al., 2004b; Gilabert et al., 2004c; Rodriguez-Lopez et al., 2000).

## 4.5 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE COLORANTE

A continuación, se eligieron concentraciones iniciales apropiadas de colorante, variando su concentración inicial. Para ello se realizaron experimentos detectando durante 30 min, la disminución de  $A_{610}$  y de  $A_{595}$  para IC y RBBR, respectivamente. Dentro del rango estudiado de concentraciones de IC (8.47-101.69  $\mu$ M), la buena actividad catalítica alcanzada por las enzimas HRP y SBP, permitió la decoloración completa en menos de 30 min. para sus concentraciones más altas, y en menos de 15 min para sus concentraciones más bajas (Figuras 4.10 A y B). Para el caso de RBBR, el rango estudiado fue 10-120  $\mu$ M y se degradó, para el caso de HRP entre un 57-67% y para el caso de SBP entre 48-64% en 30 min (Figuras 4.10 C y D).

Los registros cinéticos obtenidos se ajustaron mediante regresión no lineal a una ecuación uniexponencial decreciente (Ecuación 4.7). El parámetro de amplitud de la exponencial corresponde a la cantidad de colorante biodegradado y equivale a su concentración inicial. Por ello (Figuras 4.11 A y B), la representación de la amplitud de A<sub>610</sub> en ordenadas, respecto a la concentración inicial de IC en abscisas, mostró una linealidad característica de la ley de Beer-Lambert, puesto que la absorbancia fue proporcional a la concentración inicial de IC, así como al recorrido óptico del haz de luz en el lector de placas, cuyo valor varía según la altura del líquido en cada pocillo, correspondiente al volumen total de reactivos en cada ensayo. Unos resultados similares se obtuvieron para la biodegradación de RBBR con HRP (Figura 4.12A) y SBP (Figura 4.12B)

La rapidez de la biodegradación enzimática, descrita por el argumento del término exponencial,  $\gamma$  (Ecuación 4.7), no varió con la concentración inicial de IC (Figura 4.11) ni de RBBR (Figura 4.12), con ambas peroxidasas. Sin embargo, la velocidad inicial del proceso, equivalente a  $V_{ss}$ , aumentó linealmente con [IC]<sub>0</sub> (Figuras

4.11 A y B) y con RBBR (Figura 4.12), ante HRP y SBP. Este último comportamiento indica que el intervalo de concentración de colorante utilizado, se encuentra muy por debajo de su constante de Michaelis. La gran absortividad molar de los colorantes,  $\varepsilon_{610} = 22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y,  $\varepsilon_{595} = 8000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para IC y RBBR respectivamente, impide elevar el intervalo de [C]<sub>0</sub>, puesto que puede saturar el detector instrumental e incluso originar desviaciones de la linealidad, apartándose de la proporcionalidad entre absorbancia y concentración establecida por la ley de Beer-Lambert. Se concluye que los resultados experimentales están descritos por un comportamiento cinético de primer orden respecto al sustrato reductor de HRP y SBP, el colorante C. Así, la expresión de  $V_{ss}$ :

$$V_{ss} = \frac{k_{cat} [E]_0 [C]_0}{K_m^C + [C]_0} \simeq \frac{k_{cat} [E]_0 [C]_0}{K_m^C}, \quad [C]_0 \ll K_m^C$$
(4.9)

es aplicable en condiciones de saturación del sustrato oxidante,  $[H_2O_2]_0 \gg K_m^{H_2O_2}$ .

Esta propiedad de  $V_{ss}$  es característica del estado estacionario de HRP y SBP, en la fase inicial de los registros cinéticos, durante la cual existe un consumo despreciable del sustrato reductor,  $[C] \simeq [C]_0$ . Por otra parte, la Ecuación 9 permite deducir otra expresión que describe el comportamiento cinético global, o curva de progreso de la biodegradación del colorante, en las fases posteriores de los registros cinéticos, cuando existe un consumo significativo del sustrato, $[C] \ll [C]_0$ :

$$V_{ss} = -\frac{d[C]}{dt} = \frac{k_{cat}[E]_0[C]_0}{K_m^C}$$
(4.10)

$$-\int_{[C]_{0}}^{[C]} \frac{d[C]}{[C]} = \frac{k_{cat}[E]_{0}}{K_{m}^{C}} \int_{0}^{t} dt$$
(4.11)

$$[C] = [C]_0 e^{-\frac{k_{cat}[E]_0}{K_m^C}t} = [C]_0 e^{-\gamma t}$$
(4.12)

Esta expresión (Ecuación 4.12) comunica el sentido físico a la constante de velocidad de la biodegradación de C,  $\gamma$  (Ecuación 4.7), la cual equivale a la potencia catalítica  $(V_{\text{max}}/K_m^c)$  de la reacción enzimática (Reacción 4.6 A) de oxidación del colorante. La combinación del mecanismo de reacción propuesto (Reacción 4.6), más el modelo cinético de la biodegradación de IC (Ecuaciones 4.7-4.12), pueden ser utilizados para interpretar los resultados experimentales.





Efecto de  $[C]_0$  sobre la biodegradación enzimática catalizada por HRP (A, C) y SBP (B,D). Registros cinéticos de A<sub>610</sub> y A<sub>595</sub> durante 30 min. Condiciones de reacción: (A) HRP 12.71 nM, IC 8.47-101.69  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 mM en CB 10 mM pH 3.0, (B) SBP 22.88 nM, IC 8.47-101.69  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 mM en CB 10 mM pH 3.0, (C) HRP 39.25 nM, RBBR 10-120  $\mu$ M, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 mM en CB 10 mM pH 5.0 y (D) SBP 100 nM, RBBR 10-120  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 mM pH 4.0.



## FIGURA 4.11

Representación de [IC]<sub>0</sub>,  $\gamma$  y V<sub>ss</sub> vs. [IC]<sub>0</sub>. Condiciones de reacción: (A) HRP 12.71 nM, IC 8.47-101.69  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 mM en CB 10 mM pH 3.0 y (B) SBP 22.88 nM, IC 8.47-101.69  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 mM en CB 10 mM pH 3.0.



#### **FIGURA 4.12**

Representación de [RBBR]<sub>0</sub>,  $\gamma$  y  $V_{ss}$  vs. [RBBR]<sub>0</sub>. Condiciones de reacción: (A) HRP 39.25 nM, RBBR 10-120  $\mu$ M, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 mM en CB 10 mM pH 5.0 y (B) SBP 100 nM, RBBR 10-120  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 mM en CB 10 mM pH 4.0.

Este modelo concuerda con la independencia del parámetro experimental [C]<sub>0</sub> y la variación lineal de  $V_{ss}$  y de  $\gamma$  respecto a [E]<sub>0</sub> (Figuras 4.8 y 4.9), así como con la proporcionalidad lineal de  $V_{ss}$  y de [C]<sub>0</sub> y la independencia de  $\gamma$  respecto a [C]<sub>0</sub> (Figuras 4.11 y 4.12). A partir de los últimos datos de  $V_{ss}$  vs. [C]<sub>0</sub> (Figuras 4.11 y 4.12), puede determinarse la eficacia catalítica,  $k_{cat}/K_m^{IC}$ , de ambas enzimas sobre los colorantes (Ecuación 4.9), resultando unos valores sobre IC de 0.24 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> y 0.073 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> para HRP y SBP, respectivamente y sobre RBBR unos valores de 0.195 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> y 0.197 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> para HRP y SBP respectivamente. Por tanto, la eficacia catalítica de HRP sobre IC es mucho mayor que la de SBP y es parecida a la de RBBR con ambas peroxidasas.

## 4.6 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Finalmente, se utilizaron concentraciones iniciales adecuadas de peroxidasas y del sustrato reductor C, para estudiar su biodegradación variando la concentración inicial del sustrato oxidante  $H_2O_2$ , desde valores inferiores hasta superiores a la  $[C]_0$  sometido a decoloración. Con tal fin, se efectuaron ensayos cinéticos con HRP y SBP (Figura 4.13 A-D) respectivamente, que mostraron el descenso de A durante 30 min, en presencia de diferentes concentraciones iniciales de  $H_2O_2$ . Los datos experimentales de las curvas de progreso fueron ajustados mediante regresión no lineal a una ecuación uniexponencial decreciente (Ecuación 4.7), mientras que sus porciones iniciales con comportamiento lineal también fueron ajustadas a una recta, obteniéndose los valores de sus respectivos parámetros cinéticos.

Los registros cinéticos indican que la biodegradación de todo el C presente en el medio de reacción, no es posible cuando  $[H_2O_2]_0 < [C]_0$ , mientras que sí lo es cuando  $[H_2O_2]_0 \ge [C]_0$ . Esto se aprecia con el aumento gradual de la amplitud de C biodegradado, hasta que resulta constante a partir de una concentración equivalente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, comportamientos ajustados a rectas discontinua y continua, respectivamente (Figuras 4.14 y 4.15). Puesto que la biodegradación de C requiere una concentración inicial igual o superior de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la estequiometría de la reacción entre ambos es  $[H_2O_2]_0/[C]_0 = 1:1$ . Este valor concuerda con el mecanismo de reacción propuesto para el proceso de biodegradación enzimática de C, catalizado por HRP y SBP (Ecuación 4 6).

Además, se observó que la rapidez de la biodegradación de IC disminuyó al

aumentar [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sub>0</sub>, hasta alcanzar un valor constante, en el caso de IC por encima de 100  $\mu$ M (Figuras 4.13 A y B). En la primera fase se observó un descenso lineal (trazo discontinuo), seguido de una segunda fase con un nivel constante (trazo continuo), en los valores de la constante de velocidad de la biodegradación de IC,  $\gamma$  (Figuras 4.14 A y B). Para el caso de RBBR, se observó el mismo comportamiento en los valores de  $\gamma$ . La primera fase también mostró un descenso lineal (trazo discontinuo), mientras que la segunda fase alcanzó un nivel constante (trazo continuo), por encima de 80  $\mu$ M y 60  $\mu$ M, de [ $H_2O_2$ ]<sub>0</sub> para HRP y SBP, respectivamente (Figuras 4.15 A y B).

En cuanto a la velocidad inicial del proceso, equivalente a la velocidad de estado estacionario de la enzima utilizada,  $V_{ss}$ , aumentó hiperbólicamente con la  $[H_2O_2]_0$  y se ajustó a la ecuación de Michaelis (Figuras 4.14 y 4.15). Se obtuvieron unos valores de  $K_m^{H_2O_2}$  aparente, iguales a 55 µM y a 28 µM para IC degradada por HRP y SBP respectivamente (Figura 4.14). Para el caso de RBBR, se obtuvieron valores iguales a 6 µM y a 20 µM para HRP y SBP, respectivamente (Figura 4.15).

Esta dependencia hiperbólica se mantuvo hasta una  $[H_2O_2]_0 = 2 \text{ mM}$  (datos no mostrados) para IC y hasta una  $[H_2O_2]_0 = 1 \text{ mM}$  para RBBR, por lo que HRP y SBP no mostraron inhibición por  $H_2O_2$  dentro de este intervalo de concentración. Esta inhibición sí aparece en la biodegradación de fenoles por HRP y SBP (Caza et al., 1999; Miland et al., 1996; Nicell et al., 1995)) y puede ser evitada dosificando bajas concentraciones de  $H_2O_2$ , en adiciones sucesivas hasta la completa biodegradación del contaminante.

Los bajos valores de la constante de Michaelis aparente para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $(K_m^{H_2O_2})_{ap}$ , justifican la lentitud de la reacción de biodegradación de C a valores de  $[H_2O_2]_0 < 5(K_m^{H_2O_2})_{ap}$ , así como la tendencia hacia la saturación a partir de valores de  $[H_2O_2]_0 \ge 5(K_m^{H_2O_2})_{ap}$  (Figuras 4.14 y 4.15). Además, es en éste intervalo de saturación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cuando resulta aplicable el modelo cinético propuesto (Ecuaciones 4.9 y 4.12).

Tesis Doctoral



## **FIGURA 4.13**

Efecto de  $[H_2O_2]_0$  sobre la biodegradación enzimática de IC (A,B) y RBBR (C,D) catalizada por HRP y SBP . Registros cinéticos de A durante 30 min. Condiciones de reacción: (A) HRP 19.07 nM, IC 113.98  $\mu$ M y  $H_2O_2$  20-240  $\mu$ M en CB 10 mM pH 3.0, (B) SBP 22.88 nM, IC 86.44  $\mu$ M y  $H_2O_2$  20-240  $\mu$ M en CB 10 mM pH 3.0, (C) HRP 7.5 nM, RBBR 50  $\mu$ M y  $H_2O_2$  10-120  $\mu$ M en CB 10 mM pH 5.0 y (D) SBP 8.5 nM, RBBR 50  $\mu$ M y  $H_2O_2$  10-120  $\mu$ M en CB 10 mM pH 4.0.



**FIGURA 4.14** 

**Representación de [IC]**<sub>0</sub>,  $\gamma$  y  $V_{ss}$  vs. [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sub>0</sub>. Condiciones de reacción: (A) HRP 19.07 nM, IC 113.98  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20-240  $\mu$ M en CB 10 mM pH 3.0 y (B) SBP 22.88 nM, IC 86.44  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20-240  $\mu$ M en CB 10 mM pH 3.0.



#### **FIGURA 4.15**

Representación de [IC]0,  $\gamma$  y V<sub>ss</sub> vs. [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sub>0</sub>. Condiciones de reacción: (A) HRP 7.5 nM, RBBR 50  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10-120  $\mu$ M en CB 10 mM pH 5.0 y (B) SBP 8.5 nM, RBBR 50  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10-120  $\mu$ M en CB 10 mM pH 4.0.

# 4.7 OPTIMIZACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE LOS COLORANTES

El mecanismo de reacción (Ecuaciones 4.1 a 4.6) y el modelo cinético (Ecuaciones 4.7 a 4.12) propuestos, son válidos para la descripción de los resultados experimentales y para la predicción de nuevos experimentos, en el posible escalado del proceso de biodegradación enzimática tanto de IC como de RBBR catalizado por HRP y SBP. Los resultados de esta investigación confirman que es factible la biodegradación enzimática de ambos colorantes, en ausencia de mediadores sintéticos. Son recomendables unas condiciones de reacción habitualmente comprendidas entre IC 90-120  $\mu$ M, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 250-1000  $\mu$ M y HRP/SBP 10-30 nM en tampón pH 3.0. Para el caso de la degradación de 50  $\mu$ M RBBR, las condiciones óptimas son de 30 nM HRP/SBP,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 250  $\mu$ M y pH 5.0 y 4.0 respectivamente para cada enzima, durante menos de 30 min. y a temperatura ambiente. Se superan así otros procedimientos fisicoquímicos, enzimáticos y microbianos, tanto para IC (Tabla 1.3.1) como para RBBR (Tabla 1.3.2), que requieren horas o días de reacción.

El comportamiento biocatalítico de HRP y SBP indica que HRP muestra mayor eficacia catalítica que SBP, aunque ésta posee mayor estabilidad y menor coste. Por tanto, la elección de una u otra enzima puede depender de las características concretas de cada vertido industrial en empresas textiles, tales como pH, temperatura, colorantes y sustancias presentes en el mismo, las cuales podrían actuar como activadores o inhibidores enzimáticos. Por tanto, el presente estudio describe una metodología útil para su adaptación individualizada, a la biodegradación enzimática catalizada por peroxidasas de IC, RBBR y de otros colorantes, en los vertidos industriales de empresas textiles.



# Biodegradación enzimática de Índigo Carmín por sistemas enzima-mediador

# 5 BIODEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE INDIGO CARMIN POR SISTEMAS ENZIMA-MEDIADOR.

# 5.0 BIODEGRADATION OF IC BY ENZYME-MEDIATOR SYSTEMS: SUMMARY

Indigo Carmine (IC) biodegradation was carried out by laccase from Trametes villosa (TvL) and peroxidase from soybean (SBP) using the natural mediators ASG, MSG, SGA and SGO. Preliminary studies were carried out by different analytical assays, the aim of those studies was to understand what was happening during the reaction. For that, spectra of substrate and mediators are necessary at the reaction conditions, for determination the characteristic wavelengths of substrates, mediators and products (Figures 5.2 and 5.3). Due to the impossibility to follow the oxidation of IC and mediators at the same wavelength, the study of the reaction was followed by HPLC. Optimization of the elution program was critical for obtaining the best separation of peaks at minimum time (Figures 5.4 and 5.5). The pH effect revealed that optimum pH for SBP without mediator was around 3.0 with citrate buffer and with mediator 8.0,7.5,7.5 and 7.0 phosphate buffer for MSG, ASG, SGO y SGA respectively. Close to the full biodegradation of the colorant and formation of the product, a decomposition of mediators was observed. In the SGO case, there was a lag time, due to the conversion of SGO to SGA, after that, started the IC biooxidation. These results confirmed that SGO acts as premediator, being SGA the true mediator of LMS. The experimental dependences observed during the steady state and post-steady state, confirmed that the enzymatic reaction is the slowest reaction step. Therefore, the enzymatic reaction acts as the rate-determining step, in the biodegradation of IC.

A reaction mechanism is proposed beside the pH results. This mechanism involves enzymatic and nonenzymatic reactions, in which a premediator (PM), mediator (M) and the mediator radical (MR) are considered (Section 5.4).  $V_{ss}$  values were determined from enzymes, mediator and IC effects. The experimental data obtained agreed with the kinetic analysis, and confirmed the reliability of the reaction mechanism proposed. Thus, the assay conditions for biodegradation of IC, with the enzyme-mediator systems, were optimized.

## 5.1 ENSAYOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Las peroxidasas se han estudiado para la biodegradación enzimática de diversos colorantes (dispersos y otros del tipo reactivo, entre otros), utilizando mediadores sintéticos (HOBT, AQDS, riboflavina y vainillina, entre otros) (Jamal et al., 2010; Jamal et al., 2011a; Jamal et al., 2011b; Jamal et al., 2012). Sin embargo, no se han estudiado para la biodegradación de Índigo Carmín (IC), en presencia de mediadores naturales. Por otra parte, se ha demostrado que sistemas lacasamediador son eficaces degradando IC, con mediadores sintéticos (Daassi et al., 2012). Por ello, se va a estudiar la biodegradación de IC con la enzima SBP, por ser una peroxidasa económica, y se va a contrastar con lacasa de Trametes versicolor (TvL). Se han utilizado los mediadores lignolíticos naturales metilsiringato (MSG), acetosiringona (ASG), alcohol siríngico (SGO) y siringaldehido (SGA), cuyas estructuras químicas se muestran en la Figura 5.1. Los ensayos preliminares espectrofotométricos de la oxidación de IC catalizada por SBP y por TvL (Figuras 5.2 y 5.3, respectivamente), proporcionaron información sobre la viabilidad de biodegradación enzimática del sustrato IC.

Para ello, se realizaron unos espectros de absorción ultravioleta-visible (Fig. 5.2 A), donde se identificaron las longitudes de onda apropiadas para la detección del sustrato IC (610 nm), del producto amarillento intermedio isatina (IS) (400 nm) y de los mediadores, MSG (210 y 280 nm), SGA (210, 310 y 360 nm), ASG (230, 300 y 370 nm) y SGO (210 y 280 nm). Posteriormente, se realizaron los ensayos espectrofotométricos de biodegradación enzimática con SBP (Figuras 5.2 B-E) y con TvL (Figuras 5.3 A-D) en distintas condiciones, registrando para ello espectros iterativos (250-700 nm) cada 3 min. durante 30 min. En ellos, se observó un decrecimiento y crecimiento (representados por flechas) del colorante y producto respectivamente. Por tanto, sí que fue apreciable la biodegradación con ambas enzimas y los mediadores natrales seleccionados, por lo que se avanzó hacia posteriores estudios para optimizar las condiciones de reacción.

## 5.2 ENSAYOS CROMATOGRÁFICOS

La biodegradación enzimática de IC catalizada por SBP y TvL fue también estudiada inicialmente, con el mismo procedimiento detallado en la sección anterior, en un cromatógrafo HPLC-DAD. Este equipo aportó más información sobre los productos de reacción, con los cromatogramas tridimensionales (Figuras 5.4 y 5.5). Se eligieron las longitudes de onda previamente identificadas en el espectrofotómetro

(610, 400, 280, 250 y 210 nm). Se inyectaron muestras a tiempo cero y a los diez minutos de reacción enzimática, observando IC a  $t_R$  = 2.59 min, SGA a  $t_R$  = 2.97 min, MSG a  $t_R$  = 3.24 min e IS a  $t_R$  = 0.45 min (Figuras 5.4 y 5.5).

Las cuatro reacciones se realizaron en un reactor agitado de plástico, para minimizar la inactivación enzimática por su inmovilización sobre las paredes de recipientes de vidrio. En las reacciones con TvL el reactor agitado permaneció abierto al aire, para recibir un continuo aporte de oxígeno y saturar a la enzima con este sustrato oxidante.



FIGURA 5.1

Estructura química de los mediadores naturales lignolíticos investigados



Espectros de absorbancia de las reacciones en condiciones reacción (A): IC 50.85  $\mu$ M, IS 101.7  $\mu$ M y 40  $\mu$ M de mediador y reacciones enzimáticas (B-E) para la degradación de 50.85  $\mu$ M de IC, en tampón fosfato sódico 10 mM, con MSG 59.32  $\mu$ M y SBP 22.88 nM a pH 8.0 (B), con ASG 59.32  $\mu$ M y SBP 45.76 nM a pH 7.5 (C), con SGO 59.32  $\mu$ M y SBP 22.88 nM a pH 7.5 (D) y SGA 39.55  $\mu$ M y SBP 45.76 nM a pH 7.0, cada 3 min durante 30 min. de reacción.



**FIGURA 5.3** 

Espectros de absorbancia de las reacciones enzimáticas para la degradación de IC 50.85  $\mu$ M en tampón acetato sódico 10 mM pH 5.0 y las condiciones enzima-mediador (A) MSG 39.55  $\mu$ M y TvL 3.81 nM ,(B), ASG 59.32  $\mu$ M y TvL 19.07 nM, (C), SGO 59.32  $\mu$ M y TvL 19.07 nM y (D) SGA 39.55  $\mu$ M y TvL 3.81 nM, cada 3 min. durante 30 min. de reacción



Cromatogramas tridimensionales en HPLC a los 10 minutos de la reacción de biodegradación de 406.76  $\mu$ M IC, en tampón fosfato sódico 10 mM, catalizada por 228.81 nM SBP y 197.73  $\mu$ M MSG a pH 8.0 (A), 228.81 nM SBP y197.73  $\mu$ M ASG a pH 7.5 (B), 76.27 nM SBP y197.73  $\mu$ M SGO a pH 7.5 (C) y 76.27 nM SBP y 197.73  $\mu$ M SGA a pH 7.0 (D).

#### Magdalena Parra Carrillo



#### **FIGURA 5.5**

Cromatogramas tridimensionales en HPLC a los 10 minutos de la reacción de biodegradación de 406.76  $\mu$ M IC catalizada por TvL y 197.73  $\mu$ M de mediador, en tampón acetato sódico 10 mM pH 5.0 (A), 20.9 nM TvL y MSG (B), 15.67 nM TvL y ASG, (C) 62.71 nM TvL y SGO y (D) 20.9 nM TvL y SGA.

La realización de espectros tridimensionales a diversos tiempos de reacción enzimática, permitió comprobar que los mediadores mostraron un ligero descenso inicial, seguido de un mantenimiento simultáneo con la biodegradación de IC. Después de agotado IC, se observó el consumo de los mediadores. En el caso de SGO, se observó su rápida descomposición inicial, coincidente con la aparición de SGA. Por tanto, se dedujo que SGO actuó como premediador, originando SGA que intervino como auténtico mediador (Figuras 5.4C y 5.5C).

## 5.3 INFLUENCIA DEL PH

Los ensayos cinéticos acerca de la influencia del pH sobre la biodegradación enzimática del colorante IC catalizada por sistemas enzima/mediador, se realizaron registrando durante 30 min la disminución de absorbancia a 610 nm en diversos tampones. Concretamente, para el caso de SBP se realizó en tampón citrato sódico (CB) 10 mM pH 4.0 hasta 6.5 y en tampón fosfato sódico (PB) 10 mM pH 5.5 hasta 8.5 y en el caso de TvL se realizó en tampón acetato sódico (AB) 10 mM pH 3.5 hasta 5.5 y en tampón fosfato sódico (PB) 10 mM pH 3.5 hasta 5.5 y en tampón fosfato sódico (PB) 10 mM pH 3.5 hasta 5.5 y en tampón fosfato sódico (PB) 10 mM pH 3.5 hasta 5.5 y en tampón fosfato sódico (PB) 10 mM pH 3.5 hasta 5.5 y en tampón fosfato sódico (PB) 10 mM pH 3.5 hasta 5.5 y en tampón fosfato sódico (PB) 10 mM 5.5-8.5, en todos los casos cada 0.5 unidades de pH.

En las Figuras 5.6 y 5.7 (SBP y TvL, respectivamente) se representa la V<sub>ss</sub> frente a los distintos pHs para los distintos sistemas mediador-enzima, donde se observó cuál era el pH óptimo para cada sistema. Se compara con el sistema sin mediador y se observa que los pHs óptimos varían cuando se añade o no mediador. Así, para el caso de SBP (Figura 5.6) se observó que sin mediador el pH óptimo es ácido (3.0) y con mediador/SBP es pH neutro-básico, y con mediador/TvL alrededor de 5.0. Más exactamente, para MSG, ASG, SGO y SGA con SBP (Figura 5.6) los pHs 8.0, 7.5, 7.5 y 7.0 respectivamente. Para el caso de TvL (Figura 5.7), los pHs óptimos son alrededor de cinco para todos los casos.

Como se observa en la gráfica (Figura 5.6), con SBP,  $V_{ss}$  es más rápida a pHs ácidos sin la necesidad de añadir mediador (a pH 2.0 alcanza un valor de casi 5 nM/s) y a pHs básicos con mediador se alcanzan mayores valores para el mediador SGA (a pH 7.0 alcanza un valor de 3 nM/s). Con TvL (Figura 5.7), los valores de V<sub>ss</sub> son alrededor de 0.5  $\mu$ M/s, por lo tanto son aproximadamente cien veces mayores que con SBP. Sin embargo, los sistemas SBP-mediador y TvL-mediador, serían más apropiados para vertidos industriales con IC y pH 7-8 o bien pH 5, respectivamente.

Considerando los resultados experimentales anteriormente descritos, sobre

ensayos espectrofotométricos y cromatográficos, más el estudio del efecto del pH, se propuso el siguiente mecanismo de reacción, seguido de su análisis cinético.



FIGURA 5.6

Efecto del pH sobre la biodegradación enzimática de 113.27  $\mu$ M IC con 22.88 nM SBP sin mediador, 84.75  $\mu$ M IC, 59.32  $\mu$ M de MSG con 45.77 nM SBP; 109.48  $\mu$ M IC, 59.32  $\mu$ M de ASG con 22.88 nM SBP; 84.75  $\mu$ M IC, 59.32  $\mu$ M de SGO con 22.88 nM SBP; 79.55  $\mu$ M IC, 59.32  $\mu$ M de SGA con 45.77 nM SBP; todos ellos con 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el rango de pHs de 4-5.5 y 5.5-8.5 con citrato y fosfato sódico 10 mM respectivamente



**FIGURA 5.7** 

Efecto del pH sobre la biodegradación enzimática de 103.61  $\mu$ M IC, 59.32  $\mu$ M de MSG con 62.71 nM TvL; 109.48  $\mu$ M IC, 59.32  $\mu$ M de ASG con 62.71 nM TvL; 103.61  $\mu$ M IC, 59.32  $\mu$ M de SGO con 62.71 nM TvL; 106.92  $\mu$ M IC, 59.32  $\mu$ M de SGA con 62.71 nM TvL; todos ellos en el rango de pHs de 3.5-5.5 y de 5.5-8.5 con 10 mM fosfato sódico y acetato sódico respectivamente.

## **5.4 ANÁLISIS CINÉTICO**

De acuerdo con los experimentos preliminares espectrofotométricos y cromatográficos, así como con los resultados del efecto del pH, sobre la biodegradación enzimática de IC catalizada por SBP/TvL-mediadores, se propone un mecanismo de reacción compuesto por las etapas cinéticamente significativas, o determinantes del comportamiento global de la biodegradación. El mecanismo abarca reacciones enzimáticas y no enzimáticas, en las que puede intervenir un premediador (PM), el mediador (M) y el radical del mediador (MR):

$$PM \xrightarrow{k_E^{PM}[E]_0} M \tag{5.1}$$

$$M \xrightarrow{k_E^M[E]_0} MR \tag{5.2}$$

$$MR + IC \xrightarrow{k_{IC}^{M}} M + ICR$$
(5.3)

$$ICR \Longrightarrow DIC \longrightarrow 2IS \longrightarrow 2IAS \longrightarrow 2AAS$$
 (5.4A)

$$ICR + IC \longrightarrow RP \longrightarrow 4IS \longrightarrow 4IAS \longrightarrow 4AAS$$
 (5.4B)

$$AAS \rightarrow \rightarrow \text{Productos}$$
 (5.4C)

La optimización de las primeras reacciones (5.1 a 3.3) determina la eficacia del conjunto de la biodegradación de TCP. Las etapas enzimáticas (5.1) y (5.2) son reacciones que requieren oxidante (Ox),  $H_2O_2$  para SBP y  $O_2$  para TvL, cuyas velocidades dependen de ambos sustratos:

$$V_{E}^{PM} = \frac{k_{cat}^{PM} [E]_{0} [PM]_{0} [Ox]_{0}}{K_{m}^{PM} [Ox]_{0} + K_{m}^{Ox} [PM]_{0} + [PM]_{0} [Ox]_{0}}$$
(5.5)

$$V_{E}^{M} = \frac{k_{cat}^{M} [E]_{0} [M]_{0} [Ox]_{0}}{K_{m}^{M} [Ox]_{0} + K_{m}^{Ox} [M]_{0} + [M]_{0} [Ox]_{0}}$$
(5.6)

Estas reacciones operan con agitación continua, y abierta al aire ante TvL, permitiendo la saturación de la enzima con el oxidante, y conduciendo hacia expresiones de velocidad independientes de la concentración inicial de este sustrato oxidante:

$$V_{E}^{PM} = \frac{k_{cat}^{PM} \left[E\right]_{0} \left[PM\right]_{0}}{K_{m}^{PM} + \left[PM\right]_{0}} \simeq \frac{k_{cat}^{PM} \left[E\right]_{0} \left[PM\right]_{0}}{K_{m}^{PM}} = k_{E}^{PM} \left[E\right]_{0} \left[PM\right]_{0}, \quad \left[PM\right]_{0} \ll K_{m}^{PM} \quad (5.7)$$

$$V_{E}^{M} = \frac{k_{cat}^{M} [E]_{0} [M]_{0}}{K_{m}^{M} + [M]_{0}} \simeq \frac{k_{cat}^{M} [E]_{0} [M]_{0}}{K_{m}^{M}} = k_{E}^{M} [E]_{0} [M]_{0}, \quad [M]_{0} \ll K_{m}^{M}$$
(5.8)

Además, debido a las bajas concentraciones de mediadores utilizadas, las velocidades de las reacciones enzimáticas se simplifican, hasta una dependencia lineal respecto a

las concentraciones iniciales de enzima y de mediador (Ecuaciones 5.7 y 5.8). Así, las constantes cinéticas de las reacciones 5.1, 5.2 y 5.3 tienen dimensiones de primer orden. El comportamiento cinético de este mecanismo de reacción, se desarrolla en varias fases de tiempo.

#### Fase inicial: Reacción 5.1

La enzima cataliza la rápida conversión de PM en M. Así, las ecuaciones diferenciales del proceso:

$$d\left[PM\right]/dt = -k_E^{PM}\left[E\right]_0\left[PM\right], \quad \left[PM\right] = \left[PM\right]_0 \quad t = 0$$
(5.9)

$$d[M]/dt = k_E^{PM}[E]_0[PM], [M] = 0 \ t = 0$$
 (5.10)

pueden resolverse utilizando la transformada de Laplace, la cual proporciona expresiones uniexponenciales, decreciente para el premediador y creciente para el mediador:

$$[PM] = [PM]_0 e^{-\theta t} = [PM]_0 e^{-k_E^{PM}[E]_0 t}$$
(5.11)

$$[M] = [M]_{f} (1 - e^{-\theta_{t}}) = [PM]_{0} (1 - e^{-k_{E}^{PM}[E]_{0}t})$$
(5.12)

#### Fase estacionaria: Reacciones 5.2 y 5.3

Las reacciones evolucionan hacia un estado estacionario, según describe el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales (5.13 a 5.16), con sus respectivas condiciones iniciales (5.16 y 5.17):

$$d\left[M\right]/dt = -k_E^M\left[E\right]_0\left[M\right] + k_{IC}^M\left[IC\right]_0\left[MR\right]$$
(5.13)

$$d\left[MR\right]/dt = k_E^M \left[E\right]_0 \left[M\right] - k_{IC}^M \left[IC\right]_0 \left[MR\right]$$
(5.14)

$$d\left[IC\right]/dt = -k_{IC}^{M}\left[IC\right]_{0}\left[MR\right]$$
(5.15)

$$[M] = [M]_0, [MR] = 0, t = 0$$
 (5.16)

$$[IC] = [IC]_0, \quad t = 0$$
 (5.17)

En condiciones de estado estacionario:

$$d\left[M\right]/dt = d\left[MR\right]/dt = 0$$
(5.18)

el anterior sistema de ecuaciones diferenciales se convierte en un sistema de ecuaciones algebraicas, que conduce a las siguientes expresiones:

$$[M]_{ss} = \frac{k_{TCP}^{M} [IC]_{0} [M]_{0}}{k_{E}^{M} [E]_{0} + k_{IC}^{M} [IC]_{0}}, \quad [MR]_{ss} = \frac{k_{E}^{M} [E]_{0} [M]_{0}}{k_{E}^{M} [E]_{0} + k_{IC}^{M} [IC]_{0}}$$
(5.19)

$$[IC]_{ss} = [IC]_0 - \frac{k_E^M k_{TCP}^M [E]_0 [IC]_0 [M]_0}{k_E^M [E]_0 + k_{IC}^M [IC]_0} t$$
(5.20)

Si la reacción no enzimática 5.3 fuera más rápida que la reacción enzimática 5.2,

$$k_{IC}^{M} \left[ IC \right]_{0} \gg k_{E}^{M} \left[ E \right]_{0}$$
(5.21)

las anteriores ecuaciones se simplificarían:

$$[M]_{ss} \simeq [M]_0, \quad [MR]_{ss} \simeq \frac{k_E^M [E]_0 [M]_0}{k_{IC}^M [IC]_0} \to 0$$
(5.22)

$$\left[IC\right]_{ss} \simeq \left[IC\right]_{0} - k_{E}^{M} \left[E\right]_{0} \left[M\right]_{0} t = \left[IC\right]_{0} - V_{ss}t$$
(5.23)

#### Fase postestacionaria: Reacciones 7.2 y 7.3

Otra parte de la destrucción de IC ocurrirá durante esta fase, en la cual el mediador continúa en un estado estacionario restringido (Ecuación 5.22). Así, la única ecuación diferencial corresponde a IC:

$$d\left[IC\right]/dt = -k_{IC}^{M}\left[MR\right]_{ss}\left[IC\right]$$
(5.24)

de nuevo con la anterior condición inicial (Ecuación 5.17). El uso de la transformada de Laplace lleva a las ecuaciones:

$$[IC] = [IC]_{ss} e^{-\gamma t}$$
(5.25)

$$\gamma = \frac{k_E^M k_{IC}^M [E]_0 [M]_0}{k_E^M [E]_0 + k_{IC}^M [IC]_{ss}}$$
(5.26)

Sin embargo, con la posible consideración de la reacción enzimática 5.2 como etapa determinante de la velocidad (Ecuación 5.21), la expresión de  $\gamma$  puede simplificarse:

$$\gamma \simeq \frac{k_E^M \left[E\right]_0 \left[M\right]_0}{\left[IC\right]_{ss}}$$
(5.27)

El periodo de semirreacción o vida media,  $t_{50}$ , es el tiempo requerido para la biodegradación del 50%, de la concentración inicial del colorante en esta fase:

$$t_{50} = \frac{\ln 2}{\gamma} = \frac{\ln 2}{k_E^M [E]_0 [M]_0 / [IC]_{ss}}, \quad [IC]_{50} = \frac{[IC]_{ss}}{2}$$
(5.28)

Además, según el desarrollo en serie de la función exponencial, el término uniexponencial podría aproximarse por un término lineal, al comienzo de esta fase de la biodegradación del mediador:

$$[IC] \simeq [IC]_{ss} - [IC]_{ss} \gamma t = [IC]_{ss} - k_E^M [E]_0 [M]_0 t, \quad t \to 0$$
(5.29)

A partir de este análisis cinético se aplicó un diseño experimental, que abarcó un conjunto de ensayos cinéticos sobre la biodegradación enzimática de IC, catalizada

Magdalena Parra Carrillo

por los sistemas enzima-mediador investigados. Se estudiaron los efectos de las concentraciones iniciales de  $H_2O_2$  (en el caso de SBP), enzima, mediador e IC, manteniendo constantes el resto de las condiciones experimentales.

# 5.5 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

En las reacciones catalizadas por SBP, se utilizaron diversas concentraciones iniciales de peróxido de hidrógeno (20-240  $\mu$ M para los mediadores MSG, SGA y ASG) y 50-600  $\mu$ M para SGO. Se varió la concentración inicial del sustrato oxidante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, desde valores inferiores hasta superiores a la [IC]<sub>0</sub> sometido biodegradación. Con tal fin, se efectuaron ensayos cinéticos con cada sistema SBP-mediador (Figuras 5.8 A-D), que mostraron el descenso de A<sub>610</sub> durante 30 min.

Los registros cinéticos indican que la biodegradación de todo el IC existente en el medio de reacción, sólo es posible cuando  $[H_2O_2]_0 \ge [IC]_0$  (Figuras 5.8 A-D). Esto se observó ante el aumento gradual de la amplitud de IC biodegradado, hasta conseguir la biodegradación completa, a partir de una concentración equivalente o superior de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figuras 5.8 A-D). La rapidez de la reacción disminuyó al aumentar  $[H_2O_2]_0$ ,hasta alcanzar un valor constante (Figuras 5.8 A-D). Esto se debe a que cada vez se descompone más IC, hasta agotarlo totalmente.

Las porciones iniciales de los registros experimentales mostraron un comportamiento lineal (Figuras 5.8 A-D), por lo que fueron ajustadas mediante regresión lineal, obteniendo pendientes que equivalen a sus velocidades de estado estacionario, V<sub>ss</sub> (Figura 5.8 E). Los valores de este parámetro cinético aumentaron hiperbólicamente con la  $[H_2O_2]_0$ , por lo que fueron ajustados mediante regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten, utilizando las estimaciones iniciales de  $V_{\text{max}}^{H_2O_2}$  y  $K_{\text{m}}^{H_2O_2}$ , previamente obtenidas a partir de la gráfica lineal de Hanes-Woolf,  $[H_2O_2]_0/V_{ss}$  frente a  $[H_2O_2]_0$  (Figura 5.8 E). En promedio, se obtuvo un valor de  $K_{\text{m}}^{H_2O_2}$  aparente de 30 µM, para SBP en presencia de los mediadores investigados.

Se observó una tendencia hacia la saturación a partir de valores de  $[H_2O_2]_0 \ge 5(K_m^{H_2O_2})_{ap}$  (Figura 5.8 E), el cual se mantiene hasta una  $[H_2O_2]_0$  2 mM (datos no mostrados). En éste intervalo de saturación por  $[H_2O_2]_0$ , es aplicable el

5.Biodegradación enzimática



**FIGURA 5.8** 

Efecto de  $[H_2O_2]_0$  sobre la biodegradación de IC catalizada por SBP/mediador (A-E). (A-D) Registros cinéticos de A<sub>610</sub> durante 30 min. (E) Parámetros cinéticos (V<sub>ss</sub> y  $[H_2O_2]_0/V_{ss})$ . Condiciones de reacción con mediador 59.32 µM y  $H_2O_2$  20-240 µM para los casos: (A) 90.91 µM IC y 45.8 nM SBP a pH 8.0. (B) 89.58 µM IC y 45.8 nM SBP a pH 7.5. (D) 60.62 µM IC y 22.8 nM SBP a pH 7.0.  $H_2O_2$  50-600 µM para (C) 89.19 µM IC y 45.8 nM SBP a pH 7.5.

modelo cinético propuesto anteriormente (Sección 5.4). Así, la superposición de registros experimentales en el intervalo de saturación por  $[H_2O_2]_0$  (Figuras 5.8 A-D), confirma la independencia de este sustrato oxidante en el análisis cinético desarrollado, a partir de las ecuaciones 5.7 y 5.8. De este modo, se obtuvo un periodo de retardo independiente de la  $[H_2O_2]_0$  (Figura 5.8 C), confirmando el carácter de SGO como premediador (Ecuaciones 5.11 y 5.12).

## 5.6 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE ENZIMA

Posteriormente se realizaron ensayos cinéticos de biodegradación de IC, con distintas concentraciones iniciales de SBP (Figura 5.9) y de TvL (Figura 5.10), comprobándose la completa decoloración de IC, al final de casi todas las reacciones en menos de 30 min. Las menores concentraciones de enzima necesitaron largos tiempos de reacción, mientras que a iguales valores de  $[E]_0$  se completó la biodegradación de IC en distintos tiempos, dependiendo del mediador utilizado.

Tanto en los registros de biodegradación de IC con SBP (Figura 5.9) como con TvL (Figura 5.10), se observó un amplio comportamiento lineal. Este comportamiento cinético se debe a la superposición de dos fases. En primer lugar la fase estacionaria, con una disminución lineal de  $[IC]_{ss}$  (Ecuación 5.23). En segundo lugar, la fase post estacionaria (Ecuaciones 5.25 a 5.27), cuyo comienzo también muestra un descenso lineal de [IC] (Ecuación 5.29), cuya pendiente es igual que la de la fase estacionaria,  $V_{ss}$  (Ecuaciones 5.23 y 5.29).

Los valores experimentales de  $V_{ss}$  aumentaron linealmente con  $[E]_0$  (Figuras 5.9E y 5.10E), de acuerdo con el análisis cinético previo (Ecuaciones 5.23 y 5.29). Además, el periodo de retardo en presencia de SGO disminuyó al aumentar  $[E]_0$  (Figuras 5.9C y 5.10C), indicando una mayor rapidez al elevar  $[E]_0$ , en la conversión del premediador (SGO) en mediador (SGA), dependencia prevista en el análisis cinético (Ecuaciones 5.11 y 5.12).

En los experimentos con SBP, a pH 7.0 -8.0 (Figura 5.9), la biodegradación de IC fue mucho más rápida ante SGA, por lo que fue necesario disminuir unas seis veces la concentración de enzima, para obtener registros detectables en 30 min.

(Figura 5.9 E). Sin embargo, la decoloración de IC con TvL, a pH 5.0 (Figura 5.10), fue más eficaz MSG como mediador (Figura 5.10 E). Contrastando ambas enzimas (Figuras 5.9 y 5.10), se utilizaron mediadores en igual concentración, pero con SBP cuatro veces más concentrada que TvL.

## 5.7 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE MEDIADOR

A continuación se estudió el efecto de la concentración inicial de mediador, sobre la biodegradación de IC con SBP (Figura 5.11) y TvL (Figura 5.12). Para ello, se estudió el comportamiento en el rango 47.5-569.5  $\mu$ M para el caso de SBP/mediador, excepto para SGA, que se estudia en un intervalo de menor concentración, 4.75-56.95  $\mu$ M. En el caso de TvL/mediador se emplearon rangos diferentes para cada mediador, todos ellos comprendidos entre 0.15-9.49  $\mu$ M. Estos intervalos se escogieron para obtener apropiados registros experimentales, dentro de un periodo de reacción de 30 min.

Se observó un comportamiento lineal en la V<sub>ss</sub> frente a la concentración inicial de mediador y una distinta velocidad dependiendo del mediador que se utilice, de acuerdo con el análisis cinético previo (Ecuaciones 5.23 y 5.29). En los sistemas SBP/mediador, el MSG y ASG mostraron velocidades muy similares e inferiores a SGO. El mediador más rápido fue SGA, por lo que fue necesario diluirlo unas diez veces, y por ello se observó una velocidad menor en las gráficas (Figura 5.11 D y E). Para los sistemas TvL/mediador, MSG y ASG fueron los que alcanzaron valores mayores de V<sub>ss</sub>, por lo que fue suficiente utilizar valores bajos de concentración. La rapidez global de la decoloración de IC fue similar con ambas enzimas (Figuras 5.11 y 5.12), con TvL entre dos y cuatro veces más concentrada que SBP, mientras que los mediadores ante SBP (pH 7.0-8.0) se utilizaron entre diez y cien veces más concentrados que en presencia de TvL (pH 5.0).

La actuación de SGO como premediador se confirmó por la existencia de un periodo de retardo constante, al variar la concentración de mediador (Figuras 5.11C y 5.12 C). Este comportamiento cinético concuerda con la independencia de  $[M]_0$  en el argumento del término exponencial correspondiente,  $\theta$ , obtenido en el análisis cinético (Ecuación 5.11).


Efecto de  $[SBP]_0$  sobre la biodegradación enzimática de IC con 59.34  $\mu$ M mediador: A) 61.62  $\mu$ M IC, MSG y SBP 18.3-219.66 nM a pH 8.0. (B) 86.39  $\mu$ M IC, ASG y SBP 18.3-219.66 nM a pH 7.5. (C) 70.26  $\mu$ M IC, SGO y SBP 18.3-219.66 nM nM a pH 7.5. (D) 53.96  $\mu$ M IC, SGA y SBP 3.05-36.61 nM a pH 7.0. (E) V<sub>ss</sub> para cada reacción frente a la concentración de SBP. Todos los ensayos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM y en tampón fosfato sódico 10 mM a 25°C.









Efecto de [Mediador]<sub>0</sub> sobre la biodegradación enzimática de IC catalizada por SBP/mediador. (A-D) Registros cinéticos de A<sub>610</sub> durante 30 min. (E) Parámetro cinético (V<sub>ss</sub>) frente [Mediador]<sub>0</sub>. Condiciones de reacción con mediador 47.5-569.5  $\mu$ M para la degradación: (A) 80.85  $\mu$ M IC con 45.76 nM SBP y MSG a pH 8.0. (B) 86.39  $\mu$ M IC con SBP 45.76 nM y ASG a pH 7.5. (C) 92.45  $\mu$ M IC con SBP 45.76 nM y SGO a pH 7.5. (D) Rango de mediador 4.75-56.65 SGA para degradar 60.11  $\mu$ M IC con 22.88 nM SBP a pH 7.0. Todos los ensayos con 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y tamón fostato sódico 10 mM a 25 °C.





Efecto de [Mediador]<sub>0</sub> sobre la biodegradación enzimática de IC catalizada por TvL/mediador. (A-D) Registros cinéticos de A<sub>610</sub> durante 30 min. (E) Parámetro cinético (V<sub>ss</sub>) frente [Mediador]<sub>0</sub>. Condiciones de reacción: Mediador 0.15-9.49  $\mu$ M, IC 97.98  $\mu$ M y TvL 95.35 nM (A) MSG. (B) ASG. (C) SGO. (D) SGA. Todos los ensayos en tampón acetato sódico 10 mM pH 5.0 y 25 °C.

#### 5.8 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE IC

A continuación, se eligieron concentraciones iniciales de SBP y de TvL adecuadas, según los estudios anteriores, para estudiar la biodegradación del sustrato reductor IC, variando su concentración inicial. Para ello se realizaron experimentos detectando durante 30 min. la disminución de  $A_{610}$ , con varias concentraciones iniciales de IC (Figuras 5.13 y 5.14), donde se observó que a mayor concentración inicial de IC, se necesitaba más tiempo para degradarlo con la misma cantidad de enzima.

Los registros cinéticos obtenidos se ajustaron mediante regresión no lineal a una ecuación uniexponencial decreciente (Ecuación 5.25). El parámetro de amplitud de la exponencial corresponde a la cantidad de colorante biodegradado, y equivale a su concentración inicial. Por ello (Figuras 5.13 E y 5.14 E), la representación de la amplitud de A<sub>610</sub> en ordenadas, respecto a la concentración inicial de IC en abscisas, mostró una linealidad característica de la ley de Beer-Lambert, puesto que la absorbancia fue proporcional a la concentración inicial de IC, así como al recorrido óptico del haz de luz en el lector de placas. Este valor podría variar según la altura del líquido en cada pocillo, correspondiente al volumen total de reactivos en cada ensayo, pero fue mantenido constante con la cuidadosa utilización de jeringas de desplazamiento positivo, apropiadas para la dosificación de pequeños volúmenes de líquidos.

 $V_{ss}$  permaneció constante con [IC]<sub>0</sub> (Figuras 5.13 E y 5.14 E), cumpliendo la predicción del análisis cinético previo (Ecuaciones 5.23 y 5.29), de modo que  $V_{ss}$  tomó valores diferentes según qué sistema SBP/mediador o TvL/mediador fuese utilizado. Así (Figuras 5.13 E), los sistemas SBP/mediador alcanzaron valores más elevados con SGA (utilizado con menos SBP) y los sistemas TvL/mediador mostraron valores más elevados para MSG y ASG (Figura 5.14 E). En consecuencia, en presencia de SBP y a pH 7-8, el mediador más eficaz fue SGA, mientras que ante TvL y a pH 5.0, el mediador más rápido fue MSG.

La aparición de un periodo de retardo constante, al cambiar la concentración inicial del colorante IC, fue observada en las reacciones catalizadas por SBP (Figura 5.13 C) y por TvL (Figura 5.14 C). Esta propiedad cumple la predicción del análisis cinético previo (Ecuación 5.11), puesto que la rapidez de la fase inicial,  $\theta$ , sólo depende de la concentración inicial de la enzima. En consecuencia, se confirma la actuación de SGO como premediador, que genera SGA como auténtico mediador en las reacciones de biodegradación de IC.



Efecto de  $[IC]_0$  sobre la biodegradación enzimática de IC catalizada por SBP/mediador (A-D) Registros cinéticos de A<sub>595</sub> durante 30 min. (E) Parámetros cinéticos (V<sub>ss</sub>,[IC]<sub>o</sub>). Condiciones de reacción con IC 8.47-101.69  $\mu$ M y 59.32  $\mu$ M de mediador: (A) MSG y SBP 45.76 nM a pH 8.0. (B) ASG y SBP 45.76 nM a pH 7.5. (C) SGO y SBP 45.76 nM a pH 7.5. (D) SGA a pH 7.0 y SBP 22.88 nM. Todos los experimentos realizados con 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y tampón fosfato sódico 10 mM a 25 °C.



Efecto de  $[IC]_0$  sobre la biodegradación enzimática de IC catalizada por TvL/mediador (A-D) Registros cinéticos de A<sub>610</sub> durante 30 min. (E) Parámetros cinéticos (V<sub>ss</sub>,[IC]<sub>o</sub>). Condiciones de reacción: IC 8.47-101.69 µM, TvL 38.14 nM y 59.32 µM de mediador: (A) MSG. (B) ASG. (C) SGO. (D) SGA. Todos los ensayos en tampón acetato sódico 10 mM pH 5.0 a 25°C.

# 5.9 OPTIMIZACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE IC

Los anteriores resultados experimentales indican que es posible la biodegradación enzimática de IC, catalizada por SPB o por TvL, en presencia de mediadores naturales. Se ha confirmado la validez del mecanismo de reacción propuesto (Reacciones 5.1 a 5.4), y de su correspondiente análisis cinético (Ecuaciones 5.5 a 5.29). A partir de éste, se ha desarrollado un diseño experimental útil, para la caracterización y escalado de la biodegradación enzimática de IC, por los sistemas enzima-mediador investigados. Considerando unas concentraciones aproximadas de IC 100  $\mu$ M, enzima 40 nM y mediador 60  $\mu$ M, la biodegradación enzimática del colorante puede completarse en unos 10 min. (Figuras 5.13 y 5.14). Los sistemas enzima-mediador más eficaces han sido SBP-SGA a pH 7.0 y TvL-MSG a pH 5.0. Por tanto, se han optimizado las condiciones de biodegradación de IC, para posibles vertidos industriales con diferentes niveles de acidez, y superando a otros procesos más lentos descritos en la bibliografía (Tabla 1.3.1).



# Biodegradación enzimática de Remazol Brilliant Blue Royal por sistemas lacasa-mediador

## 6. BIODEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE REMAZOL BRILLIANT BLUE ROYAL POR SISTEMAS LACASA-MEDIADOR

### 6.0. ENZYMATIC BIODEGRADATION OF RBBR BY LACCASE-MEDIATOR SYSTEMS: SUMMARY

Remazol Brilliant Blue Royal (RBBR) biodegradation was carried out by laccase from *Trametes villosa* (TvL) using the natural mediators ASG, MSG, SGA and SGO. Preliminary studies were done on the spectrophotometer to know the wavelengths of the compounds involved in the reaction (Figure 6.1) and on the HPLC to monitor the reaction course identifying its wavelengths and retention time. Optimization of the elution program was critical for obtaining the best separation of peaks at minimum time (Figures 6.2 and 6.3).

The pH effect revealed that optimum pH for the four reactions were in the range of 5-6, thus pH 5.5 was selected as optimum. Close to the full biodegradation of the colorant and formation of the product, a decomposition of mediators was observed. In the SGO case, there was a lag time, due to the conversion of SGO to SGA, after that, started the RBBR biooxidation. These results confirmed that SGO acts as premediator, being SGA the true mediator of LMS. The experimental dependences observed during the steady state and post-steady state, confirmed that the enzymatic reaction is the slowest reaction step. Therefore, the enzymatic reaction acts as the rate-determining step, in the biodegradation of RBBR.

A reaction mechanism is proposed beside the pH results. This mechanism involves enzymatic and nonenzymatic reactions, in which a premediator (PM), mediator (M) and the mediator radical (MR) are considered (Section 6.4).  $V_{ss}$  values were determined from enzyme, mediator and RBBR effects. The experimental data obtained confirmed the reliability of the reaction mechanism proposed. Thus, the assay conditions for biodegradation of RBBR, with the enzyme-mediator systems, were optimized, reaching 24  $\mu$ M RBBR biodegradation in 10 min. being the more effective mediator, ASG.

#### 6.1. ENSAYOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

El uso de sistemas enzima-mediador ha demostrado ser eficaz en la biodegradación de Remazol Brilliant Blue Royal (RBBR) con lacasas y diversos mediadores, tal y como se observa en la Tabla 1.3.2.B. Sin embargo, en la bibliografía no se ha estudiado la biodegradación de RBBR con peroxidasas, ni con lacasa de *Trameters versicolor* (TvL), en presencia de los mediadores naturales mencionados en el capítulo anterior (MSG, ASG, SGO y SGA). Ante estos mediadores, no mejoró significativamente la biodegradación de RBBR con peroxidasas (Capítulo 4), mientras que sí se han observado mejoras respecto a TvL sin mediadores (datos no mostrados). Por ello, en este capítulo se estudiará la biodegradación de RBBR con TvL en presencia de estos mediadores naturales.

Inicialmente, se realizaron ensayos espectrofotométricos de la oxidación por O<sub>2</sub> de RBBR, catalizada por TvL ante los mediadores naturales investigados (Figuras 6.1A-D). Estos resultados preliminares proporcionaron información sobre la viabilidad de la biodegradación enzimática del colorante, y sobre las longitudes de onda más adecuadas para el estudio del proceso. Para ello, se registraron en un espectrofotómetro UV-visible de doble haz, espectros iterativos durante 15 min. en un amplio intervalo de longitudes de onda (250-700 nm). Los mediadores mostraron una significativa absorción de luz, en longitudes de onda inferiores a 350 nm, de manera similar a la observada en otras condiciones de reacción (Capítulo 5), por lo que no interfirieron con la detección instrumental de la desaparición del colorante, próxima a 600 nm. El colorante RBBR mostró un máximo de absorbancia a 595 nm, que se degradó rápidamente, de manera simultánea con la formación de un producto intermedio amarillento, que absorbía a 325 nm y 450 nm, el cual también evolucionó hacia productos finales incoloros en tiempos más prolongados de reacción. El uso de mediadores y lacasa, cuproenzima que utiliza como oxidante oxígeno molecular, es una alternativa interesante respecto a peroxidasas, puesto que evita la necesidad de utilizar peróxido de hidrógeno, cuyo exceso es conveniente eliminar para no liberar vertidos oxidantes hacia el medio ambiente.





Espectros de absorbancia de las reacciones para la biodegradación enzimática de 24  $\mu$ M de RBBR catalizada por 63 nM TvL y 5  $\mu$ M de mediador, en tampón acetato sódico pH 10 mM pH 5.5 a 25°C, cada 1 min. durante 15 min. de reacción. (A) MSG. (B) ASG. (C) SGO. (D) SGA.

#### 6.2 ENSAYOS CROMATOGRÁFICOS

La biodegradación de RBBR catalizada por TvL con los mediadores naturales MSG, ASG, SGO y SGA, también se estudiaron en un cromatógrafo UHPLC-DAD, retirando alícuotas del medio de ensayo, en distintos tiempos de reacción. Las reacciones se realizaron en un reactor tanque agitado de plástico, que disminuyó la inmovilización de lacasa sobre las paredes del recipiente, evitando la inactivación enzimática. En las reacciones con TvL el reactor se mantuvo abierto al aire, y la agitación continua incorporó continuamente oxígeno, saturando a la enzima con este sustrato oxidante.

A continuación se muestran algunos de los cromatogramas tridimensionales obtenidos, concretamente los que corresponden a la inyección de muestras alícuotas, retiradas a tiempo cero (Figura 6.2A-D) y a los cinco minutos de reacción (Figura 6.3A-D). Los mediadores mostraron intensas absorbancias a 210 nm, así como unos tiempos de retención ( $t_R$ ) característicos, contrastados con los obtenidos utilizando patrones comerciales: MSG a  $t_R$  =1.5 min, SGO a  $t_R$  =1.5 min, SGA a  $t_R$  = 1.6 min y ASG a  $t_R$  = 2.5 min. Se detectó el colorante RBBR a  $t_R$  = 2.0 min, cuya absorbancia a 595 nm fue disminuyendo gradualmente. Se observó un producto intermedio amarillento a  $t_R$  = 1.0 min durante los primeros minutos de reacción, que se transformó posteriormente en productos incoloros.

La realización de espectros tridimensionales en diversos tiempos de la reacción de oxidación enzimática de RBBR con TvL y mediadores, hizo posible apreciar que los mediadores mostraron un ligero descenso inicial, seguido de un mantenimiento durante la biodegradación del colorante. Tras el agotamiento de RBBR, se comprobó que la enzima oxidó los mediadores hacia productos incoloros. Este comportamiento confirmó que TvL catalizó inicialmente la oxidación del mediador hacia un mediadorradical, el cual oxidó RBBR hacia un radical libre del colorante (RBBRR), regenerando el mediador de partida. Una vez agotado el colorante, no fue posible la regeneración del mediador, y su radical evolucionó hacia productos de descomposición.

En el caso de SGO, se observó su rápida desaparición inicial, y simultáneamente la formación de SGA, ambos con sus  $t_R$  y espectros UV-visible característicos. Después SGA mostró un ligero descenso, seguido de un nivel constante durante la desaparición de RBBR, tras la cual también se apreció la destrucción de SGA. Por tanto, se concluyó que SGO actuó como premediador generando SGA, el cual participó en la reacción de oxidación de RBBR como auténtico mediador (Figuras 6.2C y 6.3C).





Cromatogramas tridimensionales en HPLC y espectros de absorbancia de las reacciones a tiempo cero de reacción, para la biodegradación enzimática de 24  $\mu$ M de RBBR catalizada por 63 nM TvL y 5  $\mu$ M de mediador en tampón acetato sódico 10 mM pH 5.5 a 25°C. (A) MSG. (B) ASG. (C) SGO. (D) SGA.



#### **FIGURA 6.3**

Cromatogramas tridimensionales en HPLC y espectros de absorbancia tras cinco minutos de reacción, para la biodegradación enzimática de 24  $\mu$ M de RBBR catalizada por 63 nM TvL y 5  $\mu$ M de mediador en tampón acetato sódico 10 mM pH 5.5 a 25°C. (A) MSG. (B) ASG. (C) SGO. (D) SGA.

A continuación, se realizaron los ensayos cinéticos de biodegradación enzimática de RBBR catalizada por el sistema TvL-mediador. Se estudió la influencia del pH y de las concentraciones iniciales de enzima, sustrato y mediador manteniendo constantes el resto de las condiciones experimentales. De este modo, se investigaron los efectos de la variación de estos factores experimentales, sobre varios parámetros cinéticos, obtenidos a partir de registros temporales de la disminución de absorbancia a 595 nm, longitud de onda de máxima absorción de luz del colorante RBBR. A partir de la zona inicial de cada registro se calculó la velocidad de estado estacionario  $V_{ss}$ , mediante regresión lineal. El conjunto del registro fue ajustado mediante regresión no lineal a una ecuación uniexponencial decreciente, determinando la amplitud del colorante degradado [RBBR]<sub>o</sub>, y la rapidez del proceso, descrita por la constante aparente de biodegradación  $\gamma$ .

#### 6.3 INFLUENCIA DEL PH

Los experimentos sobre la influencia del pH analizaron el intervalo óptimo para la biodegradación de RBBR por TvL con los mediadores investigados. Para ello se estudió el efecto de los valores de pH 3.5-5.5 con el tampón acetato sódico 10 mM, y los valores de pH 6.0-8.5 con el tampón fosfato sódico 10 mM, cada 0.5 unidades de pH, sobre la biodegradación de 24  $\mu$ M de RBBR por 63 nM de TvL y 2.5  $\mu$ M de mediador. No se utilizaron tampones citrato debido a que este trianión puede inhibir a TvL, al complejar los cationes cobre del sitio activo de la enzima. Los ensayos se realizaron registrando durante 30 min la disminución de absorbancia a 595 nm (Figuras 6.4A-D).

La porción inicial de cada registro temporal ha sido analizada mediante regresión lineal, obteniendo la correspondiente velocidad inicial, que equivale a la velocidad de estado estacionario de la reacción enzimática,  $V_{ss}$  (Figura 6.4E). En esta figura se observó que todos los sistemas TvL-mediador tuvieron un intervalo de pH óptimo similar, entre pH 5.0 y 6.0, por lo que se eligió el valor de pH 5.5 como óptimo para los posteriores estudios experimentales.

En cuanto a los valores absolutos de  $V_{ss}$ , los valores obtenidos también bastante similares (Figura 6.4E). En concreto fueron 50, 60, 55 y 45 nM/s para MSG, ASG, SGO y SGA, respectivamente. Por tanto, en principio el sistema TvL-ASG parece el más rápido en la biodegradación de RBBR, entre los cuatro sistemas TvL-mediador natural investigados.



Efecto del pH sobre la biodegradación enzimática de 24  $\mu$ M RBBR catalizada por 63 nM TvL con 2.5  $\mu$ M de mediador. Registros de absorbancia (595 nm) frente al tiempo para MSG (A), ASG (B), SGO (C) y SGA (D) , durante 30 min. de reacción, (E) V<sub>ss</sub> frente al pH para la reacción con los cuatro mediadores, en tampón acetato sódico 10 mM pH 3.5-5.5, y tampón fosfato sódico 10 mM pH 6.0-8.5, a 25 °C.

#### 6.4 ANÁLISIS CINÉTICO

Considerando los experimentos preliminares espectrofotométricos y cromatográficos, además de los resultados del efecto del pH, sobre la biodegradación enzimática de RBBR catalizada por TvL-mediadores, se propone un mecanismo de reacción compuesto por las etapas determinantes del comportamiento cinético global de la biodegradación. El mecanismo comprende reacciones enzimáticas y no enzimáticas, en las que puede intervenir un premediador (PM), el mediador (M) y el radical del mediador (MR), así como el radical del colorante (RBBRR) y el producto intermedio 2-2´-disulfonil azobenceno (DSAB):

$$PM \xrightarrow{k_E^{PM}[E]_0} M \tag{6.1}$$

$$M \xrightarrow{k_E^M[E]_0} MR \tag{6.2}$$

$$MR + RBBR \xrightarrow{k_{RBBR}^{M}} M + RBBRR \tag{6.3}$$

$$RBBRR \to DSAB \to Productos \tag{6.4}$$

La optimización de las primeras reacciones (6.1 a 6.3) permite incrementar la eficacia de toda la biodegradación de RBBR. Las etapas enzimáticas catalizadas por TvL (6.1) y (6.2), son reacciones que utilizan  $O_2$  como oxidante, cuyas velocidades dependen de ambos sustratos:

$$V_{E}^{PM} = \frac{k_{cat}^{PM} [E]_{0} [PM]_{0} [O_{2}]_{0}}{K_{m}^{PM} [O_{2}]_{0} + K_{m}^{O_{2}} [PM]_{0} + [PM]_{0} [O_{2}]_{0}}$$
(6.5)

$$V_{E}^{M} = \frac{k_{cat}^{M} [E]_{0} [M]_{0} [O_{2}]_{0}}{K_{m}^{M} [O_{2}]_{0} + K_{m}^{O_{2}} [M]_{0} + [M]_{0} [O_{2}]_{0}}$$
(6.6)

En estas reacciones de oxidación catalizadas por TvL, se utiliza agitación continua y abierta al aire, permitiendo la saturación de la enzima con O<sub>2</sub>, y la simplificación hacia expresiones de velocidad independientes de la concentración inicial de oxígeno:

$$V_{E}^{PM} = \frac{k_{cat}^{PM} \left[E\right]_{0} \left[PM\right]_{0}}{K_{m}^{PM} + \left[PM\right]_{0}} \simeq \frac{k_{cat}^{PM} \left[E\right]_{0} \left[PM\right]_{0}}{K_{m}^{PM}} = k_{E}^{PM} \left[E\right]_{0} \left[PM\right]_{0}, \quad \left[PM\right]_{0} \ll K_{m}^{PM} \quad (6.7)$$

$$V_{E}^{M} = \frac{k_{cat}^{M} [E]_{0} [M]_{0}}{K_{m}^{M} + [M]_{0}} \simeq \frac{k_{cat}^{M} [E]_{0} [M]_{0}}{K_{m}^{M}} = k_{E}^{M} [E]_{0} [M]_{0}, \quad [M]_{0} \ll K_{m}^{M}$$
(6.8)

Además, utilizando bajas concentraciones de mediadores, las velocidades de las reacciones enzimáticas muestran una dependencia lineal, respecto a las concentraciones iniciales de enzima y de mediador (Ecuaciones 6.7 y 6.8). Por ello, las constantes cinéticas de las reacciones 6.1, 6.2 y 6.3 tienen dimensiones cinéticas de primer orden. El comportamiento cinético de este mecanismo de reacción, se

desarrolla en varias fases de tiempo.

#### Fase inicial: Reacción 6.1

La enzima cataliza la rápida conversión de PM en M. Así, las ecuaciones diferenciales del proceso:

$$d[PM]/dt = -k_E^{PM}[E]_0[PM], [PM] = [PM]_0 t = 0$$
 (6.9)

$$d[M]/dt = k_E^{PM}[E]_0[PM], \ [M] = 0 \ t = 0$$
(6.10)

resueltas mediante la transformada de Laplace, conducen a expresiones uniexponenciales, decreciente para el premediador y creciente para el mediador:

$$[PM] = [PM]_0 e^{-\theta t} = [PM]_0 e^{-k_E^{PM}[E]_0 t}$$
(6.11)

$$[M] = [M]_{f} (1 - e^{-\theta t}) = [PM]_{0} (1 - e^{-k_{E}^{PM}[E]_{0}t})$$
(6.12)

#### Fase estacionaria: Reacciones 6.2 y 6.3

Las reacciones evolucionan hacia un estado estacionario, según describe el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales (6.13 a 6.15), con sus respectivas condiciones iniciales (6.16 y 6.17):

$$d\left[M\right]/dt = -k_E^M\left[E\right]_0\left[M\right] + k_{RBBR}^M\left[RBBR\right]_0\left[MR\right]$$
(6.13)

$$d\left[MR\right]/dt = k_E^M \left[E\right]_0 \left[M\right] - k_{RBBR}^M \left[RBBR\right]_0 \left[MR\right]$$
(6.14)

$$d\left[RBBR\right]/dt = -k_{RBBR}^{M}\left[RBBR\right]_{0}\left[MR\right]$$
(6.15)

$$[M] = [M]_0, [MR] = 0, \quad t = 0$$
(6.16)

$$[RBBR] = [RBBR]_0, \quad t = 0 \tag{6.17}$$

En condiciones de estado estacionario:

$$d\left[M\right]/dt = d\left[MR\right]/dt = 0 \tag{6.18}$$

el anterior sistema de ecuaciones diferenciales se convierte en un sistema de ecuaciones algebraicas, que conduce a las siguientes expresiones:

$$\begin{bmatrix} M \end{bmatrix}_{ss} = \frac{k_{RBBR}^{M} \begin{bmatrix} RBBR \end{bmatrix}_{0} \begin{bmatrix} M \end{bmatrix}_{0}}{k_{E}^{M} \begin{bmatrix} E \end{bmatrix}_{0} + k_{RBBR}^{M} \begin{bmatrix} RBBR \end{bmatrix}_{0}}, \quad \begin{bmatrix} MR \end{bmatrix}_{ss} = \frac{k_{E}^{M} \begin{bmatrix} E \end{bmatrix}_{0} \begin{bmatrix} M \end{bmatrix}_{0}}{k_{E}^{M} \begin{bmatrix} E \end{bmatrix}_{0} + k_{RBBR}^{M} \begin{bmatrix} RBBR \end{bmatrix}_{0}} \quad (6.19)$$

$$\begin{bmatrix} RBBR \end{bmatrix}_{ss} = \begin{bmatrix} RBBR \end{bmatrix}_{0} - \frac{k_{E}^{M} k_{RBBR}^{M} \begin{bmatrix} E \end{bmatrix}_{0} \begin{bmatrix} RBBR \end{bmatrix}_{0} \begin{bmatrix} M \end{bmatrix}_{0}}{k_{E}^{M} \begin{bmatrix} E \end{bmatrix}_{0} + k_{RBBR}^{M} \begin{bmatrix} RBBR \end{bmatrix}_{0}} t$$
(6.20)

Si la reacción no enzimática 6.3 fuera más rápida que la reacción enzimática 6.2,

$$k_{RBBR}^{M} \left[ RBBR \right]_{0} \gg k_{E}^{M} \left[ E \right]_{0}$$
(6.21)

las anteriores ecuaciones se simplificarían:

$$[M]_{ss} \simeq [M]_0, \quad [MR]_{ss} \simeq \frac{k_E^M [E]_0 [M]_0}{k_{RBBR}^M [RBBR]_0} \to 0$$
(6.22)

$$\left[RBBR\right]_{ss} \simeq \left[RBBR\right]_{0} - k_{E}^{M} \left[E\right]_{0} \left[M\right]_{0} t = \left[RBBR\right]_{0} - V_{ss}t$$
(6.23)

#### Fase postestacionaria: Reacciones 6.2 y 6.3

La biodegradación de RBBR continuará durante esta fase, en la cual el mediador permanece en un estado estacionario restringido (Ecuación 6.22). Por ello, la única ecuación diferencial corresponde a RBBR:

$$d\left[RBBR\right]/dt = -k_{RBBR}^{M}\left[MR\right]_{ss}\left[RBBR\right]$$
(6.24)

aplicando la anterior condición inicial (Ecuación 6.17). La transformada de Laplace permite obtener las ecuaciones:

$$[RBBR] = [RBBR]_{ss} e^{-\gamma t}$$
(6.25)

$$\gamma = \frac{k_E^M k_{RBBR}^M [E]_0 [M]_0}{k_E^M [E]_0 + k_{RBBR}^M [RBBR]_{ss}}$$
(6.26)

Sin embargo, considerando la reacción enzimática 6.2 como etapa determinante de la velocidad (Ecuación 6.21), se alcanza una expresión simplificada de  $\gamma$ :

$$\gamma \simeq \frac{k_E^M \left[ E \right]_0 \left[ M \right]_0}{\left[ RBBR \right]_{ss}}$$
(6.27)

El periodo de semirreacción o vida media,  $t_{50}$ , es el tiempo necesario para la biodegradación del 50%, de la concentración inicial de RBBR en esta fase:

$$t_{50} = \frac{\ln 2}{\gamma} = \frac{\ln 2}{k_E^M [E]_0 [M]_0 / [RBBR]_{ss}}, \ [RBBR]_{50} = \frac{[RBBR]_{ss}}{2}$$
(6.28)

Además, utilizando el desarrollo en serie de la función exponencial, el término uniexponencial podría aproximarse por un término lineal, al comienzo de esta fase de la biodegradación del colorante:

$$[RBBR] \simeq [RBBR]_{ss} - [RBBR]_{ss} \gamma t = [RBBR]_{ss} - k_E^M [E]_0 [M]_0 t, \quad t \to 0$$
(6.29)

Este análisis cinético ha permitido elaborar un diseño experimental, que comprende diversos ensayos cinéticos sobre la biodegradación enzimática de RBBR, catalizada por los sistemas lacasa-mediador investigados. Se estudiaron los efectos de las concentraciones iniciales de enzima, mediador y RBBR, manteniendo constantes el resto de las condiciones experimentales.

#### 6.5 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE ENZIMA

A continuación se efectuaron ensayos cinéticos de biodegradación de RBBR, ante diferentes concentraciones iniciales de la enzima TvL, en presencia de los mediadores MSG, ASG, SGO y SGA (Figuras 6.5A-D). Se registró la disminución de RBBR, utilizando la misma concentración inicial de los mediadores, así como un intervalo de concentración inicial de TvL común para MSG (Figura 6.5A), SGO (Figura 6.5C) y SGA (Figura 6.5D). En el caso de ASG (Figura 6.5B), se aplicaron menores valores de concentración inicial de TvL, debido a la mayor rapidez de la reacción en presencia de este mediador.

Las porciones iniciales lineales de los registros de descomposición de RBBR (Figuras 6.5A-D), fueron ajustadas mediante regresión lineal, proporcionando los correspondientes valores de velocidad de estado estacionario, los cuales mostraron dependencias lineales frente a la concentración inicial de enzima (Figura 6.5E), de acuerdo con la respectiva expresión de la fase de estado estacionario (Ecuación 6.23).

Los conjuntos de datos de los registros temporales de la biodegradación de RBBR (Figuras 6.5A-D), fueron ajustados mediante regresión no lineal, a una ecuación uniexponencial decreciente (Ecuación 6.25). Las amplitudes de la biodegradación de RBBR (Figura 6.5F), equivalentes a la concentración inicial de RBBR, no variaron con la concentración inicial de enzima, de acuerdo con la correspondientes expresión de la fase postestacionaria (Ecuación 6.25). Además, los valores de la constante de velocidad global de la biodegradación de RBBR,  $\gamma$ , indicativa de la rapidez del proceso de oxidación de RBBR, aumentaron linealmente con la concentración inicial de enzima (Figura 6.5F), conforme a la ecuación (6.27) de la fase postestacionaria.

Las dependencias experimentales observadas respecto a la concentración inicial de enzima, tanto en la fase de estado estacionario (Ecuación 6.23), como en la fase postestacionaria (Ecuación 6.27), confirman que la reacción enzimática 6.2 es más lenta que la reacción no enzimática 6.3 (Ecuación 6.21). Por lo tanto, la reacción enzimática 6.2 actúa como etapa determinante de la velocidad, del proceso de biodegradación global de RBBR (Reacciones 6.1 a 6.4).

Considerando los mismos valores de [TvL]<sub>0</sub>, el mediador ASG proporcionó la mayor rapidez en la biodegradación de RBBR. Los valores de [TvL]<sub>0</sub> utilizados, disminuyeron el periodo de retardo inicialmente observado en los registros ante SGO, situándolo dentro del tiempo muerto de medida (Figura 6.5C), de acuerdo con el análisis cinético de la fase inicial (Ecuaciones 6.11 y 6.12).



#### **FIGURA 6.5**

Efecto de la concentración de enzima para la degradación de 24  $\mu$ M RBBR con 2.5  $\mu$ M de mediador, en tampón acetato sódico 10 mM pH 5.5 a 25°C, durante 30 min. Absorbancia a 595 nm. vs. tiempo: (A) TvL 30-360 nM, MSG; (B) TvL 15-180 nM, ASG; (C) TvL 30-360 nM, SGO; (D) TvL 30-360 nM, SGA. (E) V<sub>ss</sub> vs. [TvL]<sub>0</sub> para los cuatro mediadores. (F) Amplitud y  $\gamma$  vs. [TvL]<sub>0</sub> para los cuatro mediadores.

# 6.6 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE MEDIADORES.

Después se estudió el efecto sobre la biodegradación de RBBR catalizada por TvL, de distintas concentraciones iniciales de los mediadores MSG, ASG, SGO y SGA (Figuras 6.6A-D). Se detectó la descomposición del colorante RBBR, frente a un intervalo común de concentración inicial de los mediadores investigados, en presencia de la misma concentración inicial de enzima para MSG (Figura 6.6A), SGO (Figura 6.6C) y SGA (Figura 6.6D), y una concentración inferior de TvL ante ASG (Figura 6.6B), debido a la mayor rapidez de esta reacción.

En los registros temporales de RBBR (Figuras 6.6A-D), se ajustaron sus intervalos iniciales mediante regresión lineal, obteniendo sus valores de velocidad de estado estacionario, los cuales aumentaron linealmente con la concentración inicial de mediador (Figura 6.6E), de acuerdo con la correspondiente expresión de la fase de estado estacionario (Ecuación 6.23).

Los conjuntos de datos de los registros temporales de RBBR (Figuras 6.6A-D), fueron ajustados mediante regresión no lineal, a una ecuación uniexponencial decreciente (Ecuación 6.25). Las amplitudes de la desaparición de RBBR (Figura 6.6F), equivalentes a la concentración inicial de RBBR, no variaron con la concentración inicial de mediador, según la respectiva expresión de la fase postestacionaria (Ecuación 6.25). Además, los valores de la constante de velocidad global de la biodegradación de RBBR,  $\gamma$ , representativa de la rapidez de la oxidación de RBBR, crecieron linealmente con la concentración inicial de mediador (Figura 6.6F), cumpliendo la ecuación (6.27) de la fase postestacionaria.

Los comportamientos experimentales obtenidos respecto a la concentración inicial de mediador, en la fase de estado estacionario (Ecuaciones 6.23), y en la fase postestacionaria (Ecuaciones 6.25 y 6.27), concuerdan con el carácter determinante de la velocidad de la reacción enzimática 6.2 (Ecuación 6.21), en el proceso global de la biodegradación de RBBR (Reacciones 6.1 a 6.4), catalizado por TvL en presencia de los mediadores naturales investigados.

El mediador ASG proporcionó la mayor rapidez en la biodegradación de RBBR, y se disminuyó la [TvL]<sub>0</sub> para obtener registros en el mismo intervalo de tiempo (Figura 6.6B). Los valores de [TvL]<sub>0</sub> utilizados, situaron el periodo de retardo dentro del tiempo muerto de medida ante SGO (Figura 6.6C), el cual no varió con la concentración de mediador (datos no mostrados), según el análisis cinético de la fase inicial (Ecuaciones 6.11 y 6.12).



#### **FIGURA 6.6**

Efecto de la concentración de mediador (0.5-6  $\mu$ M) sobre la biodegradación enzimática de 24  $\mu$ M de RBBR en tampón acetato sódico 10 mM pH 5.5 a 25 °C. Absorbancia a 595 nm. vs. tiempo: (A) TvL 60 nM, MSG; (B) TvL 20 nM, ASG; (C) TvL 60 nM, SGO; (D) TvL 60 nM, SGA. (E) V<sub>ss</sub> vs. [M]<sub>0</sub> para los cuatro mediadores. (F) Amplitud y  $\gamma$  vs. [M]<sub>0</sub> para los cuatro mediadores.

#### 6.7 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE RBBR

Finalmente, se analizó el efecto de la concentración inicial de RBBR sobre su propia destrucción, catalizada por TvL, en presencia de los mediadores MSG, ASG, SGO y SGA (Figura 6.7A-D). Se registró la biodegradación de distintas concentraciones iniciales del colorante RBBR, ante una misma concentración de mediador y de enzima para MSG (Figura 6.7A), ASG (Figura 6.7B) y SGO (Figura 6.7C), y una mayor concentración de TvL con SGA (Figura 6.7D), comprobando el aumento en la rapidez de esta reacción.

Los registros temporales de RBBR (Figuras 6.7A-D), mostraron comportamientos uniexponenciales. Sin embargo, fue posible ajustar sus datos iniciales mediante regresión lineal, obteniendo sus valores de velocidad de estado estacionario. Estos valores de  $V_{ss}$  fueron independientes de la concentración inicial de RBBR (Figura 6.7E), según la respectiva expresión de la fase de estado estacionario (Ecuación 6.23).

Los registros temporales de RBBR (Figuras 6.7A-D) fueron ajustados mediante regresión no lineal, a una ecuación uniexponencial decreciente (Ecuación 6.25). Las amplitudes de la biodegradación de RBBR (Figura 6.7F), confirmaron su equivalencia a la concentración inicial de colorante, puesto que aumentaron linealmente con la concentración inicial de RBBR, cumpliendo con la correspondiente expresión de la fase postestacionaria (Ecuación 6.25). En cuanto a los valores de la constante de velocidad global de la biodegradación de RBBR,  $\gamma$ , descriptiva de la rapidez de la oxidación de RBBR, se ajustaron por regresión no lineal a una ecuación inversa de la concentración inicial de RBBR (Figura 6.7F), de acuerdo con la ecuación (6.27) de la fase postestacionaria.

Las dependencias experimentales observadas acerca de la concentración inicial de RBBR, en la fase de estado estacionario (Ecuación 6.23) y en la fase postestacionaria (Ecuaciones 6.25 y 6.27), apoyan que la reacción enzimática 6.2 se comporta como determinante de la velocidad, en el proceso global de biodegradación de RBBR (Ecuaciones 6.1 a 6.4).

La mayor rapidez en la biodegradación de RBBR, se obtuvo en presencia del mediador ASG (Figura 6.7B), siendo necesario aumentar [TvL]<sub>0</sub> para obtener registros en el mismo intervalo de tiempo con SGA (Figura 6.7D). Los valores de [TvL]<sub>0</sub> utilizados, disminuyeron el periodo de retardo dentro del tiempo muerto de medida para SGO (Figura 6.7C), el cual no cambió al variar [RBBR]<sub>0</sub> (datos no mostrados), cumpliendo la previsión del análisis cinético de la fase inicial (Ecuaciones 6.11 y 6.12).



Efecto de la concentración inicial de RBBR en el rango de 2-24  $\mu$ M para su biodegradación con 2.5  $\mu$ M de mediador, en tampón acetato sódico 10 mM pH 5.5 a 25 °C. Registros de absorbancia a 595 nm frente al tiempo: (A) TvL 60 nM, MSG; (B) TvL 60 nM, ASG; (C) TvL 60 nM, SGO; (D) TvL 90 nM, SGA. (E) V<sub>ss</sub> vs. [RBBR]<sub>0</sub> para los cuatro mediadores. (F) Amplitud y  $\gamma$  vs. [RBBR]<sub>0</sub> para los cuatro mediadores.

En consecuencia, los resultados de los estudios experimentales realizados, apoyan la validez del análisis cinético desarrollado (Ecuaciones 6.5 a 6.29), para el mecanismo de reacción propuesto (Reacciones 6.1 a 6.4). El análisis cinético ha permitido optimizar las condiciones de ensayo, para conseguir la biodegradación enzimática de RBBR 24  $\mu$ M en unos 10 minutos, en presencia de TvL con mediadores naturales, siendo más eficaz ASG. Estos resultados superan ampliamente los estudios de otros autores, sobre biodegradación de colorantes con lacasas, en procesos que duran horas e incluso días.

## 7

# Bioanálisis enzimático de fenoles

### 7. BIOANÁLISIS ENZIMÁTICO DE FENOLES

#### 7.0. ENZYMATIC BIOANALYSIS OF PHENOLS: SUMMARY

The determination of very small concentrations of many bioactive phenols (Section 1.4), may be useful for their biotechnological applications. Thus, a number of analytical methods with different sensitivity, complexity, quickness and cost have been proposed (Section 1.4). The aim of this chapter is the possible determination of phenols of biotechnological interest, in nanomolar concentrations, by using an enzymatic and spectrophotometric method of bioanalysis, easy, quick and with low cost. An initial enzymatic reaction catalyzed by horseradish peroxidase (HRP), will be applied for the oxidation of a phenol to its radical. Ascorbic acid (AA) will be added to the assay medium, for reducing the phenolic radical to the original phenol, with the corresponding consumption of AA, as coupling reductant and detectable species.

The experimental results confirm the possible use of two kinetic parameters, for the determination of the concentration of phenols. It has been chosen  $V_{ss}$  for its quick measurement, especially at low phenol concentrations. This enzymatic method has shown a good linearity of  $V_{ss}$  from 10 to 300 nM phenols, for several phenolic pollutants (Figures 7.5A and B), drugs (Figure 7.5C) and phytochemicals (Figure 7.5D). The method can be useful for detection of small quantities of phenolic pollutants in chemical industries, increasing the release of clean effluents. Furthermore, the method can also be appropriate for determination of small concentrations of phenolic drugs and phytochemicals, in pharma industries, as well as in manufacturing industries of nutraceuticals and cosmeceuticals.

In conclusion, the experimental results (Figures 7.2, 7.3 and 7.4) support the reliability of the kinetic analysis developed (Equations 7.5 to 7.23), for the proposed reaction mechanism (Reactions 7.1 to 7.4). The kinetic analysis has led to optimization of reaction conditions, for the determination of nanomolar concentrations of phenolic pollutants, drugs and phytochemicals, by using an enzymatic and spectrophotometric method of bioanalysis (Figure 7.5). These results overcome the studies of other authors (Section 1.4), on the determination of phenols with biotechnological interest. These authors have used other procedures less sensitive, or well chromatographic, spectrofluorometric and electrochemical techniques, which are more cumbersome, more expensive or less reliable.

#### 7.1. ENSAYOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Existen numerosos fenoles bioactivos (Sección 1.4) en cuyas aplicaciones biotecnológicas puede resultar conveniente determinar muy bajas concentraciones de los mismos. Con tal fin, se han propuesto múltiples métodos analíticos con distinto grado de sensibilidad, complejidad, rapidez y coste (Sección 1.4). El propósito de este capítulo es la posible determinación de fenoles de interés biotecnológico, en concentraciones del orden nanomolar, mediante un método de bioanálisis enzimático espectrofotométrico, simple, rápido y con bajo coste. Para ello, se investigará la posible utilidad de una reacción enzimática inicial que oxide un fenol a su radical, catalizada por peroxidasa de rábano picante (HRP). La incorporación en el medio de ensayo de ácido ascórbico o vitamina C (AA), podría reducir el radical fenólico al fenol

Inicialmente, se realizaron ensayos espectrofotométricos de la oxidación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalizada por HRP, de dos fenoles modelo, bisfenol-A (BPA, Figura 7.1A) y 4tercbutilcatecol (TBC, Figura 7.1B). Estos resultados preliminares proporcionaron información sobre la viabilidad de la oxidación enzimática del fenol considerado, y de su posible regeneración por el AA presente en el medio de ensayo. Para ello, se registraron en un espectrofotómetro UV-visible de doble haz, las disminuciones de absorbancia a 265 nm, bajo distintas condiciones experimentales de oxidación de BPA (Figura 7.1A) y de TBC (Figura 7.1B). En ambos casos, se registraron también las correspondientes reacciones no enzimáticas, en ausencia de HRP, que resultaron ser despreciables durante el tiempo de ensayo, tanto para BPA (Figura 7.1A, registro *e*) como para TBC (Figura 7.1B, registro *e*).

En los experimentos con ambos fenoles modelo, se pueden considerar los respectivos registros (*b*) como ensayos de referencia (Figuras 7.1A y B), y contrastar con ellos los comportamientos aparentes de otras condiciones de reacción. El descenso en la concentración inicial de enzima aplicado en los registros (*a*), mantuvo invariable la amplitud de la absorbancia, y disminuyó la rapidez global de la reacción, así como la velocidad inicial de la misma (Figuras 7.1A y B). El aumento de la concentración inicial de AA utilizado en los registros (*c*), provocó el aumento de la amplitud de la absorbancia, y el descenso en la rapidez global de la reacción, manteniendo prácticamente constante la velocidad inicial de ésta (Figuras 7.1A y B). La disminución de la concentración inicial del fenol investigado en los registros (*d*), también conservó la amplitud de la absorbancia, mientras que descendió la rapidez global y la velocidad inicial de la reacción.



#### FIGURA 7.1

Registros cinéticos de la oxidación de fenoles, catalizada por HRP con  $H_2O_2$  100  $\mu$ M, en tampón fosfato sódico 100 mM pH 6.5 a 25°C. (A) BPA: (a) HRP 64 nM, AA 3  $\mu$ M y BPA 300 nM; (b) HRP 240 nM, AA 3  $\mu$ M y BPA 300 nM; (c) HRP 240 nM, AA 4  $\mu$ M y BPA 300 nM; (d) HRP 240 nM, AA 3  $\mu$ M y BPA 60 nM; (e) AA 3  $\mu$ M y BPA 300 nM. (B) TBC: (a) HRP 48 nM, AA 2.6  $\mu$ M y TBC 300 nM; (b) HRP 240 nM, AA 2.6  $\mu$ M y TBC 300 nM; (c) HRP 240 nM, AA 2.6  $\mu$ M y TBC 300 nM; (c) HRP 240 nM, AA 2.6  $\mu$ M y TBC 300 nM; (c) HRP 240 nM, AA 2.6  $\mu$ M y TBC 300 nM; (d) HRP 240 nM, AA 2.6  $\mu$ M y TBC 300 nM; (d) HRP 240 nM, AA 2.6  $\mu$ M y TBC 300 nM; (d) HRP 240 nM, AA 2.6  $\mu$ M y TBC 300 nM; (d) HRP 240 nM, AA 2.6  $\mu$ M y TBC 300 nM; (d) HRP 240 nM, AA 2.6  $\mu$ M y TBC 300 nM; (d) HRP 240 nM, AA 2.6  $\mu$ M y TBC 300 nM; (d) HRP 240 nM, AA 2.6  $\mu$ M y TBC 300 nM; (d) HRP 240 nM, AA 2.6  $\mu$ M y TBC 300 nM; (d) HRP 240 nM, AA 2.6  $\mu$ M y TBC 300 nM; (d) HRP 240 nM, AA 2.6  $\mu$ M y TBC 300 nM; (d) HRP 240 nM, AA 2.6  $\mu$ M y TBC 300 nM; (d) HRP 240 nM, AA 2.6  $\mu$ M y TBC 300 nM; (e) AA 2.6  $\mu$ M y TBC 300 nM.

Estos resultados experimentales han llevado a proponer un mecanismo de reacción, y su análisis cinético (Sección 7.2), cuya validez será comprobada en posteriores estudios experimentales, que abarcarán investigaciones sobre los efectos de las concentraciones, de los principales reactivos participantes en el proceso oxidativo. En concreto, los efectos de las concentraciones iniciales de la enzima HRP (Sección 7.3), reductor acoplado AA (Sección 7.4) y sustratos fenólicos modelo BPA y TBC (Sección 7.5).

### 7.2 ANÁLISIS CINÉTICO

Los resultados de los anteriores experimentos preliminares espectrofotométricos, sobre la oxidación enzimática de fenoles (Ph) catalizada por peroxidasa de rábano picante (HRP), en presencia de ácido ascórbico (AA) como reductor acoplado, conducen a proponer un mecanismo de reacción, constituido por las etapas determinantes del comportamiento cinético global del proceso. El mecanismo incluye una reacción enzimática inicial, y varias reacciones no enzimáticas acopladas, en las que puede intervenir un fenol (Ph) y su radical (PhR), así como el ácido ascórbico (AA), su radical (AAR), y su especie oxidada o ácido deshidroascórbico (DHA):

$$Ph \xrightarrow{k_E^{Ph}[E]_0} PhR \tag{7.1}$$

$$PhR + AA \xrightarrow{k_{AA}^{Ph}} Ph + AAR$$
(7.2)

$$2AAR \longrightarrow AA + DHA \tag{7.3}$$

 $PhR \rightarrow \rightarrow$  Productos (7.4)

La optimización de las primeras reacciones (7.1 a 7.2) permitirá detectar la desaparición de AA, durante la regeneración de muy bajas concentraciones de Ph. Una vez agotado el AA presente en el medio de ensayo, tendrá lugar la descomposición de PhR a través de varias reacciones (7.4). La reacción enzimática catalizada por HRP (7.1), utiliza  $H_2O_2$  como oxidante, y su velocidad depende de ambos sustratos:

$$V_{E}^{Ph} = \frac{k_{cat}^{Ph} [E]_{0} [Ph]_{0} [H_{2}O_{2}]_{0}}{K_{m}^{Ph} [H_{2}O_{2}]_{0} + K_{m}^{H_{2}O_{2}} [Ph]_{0} + [Ph]_{0} [H_{2}O_{2}]_{0}}$$
(7.5)

En esta reacción de oxidación catalizada por HRP, se utilizará una concentración saturante de  $H_2O_2$ , por lo cual la expresión de su velocidad se simplificará, volviéndose independiente de la concentración inicial de peróxido de hidrógeno:

**Tesis Doctoral** 

$$V_{E}^{PM} = \frac{k_{cat}^{Ph} [E]_{0} [Ph]_{0}}{K_{m}^{Ph} + [Ph]_{0}} \simeq \frac{k_{cat}^{Ph} [E]_{0} [Ph]_{0}}{K_{m}^{Ph}} = k_{E}^{Ph} [E]_{0} [Ph]_{0}, \quad [Ph]_{0} \ll K_{m}^{Ph}$$
(7.6)

Además, se analizarán muy bajas concentraciones de fenoles, por lo que la velocidad de la reacción enzimática mostrará una dependencia lineal, respecto a las concentraciones iniciales de enzima y de fenol (Ecuación 7.6). Así pues, las constantes cinéticas de las reacciones 7.1 y 7.2 tienen dimensiones cinéticas de primer orden. El comportamiento cinético de este mecanismo de reacción, se desenvuelve en varias fases de tiempo.

#### Fase estacionaria: Reacciones 7.1 y 7.2

Las reacciones evolucionan hacia un estado estacionario, según describe el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales (7.7 a 7.9), con sus respectivas condiciones iniciales (7.10 y 7.11):

$$d\left[Ph\right]/dt = -k_E^{Ph}\left[E\right]_0\left[Ph\right] + k_{AA}^{Ph}\left[AA\right]_0\left[PhR\right]$$
(7.7)

$$d\left[PhR\right]/dt = k_E^{Ph}\left[E\right]_0\left[Ph\right] - k_{AA}^{Ph}\left[AA\right]_0\left[PhR\right]$$
(7.8)

$$d\left[AA\right]/dt = -k_{AA}^{Ph}\left[AA\right]_{0}\left[PhR\right]$$
(7.9)

$$[Ph] = [Ph]_0, [PhR] = 0, t = 0$$
 (7.10)

$$[AA] = [AA]_{0}, \ t = 0$$
(7.11)

En condiciones de estado estacionario:

$$d\left[Ph\right]/dt = d\left[PhR\right]/dt = 0 \tag{7.12}$$

el anterior sistema de ecuaciones diferenciales se convierte en un sistema de ecuaciones algebraicas, que conduce a las siguientes expresiones:

$$[Ph]_{ss} = \frac{k_{AA}^{Ph} [AA]_{0} [Ph]_{0}}{k_{E}^{Ph} [E]_{0} + k_{AA}^{Ph} [AA]_{0}}, \quad [PhR]_{ss} = \frac{k_{E}^{Ph} [E]_{0} [Ph]_{0}}{k_{E}^{Ph} [E]_{0} + k_{AA}^{Ph} [AA]_{0}}$$
(7.13)

$$[AA]_{ss} = [AA]_{0} - \frac{k_{E}^{Ph}k_{AA}^{Ph}[E]_{0}[AA]_{0}[Ph]_{0}}{k_{E}^{Ph}[E]_{0} + k_{AA}^{Ph}[AA]_{0}}t$$
(7.14)

Si la reacción no enzimática 7.2 fuera más rápida que la reacción enzimática 7.1,

$$k_{AA}^{Ph} \left[ AA \right]_0 \gg k_E^{Ph} \left[ E \right]_0 \tag{7.15}$$

las anteriores ecuaciones se simplificarían:

$$[Ph]_{ss} \simeq [Ph]_0, \quad [PhR]_{ss} \simeq \frac{k_E^{Ph}[E]_0[Ph]_0}{k_{AA}^{Ph}[AA]_0} \to 0$$
(7.16)

$$[AA]_{ss} \simeq [AA]_0 - k_E^{Ph} [E]_0 [Ph]_0 t = [AA]_0 - V_{ss} t$$
(7.17)

#### Fase postestacionaria: Reacciones 7.1 y 7.2

La reducción acoplada con AA continuará durante esta fase, en la cual el fenol permanecerá en un estado estacionario restringido (Ecuación 7.13). Por ello, la única ecuación diferencial corresponde a AA:

$$d\left[AA\right]/dt = -k_{AA}^{Ph}\left[PhR\right]_{ss}\left[AA\right]$$
(7.18)

considerando la anterior condición inicial (Ecuación 7.11). La transformada de Laplace permite obtener las ecuaciones:

$$[AA] = [AA]_{ss} e^{-\gamma t}$$
(7.19)

$$\gamma = \frac{k_E^{Ph} k_{AA}^{Ph} [E]_0 [Ph]_0}{k_E^{Ph} [E]_0 + k_{AA}^{Ph} [AA]_{ss}}$$
(7.20)

Sin embargo, en caso de que la reacción enzimática 7.1 sea la etapa determinante de la velocidad (Ecuación 7.15), se alcanza una expresión simplificada de  $\gamma$ :

$$\gamma \simeq \frac{k_E^{Ph} \left[ E \right]_0 \left[ Ph \right]_0}{\left[ AA \right]_{ss}}$$
(7.21)

El periodo de semirreacción o vida media,  $t_{50}$ , es el tiempo necesario para el consumo del 50%, de la concentración inicial de AA en esta fase:

$$t_{50} = \frac{\ln 2}{\gamma} = \frac{\ln 2}{k_E^{Ph} [E]_0 [Ph]_0 / [AA]_{ss}}, \quad [AA]_{50} = \frac{[AA]_{ss}}{2}$$
(7.22)

Además, utilizando el desarrollo en serie de la función exponencial, el término uniexponencial podría aproximarse por un término lineal, al comienzo de esta fase del consumo del reductor acoplado:

$$[AA] \simeq [AA]_{ss} - [AA]_{ss} \gamma t = [AA]_{ss} - k_E^{Ph} [E]_0 [Ph]_0 t, \quad t \to 0$$
(7.23)

Este análisis cinético ha llevado a plantear un diseño experimental, que incluye diversos ensayos cinéticos sobre el bioanálisis enzimático de fenoles, catalizado por peroxidasa, en presencia de ácido ascórbico como reductor acoplado, y como biomolécula detectora en ensayos espectrofotométricos.

Se investigarán los efectos de las concentraciones iniciales de enzima HRP (Sección 7.3), ácido ascórbico AA (Sección 7.4) y el fenol a determinar (Sección 7.5), manteniendo constantes el resto de las condiciones experimentales. Tras comprobar la fiabilidad del método enzimático de bioanálisis, se aplicará a diversos fenoles con aplicaciones biotecnológicas (Sección 7.5).
# 7.3 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE ENZIMA

A continuación se efectuaron ensayos cinéticos de oxidación de dos fenoles modelo, representativos de distintos tipos de fenoles con interés biotecnológico, utilizando diferentes concentraciones iniciales de la enzima HRP, en presencia de AA como reductor acoplado y reactivo monitor del proceso bioanalítico. En concreto, bisfenol-A (BPA, Figuras 7.2A-C) y 4-tercbutilcatecol (TBC, Figuras 5.2D-F). Se registró la desaparición de AA, utilizando la misma concentración inicial de ambos fenoles investigados, así como un intervalo de concentración inicial de HRP similar para ambos sustratos.

Los datos iniciales lineales de los registros de oxidación de BPA (Figura 7.2A) y de TBC (Figura 7.2D), fueron ajustados mediante regresión lineal, obteniendo los respectivos valores de velocidad de estado estacionario, los cuales mostraron dependencias lineales frente a la concentración inicial de enzima, tanto para BPA (Figura 7.2B) como para TBC (Figura 7.2E), según la correspondiente expresión de la fase de estado estacionario (Ecuación 7.17).

Las series de datos de los registros temporales de la oxidación de BPA (Figuras 7.2A-C) y de TBC (Figuras 7.2D-F), fueron ajustados mediante regresión no lineal, a una ecuación uniexponencial decreciente (Ecuación 7.19). Las amplitudes del consumo de AA ante BPA (Figura 7.2B) y TBC (Figura 7.2E), equivalentes a la concentración inicial de AA, no variaron con la concentración inicial de enzima, de acuerdo con la correspondiente expresión de la fase postestacionaria (Ecuación 7.19). Por otra parte, los valores de la constante de velocidad global de la oxidación del fenol investigado, γ, indicativa de la rapidez del proceso, aumentaron linealmente con la concentración inicial de enzima, en presencia de BPA (Figura 7.2C) y de TBC (Figura 7.2F), mientras que sus inversos decrecieron de manera cóncava ante ambos sustratos fenólicos (Figuras 7.2C y F, respectivamente), de acuerdo con la ecuación (7.21) de la fase postestacionaria.

Las variaciones experimentales observadas respecto a la concentración inicial de enzima, en la fase de estado estacionario (Ecuación 7.17), y en la fase postestacionaria (Ecuación 7.21), apoyan que la reacción enzimática 7.1 es más lenta que la reacción no enzimática 7.2 (Ecuación 7.15). En consecuencia, la reacción enzimática 7.1 actúa como etapa determinante de la velocidad, del proceso de oxidación global de fenoles como BPA y TBC (Reacciones 7.1 a 7.4).



**FIGURA 7.2** 

Efecto de la concentración de enzima sobre la oxidación de fenoles, con  $H_2O_2$  100  $\mu$ M y AA 3  $\mu$ M, en tampón fosfato sódico 100 mM pH 6.5 a 25°C. (A-D) BPA 300 nM y HRP 8-240 nM. (D-F) TBC 300 nM y HRP 24-240 nM. (A, C) Absorbancia a 265 nm. vs. tiempo. (B, E) Amplitud y V<sub>ss</sub> vs. [HRP]<sub>0</sub>. (C, F)  $\gamma$  y 1/  $\gamma$  vs. [HRP]<sub>0</sub>.

# 7.4 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE ÁCIDO ASCÓRBICO

A continuación se investigó el efecto sobre la oxidación de BPA y TBC catalizada por HRP, de distintas concentraciones iniciales del reductor acoplado AA, registrando su desaparición frente al tiempo de reacción (Figuras 7.3A-F), y manteniendo constantes el resto de las variables experimentales aplicables a la reacción.

En los registros temporales de BPA (Figuras 7.3A-C) y de TBC (Figuras 7.3D-F), se ajustaron sus porciones iniciales mediante regresión lineal, proporcionando sus valores de velocidad de estado estacionario, que no variaron con la concentración inicial del reductor acoplado, ni en el caso de BPA (Figura 7.3B) ni en el de TBC (Figura 7.3E), de acuerdo con la respectiva expresión de la fase de estado estacionario (Ecuación 7.17).

Los conjuntos de datos de los registros temporales de BPA (Figuras 7.3A-C) y de TBC (Figuras 7.3D-F), fueron ajustados mediante regresión no lineal, a una ecuación uniexponencial decreciente (Ecuación 7.19). Las amplitudes de la desaparición de AA ante BPA (Figura 7.3B) y TBC (Figura 7.3E), equivalentes a la concentración inicial de AA, aumentaron linealmente con la concentración inicial de reductor acoplado, según la correspondiente expresión de la fase postestacionaria (Ecuación 7.19). Sin embargo, los valores de la constante de velocidad global de la oxidación, $\gamma$ , descriptiva de la rapidez de la oxidación de los fenoles, disminuyeron de manera cóncava con la concentración inicial de AA, en presencia de BPA (Figura 7.3C) y de TBC (Figura 7.3F), puesto que es necesario consumir mayores concentraciones de reductor acoplado, y se ajustaron por regresión no lineal a una ecuación inversa de la concentración inicial de AA. Además, en la oxidación de ambos sustratos fenólicos, sus inversos aumentaron linealmente con la concentración inicial de AA (Figuras 7.3C y F, respectivamente), cumpliendo la ecuación (7.21) de la fase postestacionaria.

Los comportamientos experimentales obtenidos respecto a la concentración inicial de AA, tanto en la fase de estado estacionario (Ecuaciones 7.17), como en la fase postestacionaria (Ecuación 7.21), confirman el carácter determinante de la velocidad de la reacción enzimática 7.1 (Ecuación 7.15), en el proceso global de la oxidación de fenoles como BPA y TBC (Reacciones 7.1 a 7.4), catalizado por HRP en presencia de ácido ascórbico.





Efecto de la concentración inicial de AA 1-30  $\mu$ M sobre la oxidación de fenoles, con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100  $\mu$ M, en tampón fosfato sódico 100 mM pH 6.5 a 25°C. (A-C) BPA 300 nM y HRP 240 nM. (D-F) TBC 300 nM y HRP 240 nM. (A, D) Absorbancia a 265 nm. vs. tiempo. (B, E) Amplitud y V<sub>ss</sub> vs. [HRP]<sub>0</sub>. (C, F)  $\gamma$  y 1/ $\gamma$  vs. [HRP]<sub>0</sub>.

# 7.5 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE FENOL

Finalmente, se analizó el efecto de la concentración inicial de los fenoles a determinar, sobre su propia destrucción catalizada por HRP, en presencia de AA (Figuras 7.4A-F). Se registró la desaparición de una concentración inicial del reductor acoplado AA, manteniendo constante la concentración inicial de enzima, y ante varias concentraciones iniciales de los fenoles modelo BPA y TBC.

Los registros temporales de la descomposición de AA, en presencia de BPA (Figura 7.4A) y de TBC (Figura 7.4D), mostraron comportamientos uniexponenciales. Sin embargo, fue posible ajustar sus zonas iniciales mediante regresión lineal, determinando sus valores de velocidad de estado estacionario. Estos valores de V<sub>ss</sub> aumentaron linealmente con la concentración inicial de BPA (Figura 7.4B) y de TBC (Figura 7.4E), según la correspondiente expresión de la fase de estado estacionario (Ecuación 7.17).

Los registros temporales de BPA (Figura 7.4A) y de TBC (Figura 7.4D) fueron ajustados mediante regresión no lineal, a una ecuación uniexponencial decreciente (Ecuación 7.19). Las amplitudes de la oxidación de BPA (Figura 7.4B) y de TBC (Figura 7.4E), fueron independientes de la concentración inicial de fenol, según la apropiada expresión de la fase postestacionaria (Ecuación 7.19). En cuanto a los valores de la constante de velocidad global de la oxidación de fenoles,  $\gamma$ , indicativa de la rapidez del proceso oxidativo, aumentaron linealmente con la concentración inicial de BPA (Figura 7.4C) y de TBC (Figura 7.4F). Los valores de 1/ $\gamma$  se ajustaron satisfactoriamente mediante regresión no lineal, a una ecuación inversa respecto a la concentración inicial de fenol, tanto en el caso de BPA (Figura 7.4C) como en el de TBC (Figura 7.4F). Ambos comportamientos concuerdan con la ecuación (7.21) de la fase postestacionaria.

Las dependencias experimentales observadas acerca de la concentración inicial de BPA y de TBC, en la fase de estado estacionario (Ecuación 7.17) y en la fase postestacionaria (Ecuación 7.21), indican que la reacción enzimática 7.1 actúa como determinante de la velocidad (Ecuación 7.15), en la ruta global de oxidación de fenoles como BPA y TBC (Ecuaciones 7.1 a 7.4), catalizado por HRP y en presencia de AA, como reductor acoplado y biomolécula detectora del proceso oxidativo.

Por tanto, existen dos parámetros cinéticos especialmente útiles para la determinación de muy bajas concentraciones de fenoles de interés biotecnológico, la velocidad de estado estacionario  $V_{ss}$  (Figuras 7.4B y E), y la constante aparente de la rapidez gobal del proceso oxidativo  $\gamma$  (Figuras 7.4C y F).



Efecto de la concentración inicial de fenol sobre la oxidación de fenoles, con  $H_2O_2$  100  $\mu$ M y AA 3  $\mu$ M, en tampón fosfato sódico 100 mM pH 6.5 a 25°C. (A-C) BPA 10-300 nM y HRP 240 nM. (D-F) TBC 10-300 nM y HRP 240 nM. (A, D) Absorbancia a 265 nm. vs. tiempo. (B, E) Amplitud y V<sub>ss</sub> vs. [HRP]<sub>0</sub>. (C, F)  $\gamma$  y 1/ $\gamma$  vs. [HRP]<sub>0</sub>.



#### **FIGURA 7.5**

 $V_{ss}$  vs. concentración inicial de fenol 10-300 nM sobre la oxidación de fenoles, con HRP 240 nM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM y AA 3 µM, en tampón fosfato sódico 100 mM pH 6.5 a 25°C. (A) Contaminantes fenólicos: bisfenol-A (BPA), p-cresol (pC) y fenol (Ph). (B) Contaminantes halofenólicos: 4-fluorofenol (4-FP), 4-clorofenol (4-CIP), 4- bromofenol (4-BrP) y 4-iodofenol (4-IP). (C) Fármacos fenólicos: 4-tercbutilcatecol (4-TBC), 4tercbutilfenol (4-TBP), hidroquinona (HQ), arbutina (AR) y paracetamol (AP). (D) Fitoquímicos fenólicos: ácido clorogénico (CGA), ácido cafeico (CA), ácido ferúlico (FA), esculetina (ESC) y tirosol (TOL). Ambos parámetros cinéticos muestran una dependencia lineal respecto a la concentración inicial del fenol investigado. Sin embargo, la evaluación de  $\gamma$  requiere el análisis del conjunto del registro temporal de la desaparición de AA. Por el contrario, la medida de V<sub>ss</sub> es posible analizando únicamente la porción inicial lineal de cada registro. Esto permite abreviar los periodos de tiempo de los ensayos experimentales por triplicado, lo cual resulta especialmente útil para las reacciones más lentas, con muy bajas concentraciones iniciales del fenol en estudio. Así pues, se ha escogido el parámetro cinético V<sub>ss</sub> para la determinación de la concentración inicial de diversos sustratos fenólicos de POD, en presencia de AA como reductor acoplado y biomolécula detectora.

Este método de bioanálisis enzimático espectrofotométrico ha mostrado una satisfactoria linealidad, dentro del intervalo comprendido entre las concentraciones iniciales de 10 y 300 nM, para varios contaminantes fenólicos (Figura 7.5A), contaminantes halofenólicos (Figura 7.5B), fármacos fenólicos (Figura 7.5C) y fitoquímicos fenólicos (Figura 7.5D). Este método puede resultar útil para detectar pequeñas pérdidas de contaminantes fenólicos y halofenólicos en industrias químicas, evitando su eliminación en vertidos industriales y aumentando su seguridad medioambiental. Además, el método también puede ser apropiado para determinar bajas concentraciones de fármacos y fitoquímicos fenólicos, en industrias farmacéuticas y productoras de ingredientes nutricéuticos y cosmecéuticos.

En conclusión, los resultados de los estudios experimentales realizados (Figuras 7.2, 7.3 y 7.4), apoyan la validez del análisis cinético desarrollado (Ecuaciones 7.5 a 7.23), para el mecanismo de reacción propuesto (Reacciones 7.1 a 7.4). El análisis cinético ha conducido a la optimización de las condiciones de reacción, para conseguir la determinación de muy bajas concentraciones, en el orden de magnitud nanomolar, de contaminantes, fármacos y fitoquímicos fenólicos, a través de un método de bioanálisis enzimático espectrofotométrico (Figura 7.5). Estos resultados superan ampliamente los estudios de otros autores (Sección 1.4), sobre la determinación de fenoles de interés biotecnológico, con otros procedimientos menos sensibles, o bien técnicas cromatográficas, espectrofluorimétricas y electroquímicas, más laboriosas, más costosas o menos reproducibles.

8

# Conclusiones

# 8. CONCLUSIONES

# **8.0 CONCLUSIONS**

The studies realized in this Memory have driven to the statement of the following specific and general conclusions.

# 8.0.1 Specific conclusions

#### Chapter 4.

4.1) The preliminary assays for the biodegradation of both dyes by peroxidases concluded that the enzymatic reactions were successful and it was possible to identify the wavelengths for products and therefore the detection of the intermediate products, isatin for IC and 2-2'-disulphonylazobenzene for RBBR.

4.2) The pH study concluded that these reactions take place mainly in acicid mediums. Biodegradation of IC showed an optimal pH of 3.0 for both peroxidases. Biodegradation of RBBR was higher at pH 4.0 for SBP and 5.0 for HRP.

4.3) The reaction mechanism suggested includes an enzymatic reaction catalyzed by peroxidase and a series of coupling non-enzymatic reactions.

4.4) The enzymatic reaction is the rate determining step for both colorants and peroxidases, which follows a uniexponential kinetic behavior. Both peroxidases have low affinity towards both colorants, following a first order kinetics, according to the previous kinetic analysis. HRP and SBP showed a similar catalytic efficiency toward RBBR but HRP showed a catalytic efficiency four times higher than SBP toward IC. The initial hydrogen peroxide concentration effect it has stablished a net stoichiometry for hydrogen peroxide/colorant=1/1, according to the reaction mechanism suggested. Also, it has been tested the absence of inhibition by excess of substrate when hydrogen peroxide concentrations are equal or lower than 1 mM or 2 mM , for IC and RBBR respectively.

4.5) Optimal biodegradation conditions for both colorants studied, have been determined, taking advantages with respect to other unfavorable environmental methods. Also, has been concluded that HRP shows more catalytic efficiency but SBP is cheaper and more stable so the election of one of other enzyme needs more information about pH and other characteristics of the specific effluent.

#### Chapter 5.

5.1) Preliminary assays for the biodegradation of IC by *Trametes villosa* (TvL) SBP and HRP, with the natural mediators MSG, SGA,SGO and ASG concluded that these systems enzyme-mediator (EMS) allow the biodegradation of IC, increasing the rate of the respective systems without mediator with TvL and SBP. Also, indicate that SGO may act as a premeditator.

5.2) The pH effect for these EMS for the degradation of IC with four different natural mediators showed that pH optimum varied between 7-8 for SBP and was 5.0 for TvL.

5.3) Considering preliminary assays and pH effect, it is proposed a reaction mechanism that includes enzymatic and non-enzymatic reactions, in which a premeditator (PM), the mediator (M), the radical of the mediator (MR) and other products can act. The kinetic analysis of the reaction mechanism involve different periods of time, pre-steady state, steady-state and post- steady-state. This kinetic analysis leads to an experimental design, useful for the kinetic characterization of the EMS investigated.

5.4) The statistical analysis of the experimental recordings during the degradation of IC, with the effect of initial concentration of enzyme/IC/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was in concordance with the mathematical expression previously deduced in the kinetic analysis. It has been demonstrated the validity of the reaction mechanism suggested, and the enzymatic reaction is the rate determining step of the global rate of the oxidative process. It has been verified the action of MSG, SGA and ASG like real mediators, due to their concentrations keep on practically constant during the oxidation of IC. SGO acts like a premeditator, which oxidation gives SGA who acts like the true mediator in the reaction.

5.5) It is possible to degrade 100  $\mu$ M IC by 40 nM of enzyme and 60  $\mu$ M of mediator in 10 min. The more effective systems are SBP-SGA at pH 7.0 and TvL-MSG at pH 5.0, being superior to other processes described in the bibliography.

#### Chapter 6.

6.1) The preliminary assays for the decolorization of RBBR by TvL, SBP and HRP, in presence of the natural mediators MSG, ASG,SGO and SGA concluded that these EMS give better yields than without mediator only in the case of TvL. SGO may acts again as premeditator.

6.2) The studies of pH of these EMS showed that the range of optimal pH for bio of RBBR by TvL was 5-6, thus 5.5 was selected the optimal one for all the cases. The steady state rate was calculated, being 50, 60, 55 and 45  $\mu$ M/s for MSG, ASG,

SGO and SGA respectively.

6.3) It is proposed a reaction mechanism after the preliminary studies, that includes enzymatic and non-enzymatic reactions, in which a premeditator (PM), the mediator (M), the radical of the mediator (MR) and other products can act. The kinetic analysis of the reaction mechanism involve different periods of time, pre-steady state, steady-state and post- steady-state, with different dependences of the kinetic parameters regarding to the initial concentrations of the EMS reactives.

6.4) The effect of enzyme concentration confirms that the enzymatic reaction is slower than the non enzymatic one, thus the enzymatic reaction is the determining step. The influence of mediator concentration showed that ASG is the fastest in the biodegradation of RBBR by TvL. The global speed of the biodegradation of colorant,  $\lambda$ , showed a kinetic behavior of first order, lineal with respect to the concentration of colorant. These dependences confirmed the validity of the proposed mechanism. Also, it was proved the action of SGO as a premeditator, and the MSG, SGA and ASG as mediators.

6.5) Optimal conditions for the biodegradation of 24  $\mu$ M RBBR in presence of TvL 60 nM with 2.5  $\mu$ M mediators was achieved in 10 min at pH 5.5. Among the natural mediators investigated, was also concluded that ASG was the more effective mediator, being superior to methods proposed by other authors.

#### Chapter 7.

7.1) Preliminary spectrophotometric assays, indicated that is feasible the enzymatic bioanalysis of nanomolar concentrations of phenols, oxidized by HRP with ascorbic acid (AA) as a coupled reductor and detector biomolecule.

7.2) It was proposed a reaction mechanism constituted of the oxidation enzymatic reaction of a phenol catalyzed by HRP, followed by the reduction of the phenolic radical by AA and subsequent non-enzymatic reactions, after the depletion of the phenol in the assay medium.

7.3) The kinetic analysis of the reaction mechanism has given rise to equations that permit the prediction of the kinetic behavior of the oxidative process due to the variation of the initial concentrations of the reactives. These expressions also allow the determination of very low phenols concentrations in study.

7.4) Experimental results support the validity of the kinetic analysis and the proposed mechanism of reaction. The applied experimental design has permitted optimize the reaction conditions to determine concentrations between 10 and 300 nM of the investigated phenols. Among them, there are phenolic pollutants, drugs and phytochemicals with important biotechnological applications. This bioanalysis

enzymatic method is superior to other previously studied in the bibliography.

# 8.0.2 General conclusions

The realization of preliminary assays combined with other previous studies carried out by other authors, have driven to develop a reaction mechanism which involves enzymatic and non-enzymatic reactions, whose kinetic analysis have given useful expressions for an experimental design, which has been permitted to test its validity, as well as to characterize many enzymatic systems.

#### Chapter 4.

It has characterized kinetically and optimized the enzymatic biodegradation of IC and RBBR by  $H_2O_2$ , catalyzed by the peroxidases HRP and SBP, with a spectrophotometric method.

#### Chapter 5

It has reached the kinetic characterization and the optimization of the enzymatic biodegradation of IC, by several systems enzyme-mediator (EMS). In particular, the enzyme SBP with  $H_2O_2$  and TvL with  $O_2$ , in presence of the natural premediator SGO and the natural mediators MSG, ASG and SGA.

#### Chapter 6.

It has been studied the kinetic characterization and the optimization of the enzymatic biodegradation of RBBR by TvL and O<sub>2</sub>, with the natural premediator SGO and the natural mediators MSG, ASG and SGA.

#### Chapter 7

It has carried out a spectrophotometric and ultrasensible method of enzymatic biodegradation, useful for the determination of nanomolar concentrations of different phenolic contaminants, drugs and phytochemicals of biotechnological interest.

Chapters 4, 5 and 6 provide new enzymatic methods for the sustainable biodegradation of important industrial pollutants, using as oxidants hydrogen peroxide or molecular oxygen and being adapted to the specific conditions of different industrial effluents. These methods avoid the use of aggressive reactives for the environment and physic-chemical or biologics methods that require long reaction times (hour or days).

Chapter 7 propose a new enzymatic method effective in laboratories of environmental management, to avoid small losses of phenolic pollutants or in laboratories of quality management of pharmaceutical industries producing nutraceutical or cosmeceutical ingredients, to detect small concentrations of phenolic drugs or phytochemicals. As much in biodegradation and bioanalytical applications, the new enzymatic methods developed in this Thesis, exceed in simplicity, speed and sustainability to numerous methods described by other authors in specialized bibliography.

In consequence, the proposed objectives at the beginning of this Doctoral Thesis have been successfully reached.

### **8.1 CONCLUSIONES**

Los estudios realizados en esta Memoria han conducido al establecimiento de las siguientes conclusiones específicas y generales.

## 8.1.1 Conclusiones específicas

#### Capítulo 4

4.1) Los ensayos preliminares confirmaron la satisfactoria biodegradación de los dos colorantes comerciales, IC y RBBR, por las peroxidasas HRP y SBP. Además, fue posible identificar las longitudes de onda características de los productos, y de algunas especies intermedias de las reacciones, como isatina y 2-2´-disulfonil azobenceno para IC y RBBR, respectivamente.

4.2) El estudio del pH reveló que estas reacciones tienen lugar preferentemente en medios ácidos. La biodegradación enzimática de IC mostró un pH óptimo de 3.0, tanto con HRP como con SBP. La mayor biodegradación enzimática de RBBR se observó pH 4.0 con SBP, y a pH 5.0 con HRP.

4.3) Se ha sugerido un mecanismo de reacción, que incluye reacciones enzimáticas catalizadas por peroxidasas, y una serie de reacciones no enzimáticas acopladas.

4.4) La reacción enzimática es la etapa determinante de la velocidad del proceso global, para ambos colorantes y enzimas, y sigue un comportamiento cinético uniexponencial. Las dos peroxidasas investigadas actúan con baja afinidad sobre los dos colorantes, siguiendo una cinética de primer orden, según el análisis cinético previo. Ambas peroxidasas tienen una eficiencia catalítica similar hacia RBBR. Sin embargo, HRP muestra del orden de cuatro veces más eficacia que SBP hacia IC. El efecto de la concentración inicial de peróxido de hidrógeno, ha conducido al establecimiento de una estequiometría neta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Colorante = 1/1, para IC y RBBR, de acuerdo con el mecanismo de reacción sugerido. Además, se ha comprobado la ausencia de inhibición por exceso de sustrato, cuando las concentraciones de peróxido de hidrógeno son iguales o menores a 1 mM o 2 mM para IC y RBBR, respectivamente.

4.5) Las condiciones para una biodegradación óptima se han determinado para ambos colorantes, teniendo ventajas sobre otros métodos no favorables medioambientalmente. Además, se ha concluido que HRP tiene mayor eficiencia catalítica que SBP, pero ésta es más estable térmicamente, y es una fuente de peroxidasa más barata. Por tanto, la elección de una u otra enzima puede estar relacionada con el pH y otras características específicas del efluente.

#### Capítulo 5.

5.1) Los ensayos preliminares con lacasa de *Trametes villosa* (TvL), SBP y HRP, en presencia de los mediadores naturales MSG, SGA, SGO y ASG, confirmaron que estos sistemas enzima-mediador (EMS) permiten la biodegradación de IC, superando a los respectivos sistemas en ausencia de mediador con las dos primeras enzimas. También indican que SGO podría actuar como premediador.

5.2) El efecto del pH sobre estos EMS con todos los mediadores previamente mencionados, mostró que el pH óptimo varió entre 7.0 y 8.0 para el caso de SBP, manteniéndose en 5.0 el pH óptimo para TvL.

5.3) Considerando los ensayos preliminares y efecto del pH, se propone un mecanismo de reacción que incluye reacciones enzimáticas y no enzimáticas, en las cuales puede intervenir un premediador (PM), un mediador (M), el radical del mediador (MR) y otros productos. El análisis cinético del mecanismo de reacción abarca distintas fases temporales, como fase inicial, estacionaria y post-estacionaria. Este análisis cinético conduce a un diseño experimental, útil para la caracterización cinética de los EMS investigados.

5.4) Los resultados experimentales de la biodegradación de IC, investigando los efectos de las concentraciones iniciales de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/enzima/mediador/IC, se ajustaron a las ecuaciones previamente deducidas del análisis cinético. Se demostró la validez del mecanismo de reacción sugerido, y que la reacción enzimática es la determinante de la velocidad global del proceso oxidativo. Se confirmó que MSG, SGA y ASG se comportan como auténticos mediadores. SGO interviene como premediador cuya oxidación da lugar a SGA, el cual actúa como verdadero mediador en la reacción.

5.5) Se ha comprobado que es posible la biodegradación enzimática de IC 100  $\mu$ M, por enzima 40 nM y mediador 60  $\mu$ M, en 10 min. Los sistemas más eficaces son SBP-SGA a pH 7.0 y TvL-MSG a pH 5.0, superando a otros métodos descritos en la bibliografía.

#### Capítulo 6.

6.1) Los ensayos preliminares de decoloración de RBBR por TvL, SBP y HRP, ante los mediadores naturales MSG, ASG, SGO y SGA, revelaron que estos EMS dan mejores resultados que la misma enzima en ausencia de mediadores, únicamente para el caso de TvL. De nuevo sugieren que SGO podría comportarse como premediador.

6.2) Los estudios del efecto del pH sobre estos EMS, mostraron que la

biodegradación de RBBR por TvL con dichos mediadores, tiene un intervalo de pH óptimo entre 5.0 y 6.0. Por ello se seleccionó un pH 5.5 para las investigaciones sobre todos ellos. La velocidad de estado estacionario para cada uno de estos sistemas fue 50, 60, 55 y 45 μM/s para MSG, ASG, SGO y SGA, respectivamente.

6.3) El mecanismo de reacción propuesto tras los estudios preliminares, incluye reacciones enzimáticas y no enzimáticas, en las que pueden participar un premediador (PM), un mediador (M), un radical del mediador (MR) y otros productos. El análisis cinético incluye distintos periodos de tiempo, las fases pre-estacionaria, estacionaria y post-estacionaria. El diseño experimental de cada fase, predice diferentes dependencias de los parámetros cinéticos, respecto a las concentraciones iniciales de los reaccionantes del EMS.

6.4) El efecto de la concentración de enzima confirma que la reacción enzimática es más lenta que la no enzimática, y por tanto es la etapa determinante de la reacción. El efecto de la concentración de mediador mostró que ASG es el mediador más rápido para la biodegradación de RBBR por TvL. La rapidez global de la biodegradación del colorante,  $\gamma$ , mostró un comportamiento cinético de primer orden, lineal respecto a la concentración inicial de RBBR. Estas dependencias confirmaron la validez del mecanismo de reacción propuesto. También se comprobó la actuación de SGO como premediador, y de MSG, SGA y ASG como auténticos mediadores.

6.5) Se optimizaron las condiciones para la biodegradación de 24  $\mu$ M RBBR, en presencia de TvL 60 nM y mediador 2.5  $\mu$ M, en 10 min a pH 5.5. Entre los mediadores naturales investigados, ASG fue el mediador más efectivo, superando a métodos descritos por otros autores.

#### Capítulo 7.

7.1) Los ensayos espectrofotométricos preliminares, indicaron que resulta factible el bioanálisis enzimático de concentraciones nanomolares de fenoles, oxidados por HRP, con ácido ascórbico (AA) como reductor acoplado y biomolécula detectora.

7.2) Se propuso un mecanismo de reacción constituido por la reacción de oxidación enzimática de un fenol catalizada por HRP, seguida de la reducción del radical fenólico por AA, y posteriores reacciones no enzimáticas, tras el agotamiento del fenol en el medio de ensayo.

7.3) El análisis cinético del mecanismo de reacción ha proporcionado ecuaciones que permiten predecir el comportamiento cinético del proceso oxidativo, al variar las concentraciones iniciales de los reaccionantes. Estas expresiones también permiten la determinación de muy bajas concentraciones de los fenoles en estudio. 7.4) Los resultados experimentales apoyan la validez del análisis cinético y del mecanismo de reacción propuesto. El diseño experimental aplicado ha permitido optimizar las condiciones de reacción, para determinar concentraciones entre 10 y 300 nM de los fenoles investigados. Entre ellos, contaminantes, fármacos y fitoquímicos fenólicos con importantes aplicaciones biotecnológicas. Este método de bioanálisis enzimático supera a otros métodos previamente desarrollados en la bibliografía.

### 8.1.2 Conclusiones generales

La realización de ensayos preliminares, combinados con estudios previos de otros autores, han conducido al planteamiento de mecanismos de reacción, con reacciones enzimáticas y no enzimáticas, cuyo análisis cinético ha proporcionado expresiones útiles para un diseño experimental, que ha permitido comprobar la validez del mecanismo de reacción propuesto, y caracterizar cinéticamente los sistemas enzimáticos investigados.

**Capítulo 4.** Se ha caracterizado cinéticamente y optimizado la biodegradación enzimática de IC y RBBR por  $H_2O_2$ , catalizada por las peroxidasas HRP y SBP, mediante un método espectrofotométrico.

**Capítulo 5.** Se ha conseguido la caracterización cinética y la optimización de la biodegradación enzimática de IC, por varios sistemas enzima-mediador (EMS). En concreto las enzimas SBP con  $H_2O_2$  y TvL con  $O_2$ , en presencia del premediador natural SGO, y de los mediadores naturales, MSG, ASG, y SGA.

**Capítulo 6.** Se ha estudiado la caracterización cinética y la optimización de la biodegradación enzimática de RBBR por TvL con O<sub>2</sub>, ante el premediador natural SGO y los mediadores naturales MSG, ASG y SGA.

**Capítulo 7.** Se ha desarrollado un método espectrofotométrico y ultrasensible de bioanálisis enzimático, útil para la determinación de concentraciones nanomolares, de diferentes contaminantes, fármacos y fitoquímicos fenólicos de interés biotecnológico.

Los Capítulos 4, 5 y 6 aportan nuevos métodos enzimáticos, para la biodegradación sostenible de importantes contaminantes industriales, utilizando como oxidantes peróxido de hidrógeno o bien oxígeno molecular, y siendo adaptables a las condiciones específicas de distintos efluentes industriales. Estos métodos evitan el uso de reactivos agresivos para el medio ambiente, y de métodos físico-químicos o biológicos que requieren prolongados periodos de reacción (horas o días).

El Capítulo 7 propone un nuevo método enzimático eficaz en laboratorios de gestión medioambiental, para evitar pequeñas pérdidas de contaminantes fenólicos, o

bien en laboratorios de gestión de la calidad de industrias farmacéuticas y productoras de ingredientes nutricéuticos y cosmecéuticos, para detectar pequeñas concentraciones de fármacos y fitoquímicos fenólicos.

Tanto en las aplicaciones biodegradativas como en las bioanalíticas, los nuevos métodos enzimáticos desarrollados en esta Memoria, superan en simplicidad, rapidez y sostenibilidad a numerosos métodos, descritos por otros autores en la bibliografía especializada.

En consecuencia, se han alcanzado satisfactoriamente, los objetivos planteados al comienzo de este trabajo.



# Bibliografía

# 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Raheem, A., y Shearer, C.A. (2002). Extracellular enzyme production by freshwater ascomycetes. Fungal Divers. *11*, 1-19.
- Aboul-Gheit, A.K., Abdel-Hamid, S.M., Mahmoud, S.A., El-Salamony, R.A., Valyon, J., Mihalyi, M.R., y Szegedi, A. (2011). Mesoporous Ti-MCM-41 materials as photodegradation catalysts of 2,4,6-trichlorophenol in water. J. Mater. Sci. 46, 3319-3329.
- Ada, K., Ergene, A., Tan, S., y Yacin, E. (2009). Adsorption of Remazol Brilliant Blue R using ZnO fine powder: Equilibrium, kinetic and thermodynamic modeling studies. J. Hazard. Mater. *165*, 637-644.
- Adam, M., Dobias, P., Eisner, A., y Ventura, K. (2009). Extraction of antioxidants from plants using ultrasonic methods and their antioxidant capacity. 32, 288-294.
- Adamski, J., Nowak, P., y Kochana, J. (2010). Simple sensor for the determination of phenol and its derivatives in water based on enzyme tyrosinase. 55, 2363-2367.
- Agostini, E., Hernandez-Ruiz, J., Arnao, M.B., Milrad, S.R., Tigier, H.A., y Acosta, M. (2002). A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (Brassica napus) hairy-root cultures: inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits. 35, 1-7.
- Ahammad, A.J.S., Sarker, S., Rahman, M.A., y Lee, J.-J. (2010). Simultaneous Determination of Hydroquinone and Catechol at an Activated Glassy Carbon Electrode. 22, 694-700.
- Akhtar, S., Khan, A.A., y Husain, Q. (2005). Partially purified bitter gourd (Momordica charantia) peroxidase catalyzed decolorization of textile and other industrially important dyes. Bioresour. Technol. *96*, 1804-1811.
- Aksu, Z., y Tezer, S. (2000). Equilibrium and kinetic modelling of biosorption of Remazol Black B by Rhizopus arrhizus in a batch system: effect of temperature. 36, 431-439.
- Al-Ansari, M.M., Steevensz, A., Al-Aasm, N., Taylor, K.E., Bewtra, J.K., y Biswas, N. (2009). Soybean peroxidasecatalyzed removal of phenylenediamines and benzenediols from water. 45, 253-260.
- Alatorre, M. (2006). Influencia de las características hidráulicas y geométricas de biofiltros empacados sobre la eliminación de un colorante Azo. In X V Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales (México).
- Alcalde, M. (2007). Laccases: Biological Functions, Molecular Structure and Industrial Applications. In Industrial Enzymes, J. Polaina, and A.P. MacCabe, eds. (Springer), pp. 461-476.
- Amiri, M., Ghaffari, S., Bezaatpour, A., y Marken, F. (2012). Carbon nanoparticle-chitosan composite electrode with anion, cation, and neutral binding sites: Dihydroxybenzene selectivity. 162, 194-200.
- Andrade, L.S., Ruotolo, L.A.M., Rocha-Filho, R.C., Bocchi, N., Biaggio, S.R., Iniesta, J., Garcia-Garcia, V., y Montiel, V. (2007). On the performance of Fe and Fe,F doped Ti-Pt/PbO2 electrodes in the electrooxidation of the Blue Reactive 19 dye in simulated textile wastewater. 66, 2035-2043.
- Andreu-Navarro, A., Fernandez-Romero, J.M., y Gomez-Hens, A. (2012). Determination of polyphenolic content in beverages using laccase, gold nanoparticles and long wavelength fluorimetry. 713, 1-6.
- Andrzejewska, A., Krysztafkiewicz, A., y Jesionowski, T. (2007). Treatment of textile dye wastewater using modified silica. 75, 116-124.
- Antorini, M., Herpoel-Gimbert, I., Choinowski, T., Sigoillot, J.C., Asther, M., Winterhalter, K., y Piontek, K. (2002). Purification, crystallisation and X-ray diffraction study of fully functional laccases from two ligninolytic fungi. Biochim. Biophys. Acta-Protein Struct. Molec. Enzym. 1594, 109-114.
- Arnao, M.B., Acosta, M., Delrio, J.A., Varon, R., y Garciacanovas, F. (1990). A kinetic-study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen-peroxide. 1041, 43-47.
- Asada, K. (1992). Ascorbate peroxidase- A hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. Physiol. Plant. 85, 235-241.
- Asan, A., y Isildak, I. (2003). Determination of major phenolic compounds in water by reversed-phase liquid chromatography after pre-column derivatization with benzoyl chloride. 988, 145-149.
- Asgher, M. (2012). Biosorption of Reactive Dyes: A Review. Water Air Soil Pollut. 223, 2417-2435.
- Atapattu, S.N., y Rosenfeld, J.M. (2011). Solid phase analytical derivatization of anthropogenic and natural phenolic estrogen mimics with pentafluoropyridine for gas chromatography-mass spectrometry. *1218*, 9135-9141.
- Atasever, A., Ozdemir, H., Gulcin, I., y Irfan Kufrevioglu, O. (2013). One-step purification of lactoperoxidase from bovine milk by affinity chromatography. *136*, 864-870.
- Attia, A.A., Rashwan, W.E., y Khedr, S.A. (2006). Capacity of activated carbon in the removal of acid dyes subsequent to its thermal treatment. 69, 128-136.

- Aturki, Z., Fanali, S., D'Orazio, G., Rocco, A., y Rosati, C. (2008). Analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oil by using reversed-phase capillary electrochromatography. 29, 1643-1650.
- Baek, H.K., y Vanwart, H.E. (1992). Elementary steps in the reaction of horseradish-peroxidase with several peroxides- Kinetics and thermodynamics of formation of compound-0 and compound-1. *114*, 718-725.
- Bakeeva, R.F., Gorbunova, T.S., Vakhitova, O.E., Gaisina, A.I., Yusupova, L.M., Garmonov, S.Y., y Sopin, V.F. (2010). Spectrophotometric determination of p-aminophenol in drugs using 5,7-dichloro-4,6-dinitrobenzofuroxan reagent in micellar medium. 44, 282-286.
- Bala, I., Bhardwaj, V., Hariharan, S., y Kumar, M. (2006). Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. 40, 206-210.
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases occurrence and properties. FEMS Microbiol. Rev. 30, 215-242.
- Baldrian, P., y Snajdr, J. (2006). Production of ligninolytic enzymes by litter-decomposing fungi and their ability to decolorize synthetic dyes. 39, 1023-1029.
- Banci, L. (1997). Structural properties of peroxidases. J. Biotechnol. 53, 253-263.
- Banci, L., Bertini, I., Pease, E.A., Tien, M., y Turano, P. (1992). H-1-NMR Investigation of manganese peroxidase from phanerochaete-chrysosporium- A comparison with other peroxidases. 31, 10009-10017.
- Banerjee, U.C., y Vohra, R.M. (1991). Production of laccase by Curvularia sp. Folia Microbiol. 36, 343-346.
- Bansal, N., y Kanwar, S.S. (2013). Peroxidase(s) in Environment Protection.
- Barse, A., Chakrabarti, T., Ghosh, T.K., Pal, A.K., y Jadhao, S.B. (2006). One-tenth dose of LC50 of 4-tertbutylphenol causes endocrine disruption and metabolic changes in *Cyprinus carpio*. Pest. Biochem. Physiol. 86, 172-179.
- Barsoom, B.N., Abdelsamad, A.M.E., y Adib, N.M. (2006). Indirect spectrophotometric determination of arbutin, whitening agent through oxidation by periodate and complexation with ferric chloride. *64*, 844-852.
- Bassi, A., Geng, Z., y Gijzen, M. (2004). Enzymatic removal of phenol and chlorophenols using soybean seed hulls. Eng. Life Sci. 4, 125-130.
- Basto, C., Silva, C.J., Gubitz, G., y Cavaco-Paulo, A. (2007). Stability and decolourization ability of Trametes villosa laccase in liquid ultrasonic fields. Ultrason. Sonochem. 14, 355-362.
- Bazoti, F.N., Gikas, E., Skaltsounis, A.L., y Tsarbopoulos, A. (2006). Development of a liquid chromatographyelectrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI MS/MS) method for the quantification of bioactive substances present in olive oil mill wastewaters. 573, 258-266.
- Ben Younes, S., Bouallagui, Z., Gargoubi, A., y Sayadi, S. (2011). Investigation of dyes degradation intermediates with Scytalidium thermophilum laccase. Eur. Food Res. Technol. 233, 751-758.
- Bentouami, A., Ouali, M.S., y De Menorval, L.-C. (2010). Photocatalytic decolourization of indigo carmine on 1,10phenanthrolinium intercalated bentonite under UV-B and solar irradiation. 212, 101-106.
- Berge-Lefranc, D., Eyraud, M., y Schaf, O. (2008). Electrochemical determination of p-cresol concentration using zeolite-modified electrodes. *11*, 1063-1073.
- Bolwell, G.P. (1988). Synthesis of cell-wall components- Aspects of control. . Phytochemistry 27, 1235-1253.
- Bonoli, M., Montanucci, M., Toschi, T.G., y Lercker, G. (2003). Fast separation and determination of tyrosol, hydroxytyrosol and other phenolic compounds in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis with ultraviolet-diode array detection. J. Chromatogr. A *1011*, 163-172.
- Borhade, A.V., y Baste, Y.R. (2012). Green chemistry approach for the synthesis of PbSnO(3). J. Therm. Anal. Calorim. 107, 77-83.
- Boyer, N., Desbiez, M.O., Hofinger, M., y Gaspar, T. (1983). Effect of lithium on thigmomorphogenesis in bryoniadioica ethylene production and sensitivity. Plant Physiol. 72, 522-525.
- Brock, J.W., Yoshimura, Y., Barr, J.R., Maggio, V.L., Graiser, S.R., Nakazawa, H., y Needham, L.L. (2001). Measurement of bisphenol A levels in human urine. 11, 323-328.
- Burke, R.M., y Cairney, J.W.G. (2002). Laccases and other polyphenol oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi. Mycorrhiza 12, 105-116.
- Cairney, J.W.G., y Burke, R.M. (1998). Do ecto- and ericoid mycorrhizal fungi produce peroxidase activity? Mycorrhiza 8, 61-65.
- Call, H.P., y Mucke, I. (1997). History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccasemediator-systems (Lignozym(R)-process). J. Biotechnol. 53, 163-202.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martinez, A.T., Romero, J., Gutierrez, A., y del Rio, J.C. (2007). Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. Enzyme Microb. Technol. 40, 1264-1271.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martinez, M.J., y Martinez, A.T. (2005). Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. Appl. Environ. Microbiol. 71, 1775-1784.
- Camarillo, R., y Rincon, J. (2011). Photocatalytic Discoloration of Dyes: Relation between Effect of Operating Parameters and Dye Structure. Chem. Eng. Technol. 34, 1675-1684.

- Campa, A. (1991). Biological roles of plant peroxidases: know and potential function. (Florida, Peroxidases in Chemistry and Biology).
- Campos, R., Cavaco-Paulo, A., Robra, K.H., Schneider, M., y Gubitz, G. (2001a). Indigo degradation with laccases from *Polyporus sp.* and *Sclerotium rolfsii*. 71, 420-424.
- Campos, R., Kandelbauer, A., Robra, K.H., Cavaco-Paulo, A., y Gubitz, G.M. (2001b). Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. J. Biotechnol. *89*, 131-139.
- Cano, M., Solis, M., Diaz, J., Solis, A., Loera, O., y Teutli, M.M. (2011). Biotransformation of indigo carmine to isatin sulfonic acid by lyophilized mycelia from Trametes versicolor. Afr. J. Biotechnol. 10, 12224-12231.
- Cao, X., Cai, X., Feng, Q., Jia, S., y Wang, N. (2012). Ultrathin CdSe nanosheets: Synthesis and application in simultaneous determination of catechol and hydroquinone. 752, 101-105.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., y Skakkebaek, N.E. (1995). Declining semen quality and increasing incidence of testicular cancer- Is there a common-cause. 103, 137-139.
- Castillo, F.J., y Greppin, H. (1986). Balance between anionic and cationic extracellular peroxidase-activities in sedum-album leaves after ozone exposure - Analysis by high-performance liquid chromatography. Physiol. Plant. 68, 201-208.
- Castillo, F.J., Miller, P.R., y Greppin, H. (1987). Extracellular biochemical markers of photochemical oxidant airpollution damage to Norway spruce. Experientia 43, 111-115.
- Castillo, F.J., Penel, C., y Greppin, H. (1984). Peroxidase release induced by ozone in sedum-album leaves involvement of Ca<sup>+2</sup>. Plant Physiol. 74, 846-851.
- Caza, N., Bewtra, J.K., Biswas, N., y Taylor, K.E. (1999). Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase. Water Res. 33, 3012-3018.
- Cervini, P., y Gomes Cavalheiro, E.T. (2009). Evaluation of the Analytical Potentialities of a Composite Electrode Modified with Molecularly Imprinted Polymers. 42, 1940-1957.
- Cestari, A.R., Vieira, E.E., Tavares, A.M.G., y Bruns, R.E. (2008). The removal of the indigo carmine dye from aqueous solutions using cross-linked chitosan - Evaluation of adsorption thermodynamics using a full factorial design. J. Hazard. Mater. 153, 566-574.
- Cicek, F., Ozer, D., Ozer, A., y Ozer, A. (2007). Low cost removal of reactive dyes using wheat bran. 146, 408-416.
- Claus, H. (2003). Laccases and their occurrence in prokaryotes. Arch. Microbiol. 179, 145-150.
- Coelho, M.G., de Andrade, F.V., de Lima, G.M., Augusti, R., Ferreira, M.P., Maria, D.A., y Ardisson, J.D. (2011). Preparation of a new composite by reaction of SnBu3Cl with TiCl4 in the presence of NH4OH-photocatalytic degradation of indigo carmine. 25, 220-225.
- Cuartero, M., Ortuno, J.A., Truchado, P., Garcia, M.S., Tomas-Barberan, F.A., y Albero, M.I. (2011). Voltammetric behaviour and square-wave voltammetric determination of the potent antioxidant and anticarcinogenic agent ellagic acid in foodstuffs. Food Chem. 128, 549-554.
- Champagne, P.P., Nesheim, M.E., y Ramsay, J.A. (2010). Effect of a non-ionic surfactant, Merpol, on dye decolorization of Reactive blue 19 by laccase. Enzyme Microb. Technol. 46, 147-152.
- Champagne, P.P., y Ramsay, J. (2007). Reactive blue 19 decolouration by laccase immobilized on silica beads. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77, 819-823.
- Champagne, P.P., y Ramsay, J.A. (2010). Dye decolorization and detoxification by laccase immobilized on porous glass beads. Bioresour. Technol. 101, 2230-2235.
- Chance, B. (1949). The enzyme-substrate compounds of horseradish peroxidase and peroxides. 2. Kinetics of formation and decomposition of the primary and secondary complexes. 22, 224-252.
- Chance, B. (1952). The kinetics and stoichiometry of the transition from the primary to the secondary peroxidase peroxide complexes. Arch. Biochem. Biophys. 41, 416-424.
- Chang, I.H., Cheng, K.T., Huang, P.C., Lin, Y.Y., Cheng, L.J., y Cheng, T.S. (2012). Oxidative stress in greater duckweed (Spirodela polyrhiza) caused by long-term NaCl exposure. Acta Physiol. Plant. 34, 1165-1176.
- Chang, M.L., y Chang, C.M. (2003). Simultaneous HPLC determination of hydrophilic whitening agents in cosmetic products. 33, 617-626.
- Chang, S.C., Rawson, K., y McNeil, C.J. (2002). Disposable tyrosinase-peroxidase bi-enzyme sensor for amperometric detection of phenols. 17, 1015-1023.
- Chang, S.H., Chuang, S.H., Li, H.C., Liang, H.H., y Huang, L.C. (2009). Comparative study on the degradation of IC Remazol Brilliant Blue R and IC Acid Black 1 by Fenton oxidation and Fe(0)/air process and toxicity evaluation. J. Hazard. Mater. 166, 1279-1288.
- Chen, B., Zhang, L.Y., y Chen, G. (2011). Determination of salidroside and tyrosol in Rhodiola by capillary electrophoresis with graphene/poly(urea-formaldehyde) composite modified electrode. Electrophoresis 32, 870-876.
- Chen, D.M., Bastias, B.A., Taylor, A.F.S., y Cairney, J.W.G. (2003). Identification of laccase-like genes in

ectomycorrhizal basidiomycetes and transcriptional regulation by nitrogen in *Piloderma byssinum*. New Phytol. 157, 547-554.

- Chen, T.Y., Kao, C.M., Hong, A., Lin, C.E., y Liang, S.H. (2009). Application of ozone on the decolorization of reactive dyes - Orange-13 and Blue-19. Desalination 249, 1238-1242.
- Chen, Y., Chen, T., Cao, F., Yin, Z., He, X., Gao, J., Zhang, A., y Zhao, C. (2008). Polyethersulfone-modified montmorillonite hybrid beads for the removal of bisphenol a. 43, 1404-1420.
- Cheung, H.Y., y Zhang, Q.F. (2008). Enhanced analysis of triterpenes, flavonoids and phenolic compounds in Prunella vulgaris L. by capillary zone electrophoresis with the addition of running buffer modifiers. J. Chromatogr. A 1213, 231-238.
- Chi, W.C., Chen, C.H., y Liu, S.M. (2009). Biodegradation of anthraquinone dyes by Shewanella sp NTOU1 under anaerobic conditions. Water Sci. Technol. 60, 889-899.
- Chimuka, L., Nefale, F., y Masevhe, A. (2007). Determination of phenols in water samples using a supported liquid membrane extraction probe and liquid chromatography with photodiode array detection. *60*, 102-108.
- Chiou, C.C., Chang, P.Y., Chan, E.C., Wu, T.L., Tsao, K.C., y Wu, J.T. (2003). Urinary 8-hydroxydeoxyguano sine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. Clin. Chim. Acta 334, 87-94.
- Cho, E.-A., Seo, J., Lee, D.-W., y Pan, J.-G. (2011). Decolorization of indigo carmine by laccase displayed on Bacillus subtilis spores. 49, 100-104.
- Chokwe, T.B., Okonkwo, J.O., Sibali, L.L., y Ncube, E.J. (2012). Optimization and Simultaneous Determination of Alkyl Phenol Ethoxylates and Brominated Flame Retardants in Water after SPE and Heptafluorobutyric Anhydride Derivatization followed by GC/MS. Chromatographia 75, 1165-1176.
- Chou, W.L., Wang, C.T., Chang, C.P., Chung, M.H., y Kuo, Y.M. (2011). Removal of color and cod from dyeing wastewater by paired electrochemical oxidation. Fresenius Environ. Bull. 20, 78-85.
- Christian, V., Shrivastava, R., Shukla, D., Modi, H.A., y Vyas, B.R.M. (2005). Degradation of xenobiotic compounds by lignin-degrading white-rot fungi: enzymology and mechanisms involved. *43*, 301-312.
- Chu, L., y Zhang, X. (2012). Fabrication of Nano-Porous Hydroxyapatite Modified Electrode and Its Application for Determination of p-Chlorophenol. 12, 300-307.
- Daassi, D., Frikha, F., Zouari-Mechichi, H., Belbahri, L., Woodward, S., y Mechichi, T. (2012). Application of response surface methodology to optimize decolourization of dyes by the laccase-mediator system. *108*, 84-91.
- Dalmazio, I., de Urzedo, A.P.F.M., Alves, T.M.A., Catharino, R.R., Eberlin, M.N., Nascentes, C.C., y Augusti, R. (2007). Electrospray ionization mass spectrometry monitoring of indigo carmine degradation by advanced oxidative processes. 42, 1273-1278.
- Daum, G., Bohni, P.C., y Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria -cytochrome-B2 and cytochrome-C peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. 257, 3028-3033.
- de Andrade, F.V., de Lima, G.M., Augusti, R., Coelho, M.G., Ardisson, J.D., y Romero, O.B. (2012). A versatile approach to treat aqueous residues of textile industry: The photocatalytic degradation of Indigo Carmine dye employing the autoclaved cellular concrete/Fe2O3 system. 180, 25-31.
- de Araujo, T.A., Cardoso, J.C., Barbosa, A.M.J., y Ferreira, V.S. (2009). Influence of the surfactant bromide of cetyltrimetyl ammonium in the determination of chlorogenic acid in instant coffee and mate tea samples. Colloid Surf. B-Biointerfaces 73, 408-414.
- de Carvalho, M.L., Santhiago, M., Peralta, R.A., Neves, A., Micke, G.A., y Vieira, I.C. (2008). Determination of chlorogenic acid in coffee using a biomimetic sensor based on a new tetranuclear copper(II) complex. 77, 394-399.
- de Carvalho, T.E.M., Fungaro, D.A., Magdalena, C.P., y Cunico, P. (2011). Adsorption of indigo carmine from aqueous solution using coal fly ash and zeolite from fly ash. J. Radioanal. Nucl. Chem. 289, 617-626.
- de Oliveira, I.R.W.Z., y Vieira, I.C. (2006). Immobilization procedures for the development of a biosensor for determination of hydroquinone using chitosan and gilo (Solanum gilo). 38, 449-456.
- de Oliveira, I.R.W.Z., Vieira, I.C., Lupetti, K.O., Fatibello-Filho, O., de Favere, V.T., y Laranjeira, M.C.M. (2004). Biosensor based on chitosan biopolymer and crude extract of ginger (*Zingiber officinalis rosc.*) for the determination of hydroquinone in wastewater of photographic process. 37, 3111-3127.
- De Souza, C.G.M., y Peralta, R.M. (2003). Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. J. Basic Microbiol. 43, 278-286.
- de Souza, S., Forgiarini, E., y de Souza, A.A.U. (2007). Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). J. Hazard. Mater. 147, 1073-1078.
- del Moral, P.G., Arin, M.J., Resines, J.A., y Diez, M.T. (2007). Determination of ellagic acid in oak leaves and in sheep ruminal fluid by ion-pair RP-HPLC. J. Chromatogr. B *855*, 276-279.
- Deropp, J.S., Lamar, G.N., Wariishi, H., y Gold, M.H. (1991). NMR-study of the active-site of resting state and

cyanide-inhibited lignin peroxidase from phanerochaete-chrysosporium-comparison with horseradish-peroxidase. 266, 15001-15008.

- Deveci, T., Unyayar, A., y Mazmanci, M.A. (2004). Production of Remazol Brilliant Blue R decolourising oxygenase from the culture filtrate of Funalia trogii ATCC 200800. J. Mol. Catal. B-Enzym. 30, 25-32.
- Dhooghe, L., Meert, H., Cimanga, R.K., Vlietinck, A.J., Pieters, L., y Apers, S. (2011). The Quantification of Ellagic Acid in the Crude Extract of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. (Euphorbiaceae). 22, 361-366.
- Dirtu, A.C., Roosens, L., Geens, T., Gheorghe, A., Neels, H., y Covaci, A. (2008). Simultaneous determination of bisphenol A, triclosan, and tetrabromobisphenol A in human serum using solid-phase extraction and gas chromatography-electron capture negative-ionization mass spectrometry. 391, 1175-1181.
- dos Santos, A.B., Bisschops, I.A.E., Cervantes, F.J., y van Lier, J.B. (2005). The transformation and toxicity of anthraquinone dyes during thermophilic (55 degrees C) and mesophilic (30 degrees C) anaerobic treatments. J. Biotechnol. 115, 345-353.
- dos Santos, A.B., Cervantes, F.J., y van Lier, J.B. (2007). Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. Bioresour. Technol. 98, 2369-2385.
- Dsouza, T.M., Boominathan, K., y Reddy, C.A. (1996). Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 62, 3739-3744.
- Du, H., Ye, J., Zhang, J., Huang, X., y Yu, C. (2011). A voltammetric sensor based on graphene-modified electrode for simultaneous determination of catechol and hydroquinone. 650, 209-213.
- Du, P., Collins, J.R., y Loew, G.H. (1992). Homology modeling of a heme protein, lignin peroxidase, from the crystalstructure of cytochrome-c peroxidase. 5, 679-691.
- Dube, E., Shareck, F., Hurtubise, Y., Daneault, C., y Beauregard, M. (2008). Homologous cloning, expression, and characterisation of a laccase from Streptomyces coelicolor and enzymatic decolourisation of an indigo dye. Appl. Microbiol. Biotechnol. 79, 597-603.
- Dunford, H.B. (1982). Peroxidases. 4, 41-68.
- Dunford, H.B. (2010). Peroxidases Catalases. Biochemistry, biophysics, biotechnology, and physiology (Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.).
- Dunford, H.B., y Stillman, J.S. (1976). Function and mechanism of action of peroxidases. Coord. Chem. Rev. 19, 187-251.
- Dupuy, C., Pomerance, M., Ohayon, R., Noel-Hudson, M.S., Deme, D., Chaaraoui, M., Francon, J., y Virion, A. (2000). Thyroid oxidase (THOX2) gene expression in the rat thyroid cell line FRTL-5. Biochem. Biophys. Res. Commun. 277, 287-292.
- Duran, N., y Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. Appl. Catal. B-Environ. 28, 83-99.
- Dwivedi, U.N., Singh, P., Pandey, V.P., y Kumar, A. (2011). Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. J. Mol. Catal. B-Enzym. 68, 117-128.
- Edwards, S.L., Raag, R., Wariishi, H., Gold, M.H., y Poulos, T.L. (1993). Crystal-structure of lignin peroxidase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90, 750-754.
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D., y Eriksson, K.E.L. (1996). A fungal metabolite mediates degradation of nonphenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. FEBS Lett. 391, 144-148.
- Eichlerova, I., Homolka, L., Benada, O., Kofronova, O., Hubalek, T., y Nerud, F. (2007). Decolorization of Orange G and Remazol Brilliant Blue R by the white rot fungus Dichomitus squalens: Toxicological evaluation and morphological study. Chemosphere 69, 795-802.
- Eichlerova, I., Homolka, L., y Nerud, F. (2006). Synthetic dye decolorization capacity of white rot fungus Dichomitus squalens. Bioresour. Technol. 97, 2153-2159.
- El-Kosasy, A.M., Riad, S.M., bd El-Fattah, L.E., y Ahmad, S.A. (2003). Novel poly (vinyl chloride) matrix membrane electrodes for the determination of phenolic pollutants in waste water. 37, 1769-1775.
- Elegir, G., Kindl, A., Sadocco, P., y Orlandi, M. (2008). Development of antimicrobial cellulose packaging through laccase-mediated grafting of phenolic compounds. Enzyme Microb. Technol. 43, 84-92.
- ElKaoutit, M., Naranjo-Rodriguez, I., Temsamani, K.R., Hernandez-Artiga, M.P., Bellido-Milla, D., y Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L. (2008). A comparison of three amperometric phenoloxidase-Sonogel-Carbon based biosensors for determination of polyphenols in beers. 110, 1019-1024.
- Enayatzamir, K., Tabandeh, F., Yakhchali, B., Alikhani, H.A., y Rodriguez Couto, S. (2009). Assessment of the joint effect of laccase and cellobiose dehydrogenase on the decolouration of different synthetic dyes. *169*, 176-181.
- Endrenyi, L. (1981). Kinetic Data Analysis. Design and Analysis of Enzyme an Pharmacokinetic Experiments (New York, Plenum Press).
- Erecinsk.M, Oshino, N., Loh, P., y Brockleh.E (1973). In-vitro studies on yeast cytochrome C peroxidase and its possible function in electron-transfer and energy coupling reactions. 292, 1-12.

- Eren, H.A., Kurcan, P., y Anis, P. (2007). Investigation of the effects of dye hydrolysis on decolorisation of reactive dyeing effluents by ozonation. 17, 119-125.
- Ergene, A., Ada, K., Tan, S., y Katircioglu, H. (2009). Removal of Remazol Brilliant Blue R dye from aqueous solutions by adsorption onto immobilized Scenedesmus quadricauda: Equilibrium and kinetic modeling studies. Desalination 249, 1308-1314.
- Erman, J.E., Vitello, L.B., Miller, M.A., y Kraut, J. (1992). Active-site mutations in cytochrome-C-peroxidase-A critical role for histidine-52 in the rate of formation of compound-I. *114*, 6592-6593.
- F. M. de Urzedo, A.P., Nascentes, C.C., Diniz, M.E.R., Catharino, R.R., Eberlin, M.N., y Augusti, R. (2007). Indigo Carmine degradation by hypochlorite in aqueous medium monitored by electrospray ionization mass spectrometry. 21, 1893-1899.
- Fackler, K., Kuncinger, T., Ters, T., y Srebotnik, E. (2008). Laccase-catalyzed functionalization with 4-hydroxy-3methoxybenzylurea significantly improves internal bond of particle boards. Holzforschung 62, 223-229.
- Fan, Y.C., Hu, Z.L., Chen, M.L., Shen, T.C., y Zhu, Y. (2008). Analysis of Phenolic Compounds by Ionic Liquid Based Liquid-Liquid Extraction Coupled with High Performance Liquid Chromatography. 36, 1157-1161.
- Fanchiang, J.M., y Tseng, D.H. (2009). Degradation of anthraquinone dye CI Reactive Blue 19 in aqueous solution by ozonation. Chemosphere 77, 214-221.
- Fanjul-Bolado, P., Jose Lamas-Ardisana, P., Hernandez-Santos, D., y Costa-Garcia, A. (2009). Electrochemical study and flow injection analysis of paracetamol in pharmaceutical formulations based on screen-printed electrodes and carbon nanotubes. 638, 133-138.
- Farnet, A.M., Criquet, S., Tagger, S., Gil, G., y Le Petit, J. (2000). Purification, partial characterization, and reactivity with aromatic compounds of two laccases from *Marasmius quercophilus* strain 17. Can. J. Microbiol. 46, 189-194.
- Fatibello, O., de Souza, M.G., y Vieira, I.D. (2002). Flow injection spectrophotometric determination of phenolic compounds in wastewaters using peroxidase of zucchini (*Cucurbita pepo*). 27, 51-66.
- Fatibello, O., Lupetti, K.O., y Vieira, I.C. (2001). Chronoamperometric determination of paracetamol using an avocado tissue (*Persea americana*) biosensor. 55, 685-692.
- Fazli, M.M., Mesdaghinia, A.R., Naddafi, K., Nasseri, S., Yunesian, M., Assadi, M.M., Rezaie, S., y Hamzehei, H. (2010a). Optimization of reactive blue 19 decolorization by *Ganoderma SP* using response surface methodology. Iran. J. Environ. Health Sci. Eng. 7, 35-42.
- Fazli, M.M., Mesdaghinia, A.R., Naddafi, K., Nasseri, S., Yunesian, M., Assadi, M.M., Rezaie, S., y Hamzehei, H. (2010b). Screening of factors affecting reactive blue 19 decolorization by Ganoderma sp. using fractional factorial experimental design. Desalin. Water Treat. 22, 22-29.
- FDA (2009). Guidance for Industry: Evidence-Based Review System for the Scientific Evaluation of Health Claims -Final.
- Fecka, I. (2009). Qualitative and Quantitative Determination of Hydrolysable Tannins and Other Polyphenols in Herbal Products from Meadowsweet and Dog Rose. Phytochem. Anal. 20, 177-190.
- Fenoll, L.G., Garcia-Mollina, F., Gilabert, M.A., Varon, R., Garcia-Ruiz, P.A., Tudela, J., Garcia-Canovas, F., y Rodriguez-Lopez, J.N. (2005). Interpretation of the reactivity of peroxidase compound II with phenols and anilines using the Marcus equation. Biol. Chem. 386, 351-360.
- Fernandes, S.C., Moccelini, S.K., Scheeren, C.W., Migowski, P., Dupont, J., Heller, M., Micke, G.A., y Vieira, I.C. (2009). Biosensor for chlorogenic acid based on an ionic liquid containing iridium nanoparticles and polyphenol oxidase. 79, 222-228.
- Fernandez-Sanjuan, M., Lacorte, S., Rigol, A., y Sahuquillo, A. (2012). New quality-control materials for the determination of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in sewage sludge. 404, 2499-2505.
- Fillat, A., Colom, J.F., y Vidal, T. (2010). A new approach to the biobleaching of flax pulp with laccase using natural mediators. Bioresour. Technol. *101*, 4104-4110.
- Finzel, B.C., Poulos, T.L., y Kraut, J. (1984). Crystal-structure of yeast cytochrome-C peroxidase refined at 1.7-A resolution. 259, 3027-3036.
- Flox, C., Ammar, S., Arias, C., Brillas, E., Vargas-Zavala, A.V., y Abdelhedi, R. (2006). Electro-Fenton and photoelectro-Fenton degradation of indigo carmine in acidic aqueous medium. Appl. Catal. B-Environ. 67, 93-104.
- Fontenot, E.J., Lee, Y.H., Matthews, R.D., Zhu, G.X., y Pavlostathis, S.G. (2003). Reductive decolorization of a textile reactive dyebath under methanogenic conditions. Appl. Biochem. Biotechnol. *109*, 207-225.
- Forgacs, E., Cserhati, T., y Oros, G. (2004). Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. Environ. Int. 30, 953-971.
- Frasconi, M., Favero, G., Tortolini, C., y Mazzei, F. (2009). Bioelectrochemical Characterization of Horseradish and Soybean Peroxidases. 21, 2378-2386.
- Fruton, J.S., ed. (1972). Molecules and Life: Historical Essays on the Interplay of Chemistry and Biology. (Nueva

York, Wiley-Interscience).

- Frylinck, L., Dubery, I.A., y Schabort, J.C. (1987). Biochemical-changes involved in stress response and ripening behavior of gamma-irradiated mango fruit. Phytochemistry 26, 681-686.
- Fu, L., Liu, X., Hu, J., Zhao, X., Wang, H., y Wang, X. (2009). Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of triazophos and carbaryl pesticides in water and fruit juice samples. 632, 289-295.
- Fukuji, T.S., Tonin, F.G., y Tavares, M.F.M. (2010). Optimization of a method for determination of phenolic acids in exotic fruits by capillary electrophoresis. 51, 430-438.
- Gajhede, M., Schuller, D.J., Henriksen, A., Smith, A.T., y Poulos, T.L. (1997). Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 angstrom resolution. Nat. Struct. Biol. 4, 1032-1038.
- Galai, S., Limam, F., y Marzouki, M.N. (2009). A new Stenotrophomonas maltophilia strain producing laccase. Use in decolorization of synthetics dyes. Appl. Biochem. Biotechnol. 158, 416-431.
- Gan, Z., Chen, Q., Fu, Y., y Chen, G. (2012). Determination of bioactive constituents in Flos Sophorae Immaturus and Cortex Fraxini by capillary electrophoresis in combination with far infrared-assisted solvent extraction. 130, 1122-1126.
- Gasperotti, M., Masuero, D., Vrhovsek, U., Guella, G., y Mattivi, F. (2010). Profiling and Accurate Quantification of Rubus Ellagitannins and Ellagic Acid Conjugates Using Direct UPLC-Q-TOF HDMS and HPLC-DAD Analysis. 58, 4602-4616.
- Gemeay, A.H., El-Ghrabawy, G.R., y Zaki, A.B. (2007). Kinetics of the oxidative decolorization of Reactive Blue-19 by acidic bromate in homogeneous and heterogeneous media. 73, 90-97.
- George, P. (1949). The effect of the peroxide concentration and other factors on the decomposition of hydrogen peroxide by catalase. Biochem. J. 44, 197-205.
- George, P. (1953). The 3rd intermediate compound of horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. J. Biol. Chem. 201, 427-434.
- George, S.J., Kvaratskhelia, M., Dilworth, M.J., y Thorneley, R.N.F. (1999). Reversible alkaline inactivation of lignin peroxidase involves the release of both the distal and proximal site calcium ions and bishistidine co-ordination of the haem. 344, 237-244.
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., y Sannia, G. (2010). Laccases: a never-ending story. Cell. Mol. Life Sci. 67, 369-385.
- Gil, M.I., Tomas-Barberan, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., y Kader, A.A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. 48, 4581-4589.
- Gilabert, M.A., Fenoll, L.G., Garcia-Molina, F., Garcia-Ruiz, P.A., Tudela, J., Garcia-Canovas, F., y Rodriguez-Lopez, J.N. (2004a). Stereospecificity of horseradish peroxidase. Biol. Chem. 385, 1177-1184.
- Gilabert, M.A., Fenoll, L.G., Garcia-Molina, F., Tudela, J., Garcia-Canovas, F., y Rodriguez-Lopez, J.N. (2004b). Kinetic characterization of phenol and aniline derivates as substrates of peroxidase. Biol. Chem. 385, 795-800.
- Gilabert, M.A., Hiner, A.N.P., Garcia-Ruiz, P.A., Tudela, J., Garcia-Molina, F., Acosta, M., Garcia-Canovasa, F., y Rodriguez-Lopez, J.N. (2004c). Differential substrate behaviour of phenol and aniline derivatives during oxidation by horseradish peroxidase: kinetic evidence for a two-step mechanism. BBA-Proteins Proteomics 1699, 235-243.
- Gillikin, J.W., y Graham, J.S. (1991). Purification and developmental analysis of the major anionic peroxidase from the seed coat of glycine-max. Plant Physiol. 96, 214-220.
- Gomes Machado, K.M., y Matheus, D.R. (2006). Biodegradation of remazol brilliant blue R by ligninolytic enzymatic complex produced by Pleurotus ostreatus. 37, 468-473.
- Gomez-Solis, C., Juarez-Ramirez, I., Moctezuma, E., y Torres-Martinez, L.M. (2012). Photodegradation of indigo carmine and methylene blue dyes in aqueous solution by SiC-TiO2 catalysts prepared by sol-gel. 217, 194-199.
- Goncalves, J., Mendes, B., Silva, C.L., y Camara, J.S. (2012). Development of a novel microextraction by packed sorbent-based approach followed by ultrahigh pressure liquid chromatography as a powerful technique for quantification phenolic constituents of biological interest in wines. 1229, 13-23.
- Gonzalez-Castejon, M., y Rodriguez-Casado, A. (2011). Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: A review. Pharmacol. Res. 64, 438-455.
- Gorman, M.J., Sullivan, L.I., Nguyen, T.D.T., Dai, H.E., Arakane, Y., Dittmer, N.T., Syed, L.U., Li, J., Hua, D.H., y Kanost, M.R. (2012). Kinetic properties of alternatively spliced isoforms of laccase-2 from *Tribolium castaneum* and *Anopheles gambiae*. Insect Biochem. Mol. Biol. 42, 193-202.
- Govere, E.M., Tonegawa, M., Bruns, M.A., Wheeler, E.F., Heinemann, P.H., Kephart, K.B., y Dec, J. (2005). Deodorization of swine manure using minced horseradish roots and peroxides. J. Agric. Food Chem. 53, 4880-4889.
- Gramss, G., Gunther, T., y Fritsche, W. (1998). Spot tests for oxidative enzymes in ectomycorrhizal, wood-, and litter decaying fungi. Mycol. Res. 102, 67-72.
- Gramss, G., Kirsche, B., Voigt, K.D., Gunther, T., y Fritsche, W. (1999). Conversion rates of five polycyclic aromatic

hydrocarbons in liquid cultures of fifty-eight fungi and the concomitant production of oxidative enzymes. Mycol. Res. *103*, 1009-1018.

- Gregus, P., Vlckova, H., Buchta, V., Kestranek, J., Krivcikova, L., y Novakova, L. (2010). Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of quorum-sensing molecules of *Candida albicans*. 53, 674-681.
- Groden, D., y Beck, E. (1979). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> destruction by ascorbate-dependent systems from chloroplasts. 546, 426-435.
- Gu, Y.-C., Liao, X.-P., Huang, Y.-J., y Shi, B. (2008). Adsorption of anionic dyes on Fe(III)-loaded collagen fibre from aqueous solution. 34, 111-121.
- Guaraldo, T.T., Pulcinelli, S.H., y Zanoni, M.V.B. (2011). Influence of particle size on the photoactivity of Ti/TiO2 thin film electrodes, and enhanced photoelectrocatalytic degradation of indigo carmine dye. 217, 259-266.
- Guimaraes, J.R., Guedes Maniero, M., y Nogueira de Araujo, R. (2012). A comparative study on the degradation of RB-19 dye in an aqueous medium by advanced oxidation processes. *110*, 33-39.
- Gunes, Y., Atav, R., y Namirti, O. (2012). Effectiveness of ozone in decolorization of reactive dye effluents depending on the dye chromophore. Text. Res. J. 82, 994-1000.
- Gunther, H., Perner, B., y Gramss, G. (1998). Activities of phenol oxidizing enzymes of ectomycorrhizal fungi in axenic culture and in symbiosis with Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). J. Basic Microbiol. 38, 197-206.
- Guo, M., Lu, F.P., Liu, M.Y., Li, T.P., Pu, J., Wang, N., Liang, P., y Zhang, C.Y. (2008). Purification of recombinant laccase from Trametes versicolor in Pichia methanolica and its use for the decolorization of anthraquinone dye. Biotechnol. Lett. 30, 2091-2096.
- Gupta, R.K., Mildvan, A.S., y Schonbaum, G.R. (1980). Water proton relaxation studies of the heme-environment in Mn (III)-substituted and native horseradish peroxidases. Arch. Biochem. Biophys. 202, 1-7.
- Hachem, C., Bocquillon, F., Zahraa, O., y Bouchy, M. (2001). Decolourization of textile industry wastewater by the photocatalytic degradation process. Dyes Pigment. 49, 117-125.
- Hadad, G.M., Emara, S., y Mahmoud, W.M.M. (2009). Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for the determination of paracetamol with dantrolene or/and cetirizine and pseudoephedrine in two pharmaceutical dosage forms. 79, 1360-1367.
- Hadibarata, T., Yusoff, A.R.M., y Kristanti, R.A. (2012). Decolorization and Metabolism of Anthraquionone-Type Dye by Laccase of White-Rot Fungi Polyporus sp S133. Water Air Soil Pollut. 223, 933-941.
- Hamid, M., y Khalil ur, R. (2009). Potential applications of peroxidases. Food Chem. 115, 1177-1186.
- Hammami, S., Oturan, M.A., Oturan, N., Bellakhal, N., y Dachraoui, M. (2012). Comparative mineralization of textile dye indigo by photo-Fenton process and anodic oxidation using boron-doped diamond anode. 45, 297-304.
- Han, X., Zhao, M., Lu, L., y Liu, Y. (2012). Purification, characterization and decolorization of bilirubin oxidase from Myrothecium verrucaria 3.2190. 116, 863-871.
- Harris, D.L., y Loew, G.H. (1996). Identification of putative peroxide intermediates of peroxidases by electronic structure and spectra calculations. 118, 10588-10594.
- Hasan, M., Ahmad, A.L., y Hameed, B.H. (2008). Adsorption of reactive dye onto cross-linked chitosan/oil palm ash composite beads. *136*, 164-172.
- Haschke, R.H., y Friedhoff, J.M. (1978). Calcium-related properties of horseradish-peroxidase. 80, 1039-1042.
- Hashemi, P., Serenjeh, F.N., y Ghiasvand, A.R. (2011). Reversed-Phase Dispersive Liquid-Liquid Microextraction with Multivariate Optimization for Sensitive HPLC Determination of Tyrosol and Hydroxytyrosol in Olive Oil. 27, 943-947.
- Hashimoto, S., Tatsuno, Y., y Kitagawa, T. (1986). Resonance raman evidence for oxygen-exchange between the Fe-IV=O heme and bulk water during enzymatic catalysis of horseradish-peroxidase and its relation with the heme-linked ionization. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83, 2417-2421.
- Hatakka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi-Production and role in lignin degradation. Fems Microbiol. Rev. 13, 125-135.
- Hazell, P., y Murray, D.R. (1982). Peroxidase isoenzymes and leaf senescence in sunflower, helianthus-annuus L. 108, 87-92.
- He, D., Shan, Y., Wu, Y., Liu, G., Chen, B., y Yao, S. (2011a). Simultaneous determination of flavanones, hydroxycinnamic acids and alkaloids in citrus fruits by HPLC-DAD-ESI/MS. 127, 880-885.
- He, S., Zhao, Y.F., Wei, M., y Duan, X. (2011b). Preparation of Oriented Layered Double Hydroxide Film Using Electrophoretic Deposition and Its Application in Water Treatment. Ind. Eng. Chem. Res. 50, 2800-2806.
- He, S., Zhao, Y.F., Wei, M., Evans, D.G., y Duan, X. (2012). Fabrication of Hierarchical Layered Double Hydroxide Framework on Aluminum Foam as a Structured Adsorbent for Water Treatment. Ind. Eng. Chem. Res. 51, 285-291.
- He, Z.Q., Lin, L.L., Song, S., Xia, M., Xu, L.J., Ying, H.P., y Chen, J.M. (2008). Mineralization of CI Reactive Blue 19 by ozonation combined with sonolysis: Performance optimization and degradation mechanism. Sep. Purif.

Technol. 62, 376-381.

- Heath, R.L. (1980). Initial events in injury to plants by air-pollutants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 31, 395-431.
- Heinzkill, M., Bech, L., Halkier, T., Schneider, P., y Anke, T. (1998). Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family Coprinaceae). Appl. Environ. Microbiol. 64, 1601-1606.
- Henriksen, A., Mirza, O., Indiani, C., Teilum, K., Smulevich, G., Welinder, K.G., y Gajhede, M. (2001). Structure of soybean seed coat peroxidase: A plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions. Protein Sci. 10, 108-115.
- Hernandez-Luna, C.E., Gutierrez-Soto, G., y Salcedo-Martinez, S.M. (2008). Screening for decolorizing basidiomycetes in Mexico - Screening and selection of ligninolytic basidiomycetes with decolorizing ability in Northeast Mexico. 24, 465-473.
- Higashi, Y., y Fujii, Y. (2009). HPLC-UV Analysis of Phenol and Chlorophenols in Water After Precolumn Derivatization with 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole. 32, 2372-2383.
- Ho, C.H., Chen, L., Ho, Y.P., y Yang, C.L. (2010). Oxidative Decomposition of Reactive Blue CI 19 with Sodium Hypochlorite. Environ. Eng. Sci. 27, 103-109.
- Ho, C.H., Chen, L., y Yang, C.L. (2011). Electrochemical Decomposition of Reactive Blue 19. Environ. Eng. Sci. 28, 53-61.
- Hochman, A., Figueredo, A., y Wall, J.D. (1992). Physiological functions of hydroperoxidases in rhodobactercapsulatus. 174, 3386-3391.
- Hori, I., Nihei, K.I., y Kubo, I. (2004). Structural criteria for depigmenting mechanism of arbutin. 18, 475-479.
- Hoyle, M.C. (1977). High-resolution of peroxidase-indoleacetic acid oxidase isoenzymes from horseradish by isoelectric-focusing. Plant Physiol. 60, 787-793.
- Hrobonova, K., Lehotay, J., y Cizmarik, J. (2009). Determination of Organic Acids in Propolis by HPLC Using Two Columns with an On-Line SPE System. 32, 125-135.
- Hsieh, M.M., Chen, C.Y., Hsieh, S.L., Hsieh, S.F., Ben Lee, P.H., Li, C.T., y Hsieh, T.J. (2006). Separation of phenols from the leaves of *Toona sinensis* (Meliaceae) by capillary electrophoresis. J. Chin. Chem. Soc. 53, 1203-1208.
- Hu, F., Chen, S., Wang, C., Yuan, R., Yuan, D., y Wang, C. (2012). Study on the application of reduced graphene oxide and multiwall carbon nanotubes hybrid materials for simultaneous determination of catechol, hydroquinone, p-cresol and nitrite. 724, 40-46.
- Hu, F., Deng, C., Liu, Y., y Zhang, X. (2009a). Quantitative determination of chlorogenic acid in Honeysuckle using microwave-assisted extraction followed by nano-LC-ESI mass spectrometry. 77, 1299-1303.
- Hu, J.W., Li, X.G., Cai, Y.W., y Han, H.Y. (2009b). Hybrid silica polymeric monolith-based in-tube microextraction and CE for determination of bisphenol A in beverages. 32, 2759-2766.
- Hu, M.R., Chao, Y.P., Zhang, G.Q., Xue, Z.Q., y Qian, S.J. (2009c). Laccase-mediator system in the decolorization of different types of recalcitrant dyes. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36, 45-51.
- Huang, J., Zhang, X., Lin, Q., He, X., Xing, X., Huai, H., Lian, W., y Zhu, H. (2011). Electrochemical sensor based on imprinted sol-gel and nanomaterials for sensitive determination of bisphenol A. 22, 786-791.
- Huang, S.C., Lin, C.C., Huang, M.C., y Wen, K.C. (2004). Simultaneous determination of magnesium ascorbyl phosphate, ascorbyl glucoside, kojic acid, arbutin and hydroquinone in skin whitening cosmetics by HPLC. 12, 13-18.
- Huang, W.S., Zhou, D.Z., Liu, X.P., y Zheng, X.J. (2009). Electrochemical determination of phenol using CTABfunctionalized montmorillonite electrode. 30, 701-706.
- Huang, W.Y., Li, L.J., Hu, D.C., Wu, M.Y., Gao, W.Y., Lai, Y.B., y Li, Y.Q. (2012). Separation and Determination of Salidroside, Caffeic Acid and Gallic Acid in Rhodiola L. by Large-Volume Sample Stacking-Sweeping-Micellar Electrokinetic Chromatography. Asian J. Chem. 24, 2155-2158.
- Husain, M., y Husain, Q. (2008). Applications of redox mediators in the treatment of organic pollutants by using oxidoreductive enzymes: A review. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 38, 1-42.
- Husain, Q. (2010). Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review. Rev. Environ. Sci. Bio-Technol. 9, 117-140.
- IARC (1989). IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans, some organics solvents, resin monomers and related compounds, pigments and occupational exposures in paint manufacture and painting. 47, 263-287.
- Ikeda, R., Sugita, T., Jacobson, E.S., y Shinoda, T. (2003). Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. Microbiol. Immunol. 47, 271-277.
- Inoue, K., Yoshie, Y., Kondo, S., Yoshimura, Y., y Nakazawa, H. (2002). Determination of phenolic xenoestrogens in water by liquid chromatography with coulometric-array detection. 946, 291-294.

- Isik, E., Sahin, S., Demir, C., y Turkben, C. (2011). Determination of total phenolic content of raspberry and blackberry cultivars by immobilized horseradish peroxidase bioreactor. 24, 944-949.
- Jadhav, S.U., Kalme, S.D., y Govindwar, S.P. (2008). Biodegradation of Methyl red by Galactomyces geotrichum MTCC 1360. Int. Biodeterior. Biodegrad. 62, 135-142.
- Jamal, F., Pandey, P.K., y Qidwai, T. (2010). Potential of peroxidase enzyme from Trichosanthes diocia to mediate disperse dye decolorization in conjunction with redox mediators. J. Mol. Catal. B-Enzym. 66, 177-181.
- Jamal, F., Qidwai, T., Pandey, P.K., y Singh, D. (2011a). Catalytic potential of cauliflower (Brassica oleracea) bud peroxidase in decolorization of synthetic recalcitrant dyes using redox mediator. 15, 93-98.
- Jamal, F., Qidwai, T., Pandey, P.K., Singh, R., y Singh, S. (2011b). Azo and anthraquinone dye decolorization in relation to its molecular structure using soluble Trichosanthes dioica peroxidase supplemented with redox mediator. 12, 1218-1223.
- Jamal, F., Singh, S., Qidwai, T., Pandey, P.K., y Singh, D. (2012). Optimization of internal conditions for biocatalytic dye color removal and a comparison of redox mediator's efficiency on partially purified Trichosanthes dioica peroxidase. J. Mol. Catal. B-Enzym. 74, 116-124.
- Janaki, V., Vijayaraghavan, K., Oh, B.-T., Lee, K.-J., Muthuchelian, K., Ramasamy, A.K., y Kamala-Kannan, S. (2012). Starch/polyaniline nanocomposite for enhanced removal of reactive dyes from synthetic effluent. 90, 1437-1444.
- Jiang, X., Cai, K., Zhang, J., Shen, Y., Wang, S.G., y Tian, X.Z. (2011). Synthesis of a novel water-soluble chitosan derivative for flocculated decolorization. J. Hazard. Mater. 185, 1482-1488.
- Jimenez, A., Hernandez, J.A., Barcelo, A.R., Sandalio, L.M., del Rio, L.A., y Sevilla, F. (1998). Mitochondrial and peroxisomal ascorbate peroxidase of pea leaves. *104*, 687-692.
- Jin, S., Guo, X., Zhang, Y., Li, P., He, P., Wang, Q., y Fang, Y. (2009). Determination of Bioactive Components in Polygonum perfoliatum L. by Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection. 27, 773-776.
- Johnson, M.L. (1994). Use of least-squares techniques in biochemistry (Reprinted from analytical-biochemistry, Vol 206, 1992). In Numerical Computer Methods, Pt B (San Diego, Academic Press Inc), pp. 1-22.
- Jones, D.K., Dalton, D.A., Rosell, F.I., y Raven, E.L. (1998). Class I heme peroxidases: Characterization of soybean ascorbate peroxidase. 360, 173-178.
- Juang, R.S., Tseng, R.L., Wu, F.C., y Lee, S.H. (1997). Adsorption behavior of reactive dyes from aqueous solutions on chitosan. 70, 391-399.
- Junghanns, C., Moeder, M., Krauss, G., Martin, C., y Schlosser, D. (2005). Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases. Microbiology-(UK) 151, 45-57.
- Junghanns, C., Parra, R., Keshavarz, T., y Schlosser, D. (2008). Towards higher laccase activities produced by aquatic ascomycetous fungi through combination of elicitors and an alternative substrate. Eng. Life Sci. 8, 277-285.
- Kahraman, S., Kuru, F., Dogan, D., y Yesilada, O. (2012). Removal of indigo carmine from an aqueous solution by fungus pleurotus ostreatus. 38, 51-57.
- Kalpana, D., Velmurugan, N., Shim, J.H., Oh, B.-T., Senthil, K., y Lee, Y.S. (2012). Biodecolorization and biodegradation of reactive Levafix Blue E-RA granulate dye by the white rot fungus Irpex lacteus. 111, 142-149.
- Kandelbauer, A., Kessler, W., y Kessler, R.W. (2008). Online UV-visible spectroscopy and multivariate curve resolution as powerful tool for model-free investigation of laccase-catalysed oxidation. 390, 1303-1315.
- Kang, M.J., Ha, H.W., Kim, H.G., Lee, D.H., Kong, M.J., Ahn, Y.T., Kim, D.H., Shin, B.S., Kang, W., Jeong, H.G., et al. (2011). Role of Metabolism by Intestinal Bacteria in Arbutin-induced Toxicity In Vitro. 34, 687-693.
- Kannamkumarath, S.S., Wuilloud, R.G., Jayasinghe, S., y Caruso, J.A. (2004). Fast speciation analysis of iodophenol compounds in river waters by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry with off-line solid-phase microextraction. 25, 1843-1851.
- Karacakaya, P., Kilic, N.K., Duygu, E., y Donmez, G. (2009). Stimulation of reactive dye removal by cyanobacteria in media containing triacontanol hormone. J. Hazard. Mater. 172, 1635-1639.
- Karam, J., y Nicell, J.A. (1997). Potential applications of enzymes in waste treatment. J. Chem. Technol. Biotechnol. 69, 141-153.
- Karim, F., y Fakhruddin, A.N.M. (2012). Recent advances in the development of biosensor for phenol: a review. Rev. Environ. Sci. Bio-Technol. 11, 261-274.
- Kawaguchi, M., Sakui, N., Okanouchi, N., Ito, R., Saito, K., Izumi, S.I., Makino, T., y Nakazawa, H. (2005). Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for measurement of phenolic xenoestrogens in human urine samples. 820, 49-57.
- Kawaguchi, N. (2008). Stir Bar Sorptive Extraction/Thermal Desorption/Gas Chromatography/Mass Spectrometry for Trace Analysis of Phenolic Xenoestrogens. 57, 911-912.

Kawamura, Y., Sano, H., y Yamada, T. (1999). Migration of bisphenol A from can coatings to drinks. 40, 158-165.

Kay, E., Shannon, L.M., y Lew, J.Y. (1967). Peroxidase isozymes from horseradish roots.2.Catalytic properties. J. Biol. Chem. 242, 2470-&.

- Keilin, D., Hartree, E.F., Cecil, R., y Ogston, A.G. (1951). Purification of horse-radish peroxidase and comparison of its properties with those of catalase and methaemoglobin. Biochem. J. 49, 88-106.
- Kemmere, M.F., Mayer, M.J.J., Meuldijk, J., y Drinkenburg, A.A.H. (1999). The influence of 4-tert-butylcatechol on the emulsion polymerization of styrene. J. Appl. Polym. Sci. 71, 2419-2422.
- Kim, S., Lopez, C., Guebitz, G., y Cavaco-Paulo, A. (2008). Biological coloration of flax fabrics with flavonoids using laccase from *Trametes hirsuta*. Eng. Life Sci. 8, 324-330.
- Kim, Y.H., An, E.S., Song, B.K., Kim, D.S., y Chelikani, R. (2003). Polymerization of cardanol using soybean peroxidase and its potential application as anti-biofilm coating material. 25, 1521-1524.
- Kirk, O., Borchert, T.V., y Fuglsang, C.C. (2002). Industrial enzyme applications. Curr. Opin. Biotechnol. 13, 345-351.
- Klebanoff, S.J., y Coombs, R.W. (1996). Virucidal effect of stimulated eosinophils on human immunodeficiency virus type 1. Aids Res. Hum. Retrovir. 12, 25-29.
- Klibanov, A.M., Tu, T.M., y Scott, K.P. (1983). Peroxidase-catalyzed removal of phenols from coal-conversion wastewaters. 221, 259-260.
- Ko, E.M., Leem, Y.E., y Choi, H.T. (2001). Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57, 98-102.
- Kobayashi, K., Tamura, M., Hayashi, K., Hori, H., y Morimoto, H. (1980). Electron-paramagnetic resonance and optical-absorption spectrum of the penta-coordinated ferrihemoproteins. J. Biol. Chem. 255, 2239-2242.
- Kochana, J., Gala, A., Parczewski, A., y Adamski, J. (2008). Titania sol-gel-derived tyrosinase-based amperometric biosensor for determination of phenolic compounds in water samples. Examination of interference effects. 391, 1275-1281.
- Kokol, V., Doliska, A., Eichlerova, I., Baldrian, P., y Nerud, F. (2007). Decolorization of textile dyes by whole cultures of lschnoderma resinosum and by purified laccase and Mn-peroxidase. 40, 1673-1677.
- Kong, X., He, Q., Yue, A., Wu, S., y Li, J. (2010). Determination of arbutin in apple juice concentrate by ultra performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. 28, 632-634.
- Korkut, S., Keskinler, B., y Erhan, E. (2008). An amperometric biosensor based on multiwalled carbon nanotubepoly(pyrrole)-horseradish peroxidase nanobiocomposite film for determination of phenol derivatives. 76, 1147-1152.
- Kosaka, M., Ueda, T., Yoshida, M., y Hara, I. (1991). Assessment of occupational exposure to p-tert-butylphenol in synthetic resin factories. 33, 186-195.
- Kudanga, T., Prasetyo, E.N., Sipila, J., Nousiainen, P., Widsten, P., Kandelbauer, A., Nyanhongo, G.S., y Guebitz, G. (2008). Laccase-mediated wood surface functionalization. Eng. Life Sci. 8, 297-302.
- Kurosumi, A., Kaneko, E., y Nakamura, Y. (2008). Degradation of reactive dyes by ozonation and oxalic acidassimilating bacteria isolated from soil. Biodegradation 19, 489-494.
- Kvasnicka, F., Copikova, J., Sevcik, R., Kratka, J., Syntytsia, A., y Voldrich, M. (2008). Determination of phenolic acids by capillary zone electrophoresis and HPLC. Cent. Eur. J. Chem 6, 410-418.
- Lamar, G.N., y Ropp, J.S.D. (1979). Assignment of exchangeable proximal histidine resonances in hig-spin ferric hemoproteins-Substrat binding in horseradish-peroxidase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 90, 36-41.
- Le, C., Wu, J.H., Li, P., Wang, X.D., Zhu, N.W., Wu, P.X., y Yang, B. (2011). Decolorization of anthraquinone dye Reactive Blue 19 by the combination of persulfate and zero-valent iron. Water Sci. Technol. 64, 754-759.
- Lee, H.J., y Kim, K.W. (2012). Anti-inflammatory effects of arbutin in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. Inflamm. Res. 61, 817-825.
- Lee, K.H., Wi, S.G., Singh, A.P., y Kim, Y.S. (2004). Micromorphological characteristics of decayed wood and laccase produced by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*. J. Wood Sci. 50, 281-284.
- Lee, X.P., Kumazawa, T., Saito, K., Takano, M., Hattori, H., Seno, H., Ishii, A., Watanabe-Suzuki, K., Suzuki, O., y Sato, K. (2002). Determination of cresol isomers and phenol in human body fluids by capillary gas chromatography with cryogenic oven trapping. 35, 2093-2103.
- Lee, Y.H., Matthews, R.D., y Pavlostathis, S.G. (2005). Anaerobic biodecolorization of textile reactive anthraquinone and phthalocyanine dyebaths under hypersaline conditions. 52, 377-383.
- Lee, Y.H., Matthews, R.D., y Pavlostathis, S.G. (2006). Biological decolorization of reactive anthraquinone and phthalocyanine dyes under various oxidation-reduction conditions. 78, 156-169.
- Lee, Y.H., y Pavlostathis, S.G. (2004). Decolorization and toxicity of reactive anthraquinone textile dyes under methanogenic conditions. 38, 1838-1852.
- Leidi, E.O., Gomez, M., y Delaguardia, M.D. (1987). Soybean genetic-differences in response to Fe an Mn-activity of metalloenzymes. Plant Soil 99, 139-146.
- Leite, O.D., Fatibello, O., y Barbosa, A.D. (2003). Determination of catecholamines in pharmaceutical formulations

using a biosensor modified with a crude extract of fungi laccase (*Pleurotus ostreatus*). J. Braz. Chem. Soc. 14, 297-303.

- Leontievsky, A.A., Vares, T., Lankinen, P., Shergill, J.K., Pozdnyakova, N.N., Myasoedova, N.M., Kalkkinen, N., Golovleva, L.A., Cammack, R., Thurston, C.F., et al. (1997). Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi. FEMS Microbiol. Lett. 156, 9-14.
- Levin, L., Diorio, L., Grassi, E., y Forchiassin, F. (2012). Grape stalks as substrate for white rot fungi, lignocellulolytic enzyme production and dye decolorization. 44, 105-112.
- Levin, L., Melignani, E., y Ramos, A.M. (2010). Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. Bioresour. Technol. 101, 4554-4563.
- Levin, L., Viale, A., y Forchiassin, A. (2003). Degradation of organic pollutants by the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. Int. Biodeterior. Biodegrad. 52, 1-5.
- Li, G.R., Tan, G.H., Liu, Y.F., Wang, Y.S., y Liao, L.F. (2009a). A Catalytic Resonance Fluorometry Method for Determination of Hydroguinone and Its Applications. 25, 493-497.
- Li, H.Y., y Poulos, T.L. (1994). Structural variation in heme enzymes-A comparative-analysis of peroxidase and P450 crystal-structures. Structure 2, 461-464.
- Li, L.-J., Cai, Z., Li, S.-G., Wu, F.-M., Li, H.-Y., Cheng, C.-D., Cheng, H., y Wu, J.-L. (2008). Determination of Three Organic Acids in Rhizoma Cimicifugae Foetidae by Capillary Electrophoresis Using Field-Amplified Sample Stacking and Sweeping Micellar Electrokinetic Chromatographic Technique. 36, 1261-1264.
- Li, L., Lu, Y., Ding, Y., Cheng, Y., Xu, W., y Zhang, F. (2012a). Determination of Paracetamol Based on its Quenching Effect on the Photoluminescence of CdTe Fluorescence Probes. 22, 591-596.
- Li, M., Wang, H., Wu, S., Li, F., y Zhi, P. (2012b). Adsorption of hazardous dyes indigo carmine and acid red on nanofiber membranes. 2, 900-907.
- Li, M.G., Ni, F., Wang, Y.L., Xu, S.D., Zhang, D.D., Chen, S.H., y Wang, L. (2009b). Sensitive and Facile Determination of Catechol and Hydroquinone Simultaneously Under Coexistence of Resorcinol with a Zn/Al Layered Double Hydroxide Film Modified Glassy Carbon Electrode. 12, 1521-1526.
- Li, N., Xue, M.H., Yao, H., y Zhu, J.J. (2005). Reagentless biosensor for phenolic compounds based on tyrosinase entrapped within gelatine film. 383, 1127-1132.
- Li, X., Jia, R., Li, P., y Ang, S. (2009c). Response surface analysis for enzymatic decolorization of Congo red by manganese peroxidase. 56, 1-6.
- Li, Y.-Y., Song, Y.-Y., Liu, C.-H., Huang, X.-T., Zheng, X., Li, N., Xu, M.-L., Mi, S.-Q., y Wang, N.-S. (2012c). Simultaneous determination of esculin and its metabolite esculetin in rat plasma by LC-ESI-MS/MS and its application in pharmacokinetic study. 907, 27-33.
- Li, Y.J., Gu, Y.Q., Hao, J.G., Zhang, Z.W., Fang, X.L., y Sha, X.Y. (2009d). Establishment of an LC-Based Assay to Determine Caffeic Acid Tetramer in Rat Plasma and Its Application to a Pharmacokinetic Study. Chromatographia 70, 653-655.
- Li, Z.C., Chi, L.Z., Zhu, J.K., Zhang, Y.Y., Wang, Q.J., He, P.G., y Fang, Y.Z. (2011). Simultaneous determination of active ingredients in blueberry wine by CE-AD. Chin. Chem. Lett. 22, 1237-1240.
- Liang, Y., Cao, W., Chen, W.-j., Xiao, X.-h., y Zheng, J.-b. (2009). Simultaneous determination of four phenolic components in citrus honey by high performance liquid chromatography using electrochemical detection. 114, 1537-1541.
- Liao, M.H., Chen, W.C., y Lai, W.C. (2006). Magnetic nanoparticles assisted low-molecular-weight polyethyleneimine for fast and effective removal of reactive blue 19. Fresenius Environ. Bull. 15, 609-613.
- Limongi, P., Kjalke, M., Vind, J., Tams, J.W., Johansson, T., y Welinder, K.G. (1995). Disulfide bonds and glycosylation in fugal peroxidases. Eur. J. Biochem. 227, 270-276.
- Lin, C.H., Wu, H.L., y Huang, Y.L. (2005). Microdialysis sampling coupled to on-line high-performance liquid chromatography for determination of arbutin in whitening cosmetics. 829, 149-152.
- Liu, A.-L., Wang, K., Chen, W., Gao, F., Cai, Y.-S., Lin, X.-H., Chen, Y.-Z., y Xia, X.-H. (2012). Simultaneous and sensitive voltammetric determination of acetaminophen and its degradation product for pharmaceutical quality control and pharmacokinetic research by using ultrathin poly (calconcarboxylic acid) film modified glassy carbon electrode. 63, 161-168.
- Liu, Q., Cai, W., y Shao, X. (2008). Determination of seven polyphenols in water by high performance liquid chromatography combined with preconcentration. 77, 679-683.
- Liu, Q., Zhang, Y.-J., Yang, C.-R., y Xu, M. (2009a). Phenolic Antioxidants from Green Tea Produced from Camellia crassicolumna Var. multiplex. 57, 586-590.
- Liu, S., Ju, W., Xia, X., Liu, Z., Tan, H., y Xiong, N. (2009b). Sensitive and Selective LC-ESI-MS Analysis of Aesculin in Rat Plasma. 70, 1121-1126.

- Liu, X., Luo, L., Ding, Y., y Xu, Y. (2011a). Amperometric biosensors based on alumina nanoparticles-chitosanhorseradish peroxidase nanobiocomposites for the determination of phenolic compounds. 136, 696-701.
- Liu, Y., Huang, J., y Zhang, X. (2009c). Decolorization and biodegradation of remazol brilliant blue R by bilirubin oxidase. *108*, 496-500.
- Liu, Y.H., Ye, M., Lu, Y., Zhang, X., y Li, G. (2011b). Improving the decolorization for textile dyes of a metagenomederived alkaline laccase by directed evolution. 91, 667-675.
- Liu, Y.X., Huang, J., y Zhang, X.Y. (2009d). Decolorization and biodegradation of remazol brilliant blue R by bilirubin oxidase. J. Biosci. Bioeng. 108, 496-500.
- Lopez-Darias, J., German-Hernandez, M., Pino, V., y Afonso, A.M. (2010). Dispersive liquid-liquid microextraction versus single-drop microextraction for the determination of several endocrine-disrupting phenols from seawaters. Talanta 80, 1611-1618.
- Lopez, M.J., Guisado, G., Vargas-Garcia, M.C., Suarez-Estrella, F., y Moreno, J. (2006). Decolorization of industrial dyes by ligninolytic microorganisms isolated from composting environment. Enzyme Microb. Technol. 40, 42-45.
- Lorenzo, M., Moldes, D., y Sanroman, M.A. (2006). Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by Trametes versicolor and on their ability to decolourise dyes. Chemosphere 63, 912-917.
- Lorenzo, M., Rodriguez Couto, S., y Sanroman, M.A. (2007). Enhanced production of laccase by Trametes versicolor: Effect on dye decolourisation. 64, 25-30.
- Lu, C., Li, J., Yang, Y., y Lin, J.-M. (2010). Determination of bisphenol A based on chemiluminescence from gold(III)peroxymonocarbonate. 82, 1576-1580.
- Lu, L., Zhao, M., Wang, T.N., Zhao, L.Y., Du, M.H., Li, T.L., y Li, D.B. (2012). Characterization and dye decolorization ability of an alkaline resistant and organic solvents tolerant laccase from Bacillus licheniformis LS04. Bioresour. Technol. 115, 35-40.
- Lu, Y.H., Song, W., Liang, X.H., Wei, D.Z., y Zhou, X.L. (2009). Chemical Fingerprint and Quantitative Analysis of Cirsium setosum by LC. Chromatographia 70, 125-131.
- Luis, P., Walther, G., Kellner, H., Martin, F., y Buscot, F. (2004). Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil. Soil Biol. Biochem. 36, 1025-1036.
- Ma, H.L., Kermasha, S., Gao, J.M., Borges, R.M., y Yu, X.Z. (2009). Laccase-catalyzed oxidation of phenolic compounds in organic media. J. Mol. Catal. B-Enzym. 57, 89-95.
- Ma, Y.-C., Wang, X.-Q., Hou, F., Ma, J., Luo, M., Lu, S., Jin, P., Chen, A., Xu, I., Patel, A.V., et al. (2011). Simultaneous quantification of polyherbal formulations containing *Rhodiola rosea* L. and *Eleutherococcus* senticosus Maxim. using rapid resolution liquid chromatography (RRLC). 55, 908-915.
- Maddipati, K.R., y Marnett, L.J. (1987). Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of humanplasma-Purification and properties of a Selenium-dependent glutathione-peroxidase. 262, 17398-17403.
- Mader, M., Ungemach, J., y Schloss, P. (1980). Role of peroxidase isoenzyme groups of nicotiana-tabacum in hydrogen-peroxide formation. Planta 147, 467-470.

Madhavi, V., y Lele, S.S. (2009). Laccase: properties and applications. BioResources 4, 1694-1717.

- Madrakian, T., Afkhami, A., y Mohammadnejad, M. (2009). Second-order advantage applied to simultaneous spectrofluorimetric determination of paracetamol and mefenamic acid in urine samples. 645, 25-29.
- Mandal, S.S., y Bhattacharyya, A.J. (2010). Titania nanowires as substrates for sensing and photocatalysis of common textile industry effluents. Talanta 82, 876-884.
- Marcano (1990). Introducción a la Química de los colorantes (Caracas, Editorial Reverte).
- Marquardt, D.W. (1963). An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. J.Soc.Ind.Appl.Math 11, 431-441.
- Martinez-de la Cruz, A., Hernandez-Uresti, D.B., Torres-Martinez, L.M., y Lee, S.W. (2012). Photocatalytic properties of PbMoO4 synthesized by a hydrothermal reaction. 107, 467-475.
- Martinez, A.T. (2002). Molecular biology and structure-function of lignin- degrading heme peroxidases. 30, 425-444.
- Mauk, M.R., y Girotti, A.W. (1974). Protoporphyrin-apoperoxidase complex-photooxidation studies. Biochemistry 13, 1757-1763.
- Mayer, A.M., y Staples, R.C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. Phytochemistry 60, 551-565.
- Mazloum-Ardakani, M., Sheikh-Mohseni, M.A., Abdollahi-Alibeik, M., y Benvidi, A. (2012). Electrochemical sensor for simultaneous determination of norepinephrine, paracetamol and folic acid by a nanostructured mesoporous material. Sens. Actuator B-Chem. 171, 380-386.
- McCrory, D.F., y Hobbs, P.J. (2001). Additives to reduce ammonia and odor emissions from livestock wastes: A review. 30, 345-355.
- Mehrali, S., Moghaddam, M.R.A., y Hashemi, S.H. (2010). Removal of reactive blue 19 by adding polyaluminum chloride to sequencing batch reactor system. Iran. J. Environ. Health Sci. Eng. 7, 63-70.
- Mei, S., Wu, D., Jiang, M., Lu, B., Lim, J.-M., Zhou, Y.-K., y Lee, Y.-I. (2011). Determination of trace bisphenol A in

complex samples using selective molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with capillary electrophoresis. *98*, 150-155.

- Mendoza, L., Jonstrup, M., Hatti-Kaul, R., y Mattiasson, B. (2011). Azo dye decolorization by a laccase/mediator system in a membrane reactor: Enzyme and mediator reusability. Enzyme Microb. Technol. 49, 478-484.
- Meyer, M.R., Welter, J., Weber, A.A., y Maurer, H.H. (2011). Development, Validation, and Application of a Fast and Simple GC-MS Method for Determination of Some Therapeutic Drugs Relevant in Emergency Toxicology. 33, 649-653.
- Miao, J.Z., Xue, M., y Zhang, H. (2009). Analysis of Residual Bisphenol A, Bisphenol F and Their Epoxy Derivatives in Food Cans Coating by High Performance Liquid Chromatography. 37, 911-914.
- Michizoe, J., Goto, M., y Furusaki, S. (2001). Catalytic activity of laccase hosted in reversed micelles. J. Biosci. Bioeng. 92, 67-71.
- Michniewicz, A., Ledakowicz, S., Ullrich, R., y Hofrichter, M. (2008). Kinetics of the enzymatic decolorization of textile dyes by laccase from Cerrena unicolor. Dyes Pigment. 77, 295-302.
- Miland, E., Smyth, M.R., y Fagain, C.O. (1996). Phenol removal by modified peroxidases. J. Chem. Technol. Biotechnol. 67, 227-236.
- Minussi, R.C., Pastore, G.M., y Duran, N. (2002). Potential applications of laccase in the food industry. Trends Food Sci. Technol. 13, 205-216.
- Mishra, A., Kumar, S., y Pandey, A.K. (2011). Laccase production and simultaneous decolorization of synthetic dyes in unique inexpensive medium by new isolates of white rot fungus. *65*, 487-493.
- Mittler, R., y Zilinskas, B.A. (1991). Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. 97, 962-968.
- Miyake, C., Shinzaki, Y., Nishioka, M., Horiguchi, S., y Tomizawa, K.I. (2006). Photoinactivation of ascorbate peroxidase in isolated tobacco chloroplasts: Galdieria partita APX maintains the electron flux through the waterwater cycle in transplastomic tobacco plants. Plant Cell Physiol. 47, 200-210.
- Moccelini, S.K., Spinelli, A., y Vieira, I.C. (2008). Biosensors based on bean sprout homogenate immobilized in chitosan microspheres and silica for determination of chlorogenic acid. 43, 381-387.
- Mohan, S.V., Prasad, K.K., Rao, N.C., y Sarma, P.N. (2005). Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process. Chemosphere 58, 1097-1105.
- Mohorcic, M., Teodorovic, S., Golob, V., y Friedrich, J. (2006). Fungal and enzymatic decolourisation of artificial textile dye baths. 63, 1709-1717.
- Moilanen, U., Osma, J.F., Winquist, E., Leisola, M., y Couto, S.R. (2010). Decolorization of simulated textile dye baths by crude laccases from Trametes hirsuta and Cerrena unicolor. Eng. Life Sci. 10, 242-247.
- Moldes, D., Diaz, M., Tzanov, T., y Vidal, T. (2008). Comparative study of the efficiency of synthetic and natural mediators in laccase-assisted bleaching of eucalyptus kraft pulp. Bioresour. Technol. 99, 7959-7965.
- Montanaro, D., y Petrucci, E. (2009). Electrochemical treatment of Remazol Brilliant Blue on a boron-doped diamond electrode. Chem. Eng. J. 153, 138-144.
- Montero-Ocampo, C., Gago, A., Abadias, G., Gombert, B., y Alonso-Vante, N. (2012). In situ photoelectrochemical/photocatalytic study of a dye discoloration in a microreactor system using TiO2 thin films. 19, 3751-3762.
- Moreira Neto, S.L., Matheus, D.R., y Gomes Machado, K.M. (2009). Influence of pH on the Growth, Laccase Activity and RBBR Decolorization by Tropical Basidiomycetes. 52, 1075-1082.
- Morimoto, K., Koizumi, A., Tachibana, Y., y Dobashi, Y. (1976). Inhibition of repair of radiation-induced chromosome breaks. Effect of phenol in cultured human leukocytes. 18, 478-479.
- Morita, Y., Yamashita, H., Mikami, B., Iwamoto, H., Aibara, S., Terada, M., y Minami, J. (1988). Purification, crystallization, and characterization of peroxidase from *coprinus-cinereus*. *103*, 693-699.
- Morozova, V., Shumakovich, G.P., Gorbacheva, M.A., Shleev, S.V., y Yaropolov, A.I. (2007). "Blue" laccases. Biochem.-Moscow 72, 1136-1150.
- Motulsky, H., y Christopoulos, A. (2004). Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting (Oxford, Oxford University Press).
- Moussavi, G., y Mahmoudi, M. (2009). Removal of azo and anthraquinone reactive dyes from industrial wastewaters using MgO nanoparticles. J. Hazard. Mater. 168, 806-812.
- Moya, R., Hernandez, M., Garcia-Martin, A.B., Ball, A.S., y Arias, M.E. (2010). Contributions to a better comprehension of redox-mediated decolouration and detoxification of azo dyes by a laccase produced by Streptomyces cyaneus CECT 3335. Bioresour. Technol. 101, 2224-2229.
- Mukai, M., Nagano, S., Tanaka, M., Ishimori, K., Morishima, I., Ogura, T., Watanabe, Y., y Kitagawa, T. (1997). Effects of concerted hydrogen bonding of distal histidine on active site structures of horseradish peroxidase. Resonance Raman studies with Asn70 mutants. J. Am. Chem. Soc. *119*, 1758-1766.
Mukimin, A., Wijaya, K., y Kuncaka, A. (2012). Oxidation of remazol brilliant blue r (RB.19) with in situ electrogenerated active chlorine using Ti/Pbo(2) electrode. Sep. Purif. Technol. 95, 1-9.

- Mulazimoglu, I.E., y Yilmaz, E. (2010). Quantitative determination of phenol in natural decayed leaves using procaine modified carbon paste electrode surface by cyclic voltammetry. 256, 64-69.
- Muralidharan, B., Gopu, G., Vedhi, C., y Manisankar, P. (2009). Determination of analgesics in pharmaceutical formulations and urine samples using nano polypyrrole modified glassy carbon electrode. *39*, 1177-1184.
- Murugesan, K., Dhamija, A., Nam, I.H., Kim, Y.M., y Chang, Y.S. (2007). Decolourization of reactive black 5 by laccase: Optimization by response surface methodology. Dyes Pigment. 75, 176-184.
- Murugesan, K., Kim, Y.M., Jeon, J.R., y Chang, Y.S. (2009). Effect of metal ions on reactive dye decolorization by laccase from Ganoderma lucidum. J. Hazard. Mater. 168, 523-529.
- Mustafa, R., Muniglia, L., Rovel, B., y Girardin, M. (2005). Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydro-organic biphasic system. Food Res. Int. 38, 995-1000.
- Nagano, S., Tanaka, M., Ishimori, K., Watanabe, Y., y Morishima, I. (1996). Catalytic roles of the distal site asparagine-histidine couple in peroxidases. Biochemistry 35, 14251-14258.
- Nakamoto, S., y Machida, N. (1992). Phenol removal from aqueous-solutions by peroxidase-catalyzed reaction using additives. Water Res. 26, 49-54.
- Nakamura, K., y Go, N. (2005). Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. Cell. Mol. Life Sci. 62, 2050-2066.
- Ngo, T.T. (2010). Peroxidase in chemical and biochemical analysis. 43, 1572-1587.
- Ni, Y., Xia, Z., y Kokot, S. (2011). A kinetic spectrophotometric method for simultaneous determination of phenol and its three derivatives with the aid of artificial neural network. 192, 722-729.
- Nicell, J.A., Bewtra, J.K., Biswas, N., y Taylor, E. (1993). Reactor development for peroxidase-catalyzed polymerization and precipitation of phenols from waste-water. Water Res. 27, 1629-1639.
- Nicell, J.A., Saadi, K.W., y Buchanan, I.D. (1995). Phenol polymerization and precipitation by horseradish peroxidase enzyme and an additive. BIORESOURCE TECHNOL 54, 5-16.
- Nicell, J.A., y Wright, H. (1997). A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide. Enzyme Microb. Technol. 21, 302-310.
- Nicholson, S.K., Tucker, G.A., y Brarneld, J.M. (2008). Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells. 67, 42-47.
- Odaci, D., Timur, S., Pazarlioglu, N., Kirgoz, U.A., y Telefoncu, A. (2006). Effects of mediators on the laccase biosensor response in paracetamol detection. 45, 23-28.
- Ogura, T., Watabe, Y., Fujita, T., Kubo, T., Hosoya, K., y Kaya, K. (2009). Automated Pre-Treatment Technique for the Determination of Bisphenol A and 17 beta-Estradiol in River Water by Multi-Valve Column Switching LC/MS. 58, 293-299.
- Oh, Y.-K., Seol, E.-H., Park, S., y Park, S. (2011). Decolorization of synthetic dyes by Citrobacter amalonaticus Y19. 42, 492-497.
- Olea, N., Pulgar, R., Perez, P., OleaSerrano, F., Rivas, A., NovilloFertrell, A., Pedraza, V., Soto, A.M., y Sonnenschein, C. (1996). Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. 104, 298-305.
- Ong, S.-T., Keng, P.-S., Lee, W.-N., Ha, S.-T., y Hung, Y.-T. (2011). Dye Waste Treatment. 3, 157-176.
- Orejuela, E., y Silva, M. (2002). Sensitive determination of low molecular mass phenols by liquid chromatography with chemiluminescence detection for the determination of phenol and 4-methylphenol in urine. *127*, 1433-1439.
- Orozco-Solano, M.I., Ferreiro-Vera, C., Priego-Capote, F., y de Castro, M.D.L. (2012). Automated method for determination of olive oil phenols and metabolites in human plasma and application in intervention studies. J. Chromatogr. A 1258, 108-116.
- Osma, J.F., Toca-Herrera, J.L., y Rodriguez-Couto, S. (2010). Transformation pathway of Remazol Brilliant Blue R by immobilised laccase. Bioresour. Technol. 101, 8509-8514.
- Ostergaard, L., Abelskov, A.K., Mattsson, O., y Welinder, K.G. (1996). Structure and organ specificity of an anionic peroxidase from Arabidopsis thaliana cell suspension culture. 398, 243-247.
- Ozcan, A., Omeroglu, C., Erdogan, Y., y Ozcan, A.S. (2007). Modification of bentonite with a cationic surfactant: An adsorption study of textile dye Reactive Blue 19. 140, 173-179.
- Palmieri, G., Cennamo, G., Faraco, V., Amoresano, A., Sannia, G., y Giardina, P. (2003). Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. Enzyme Microb. Technol. 33, 220-230.
- Palmieri, G., Cennamo, G., y Sannia, G. (2005a). Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus Pleurotus ostreatus and its oxidative enzymatic system. 36, 17-24.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A., y Sannia, G. (1997). A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. J. Biol. Chem. 272, 31301-31307.
- Palmieri, G., Giardina, P., y Sannia, G. (2005b). Laccase-mediated Remazol Brilliant Blue R decolorization in a fixed-

bed bioreactor. Biotechnol. Prog. 21, 1436-1441.

- Parent, J.G., Hogue, R., y Asselin, A. (1985). Glycoproteins, enzymatic activities, and B-proteins in intercellular fluid extracts from hypersensitive nicotiana species infected with tobacco mosaic-virus. Can. J. Bot.-Rev. Can. Bot. 63, 928-931.
- Parsa, J.B., y Abbasi, M. (2012). Application of in situ electrochemically generated ozone for degradation of anthraquninone dye Reactive Blue 19. J. Appl. Electrochem. 42, 435-442.

Paul, K.G. (1958). Die isolierung von meerrettichperoxydase. Acta Chem. Scand. 12, 1312-1318.

- Pavko, A., y Novotny, C. (2008). Induction of Ligninolytic Enzyme Production by *Dichomitus squalens* on Various Types of Immobilization Support. 55, 648-652.
- Pazarlioglu, N.K., Urek, R.O., y Ergun, F. (2005). Biodecolourization of Direct Blue 15 by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. Process Biochem. 40, 1923-1929.
- Peica, N., y Kiefer, W. (2008). Characterization of indigo carmine with surface-enhanced resonance Raman spectroscopy (SERRS) using silver colloids and island films, and theoretical calculations. J. Raman Spectrosc. 39, 47-60.

Penel, C., Gaspar, T.H., y Greppin, H. (1992). Plant peroxidases.

- Peng, J.F., Liu, J.F., Hu, X.L., y Jiang, G.B. (2007). Direct determination of chlorophenols in environmental water samples by hollow fiber supported ionic liquid membrane extraction coupled with high-performance liquid chromatography. 1139, 165-170.
- Pennerhahn, J.E., Eble, K.S., McMurry, T.J., Renner, M., Balch, A.L., Groves, J.T., Dawson, J.H., y Hodgson, K.O. (1986). Structural characterization of horseradish-peroxidase using exafs spectroscopy-evidence for Fe=O ligation in compound-I and compound-II. J. Am. Chem. Soc. 108, 7819-7825.
- Peretz, S., Florea-Spiroiu, M., Anghel, D.F., Bala, D., Branzoi, F., y Moreno, J.C. (2012). Chitosan/anionic surfactant microparticles synthesized by high pressure spraying method for removal of phenolic pollutants. Cent. Eur. J. Chem 10, 1969-1979.
- Perez-Alonso, F.J., Agui, L., Yanez-Sedeno, P., y Pingarron, J.M. (2000). Determination of styrene and styrene additives using cylindrical microelectrodes in acetone. 125, 2006-2010.
- Petersen, J.F.W., Tams, J.W., Vind, J., Svensson, A., Dalboge, H., Welinder, K.G., y Larsen, S. (1993). Crystallization and X-Ray diffraction analysis of recombinant *coprinus-cinereus* peroxidase. 232, 989-991.
- Pineiro, Z., Cantos-Villar, E., Palma, M., y Puertas, B. (2011). Direct Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Quantification of Hydroxytyrosol and Tyrosol in Red Wines. 59, 11683-11689.
- Pinto, I.S.X., Pacheco, P.H.V.V., Coelho, J.V., Lorencon, E., Ardisson, J.D., Fabris, J.D., de Souza, P.P., Krambrock, K.W.H., Oliveira, L.C.A., y Pereira, M.C. (2012). Nanostructured delta-FeOOH: An efficient Fenton-like catalyst for the oxidation of organics in water. 119, 175-182.
- Piontek, K., Antorini, M., y Choinowski, T. (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-angstrom resolution containing a full complement of coppers. J. Biol. Chem. 277, 37663-37669.
- Pirgalioglu, S., y Ozbelge, T.A. (2009). Comparison of non-catalytic and catalytic ozonation processes of three different aqueous single dye solutions with respect to powder copper sulfide catalyst. Appl. Catal. A-Gen. 363, 157-163.
- Pistonesi, M.F., Di Nezio, M.S., Centurion, M.E., Lista, A.G., Fragoso, W.D., Pontes, M.J.C., Araujo, M.C.U., y Fernandez Band, B.S. (2010). Simultaneous determination of hydroquinone, resorcinol, phenol, m-cresol and pcresol in untreated air samples using spectrofluorimetry and a custom multiple linear regression-successive projection algorithm. 83, 320-323.
- Pocedic, J., Hasal, P., y Novotny, C. (2009). Decolorization of organic dyes by *Irpex lacteus* in a laboratory tricklebed biofilter using various mycelium supports. 84, 1031-1042.
- Podgornik, H., Poljansek, I., y Perdih, A. (2001). Transformation of Indigo carmine by *Phanerochaete chrysosporium* ligninolytic enzymes. Enzyme Microb. Technol. 29, 166-172.
- Polisetti, S., Deshpande, P.A., y Madras, G. (2011). Photocatalytic Activity of Combustion Synthesized ZrO<sub>2</sub> and ZrO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> Mixed Oxides. Ind. Eng. Chem. Res. 50, 12915-12924.
- Pop, A., Manea, F., Radovan, C., Malchev, P., Bebeselea, A., Proca, C., Burtica, G., Picken, S., y Schoonman, J. (2008). Amperometric Detection of 4-Chlorophenol on Two Types of Expanded Graphite Based Composite Electrodes. 20, 2460-2466.
- Portaccio, M., Di Tuoro, D., Arduini, F., Lepore, M., Mita, D.G., Diano, N., Mita, L., y Moscone, D. (2010). A thioninemodified carbon paste amperometric biosensor for catechol and bisphenol A determination. 25, 2003-2008.

Poulos, T.L. (2010). Thirty years of heme peroxidase structural biology. 500, 3-12.

Poulos, T.L., Edwards, S.L., Wariishi, H., y Gold, M.H. (1993). Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Angstrom. 268, 4429-4440.

Poulos, T.L., y Kraut, J. (1980). The stereochemistry of peroxidase catalysis. 255, 8199-8205.

- Poulos, T.L., Patterson, W.R., y Sundaramoorthy, M. (1995). The crystal structure of ascorbate and manganese peroxidases. The role of nonheme metal in the catalytic mechanism. Biochem. Soc. Trans. 23, 228-232.
- Qu, W., Breksa, A.P., III, Pan, Z., y Ma, H. (2012). Quantitative determination of major polyphenol constituents in pomegranate products. 132, 1585-1591.
- Qu, Y., Xue, T., Zhong, X., Lin, Y.-C., Liao, L., Choi, J., y Duan, X. (2010). Heterointegration of Pt/Si/Ag Nanowire Photodiodes and Their Photocatalytic Properties. 20, 3005-3011.
- Quintana, M.C., Iglesias, V., da Silva, M.P., Hernandez, M., y Hernandez, L. (2006). HPLC-UV-EC determination of brominated organic compounds in water. 29, 87-98.
- Rajkumar, D., Song, B.J., y Kim, J.G. (2007). Electrochemical degradation of Reactive Blue 19 in chloride medium for the treatment of textile dyeing wastewater with identification of intermediate compounds. Dyes Pigment. 72, 1-7.
- Ramsay, J.A., Mok, W.H.W., Luu, Y.S., y Savage, M. (2005). Decoloration of textile dyes by alginate-immobilized Trametes versicolor. *61*, 956-964.
- Ramya, M., Anusha, B., y Kalavathy, S. (2008). Decolorization and biodegradation of Indigo carmine by a textile soil isolate *Paenibacillus* larvae. Biodegradation 19, 283-291.
- Regev, L., Wu, M., Zlotolow, R., y Brautbar, N. (2012). Hydroquinone, a benzene metabolite, and leukemia: A case report and review of the literature. Toxicol. Ind. Health 28, 64-73.
- Rezaee, A., Ghaneian, M.T., Khavanin, A., Hashemian, S.J., Moussavi, G., Ghanizadeh, G., y Hajizadeh, E. (2008). Photochemical oxidation of Reactive blue 19 dye (RB19) in textile wastewater by UV/K(2)S(2)O(8) process. 5, 95-100.
- Rezaee, A., Ghaneian, M.T., Taghavinia, N., Aminian, M.K., y Hashemian, S.J. (2009). TiO<sub>2</sub> nanofibre assisted photocatalytic degradation of Reactive Blue 19 dye from aqueous solution. Environ. Technol. *30*, 233-239.
- Riedel, K., Hensel, J., Rothe, S., Neumann, B., y Scheller, F. (1993). Microbial sensors for determination of aromatics and their chloroderivatives. 2. Determination of chlorinated phenols using a rhodococcus-containing biosensor. 38, 556-559.
- Riva, S. (2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. Trends Biotechnol. 24, 219-226.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., y Nigam, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. Bioresour. Technol. 77, 247-255.
- Rodriguez-Gutierrez, G., Wood, S., Fernandez-Bolanos Guzman, J., Duthie, G.G., y de Roos, B. (2011). Determination of 3,4-dihydroxyphenylglycol, hydroxytyrosol and tyrosol purified from olive oil by-products with HPLC in animal plasma and tissues. *126*, 1948-1952.
- Rodriguez-Lopez, J.N., Gilabert, M.A., Tudela, J., Thorneley, R.N.F., y Garcia-Canovas, F. (2000). Reactivity of horseradish peroxidase compound II toward substrates: Kinetic evidence for a two-step mechanism. 39, 13201-13209.
- Rodriguez, A., Falcon, M.A., Carnicero, A., Perestelo, F., DelaFuente, G., y Trojanowski, J. (1996). Laccase activities of *Penicillium chrysogenum* in relation to lignin degradation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45, 399-403.
- Rodriguez Couto, S., y Toca Herrera, J.L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. 24, 500-513.
- RodriguezLopez, J.N., Smith, A.T., y Thorneley, R.N.F. (1996a). Recombinant horseradish peroxidase isoenzyme C: The effect of distal haem cavity mutations (His42->Leu and Arg38->Leu) on compound I formation and substrate binding. J. Biol. Inorg. Chem. 1, 136-142.
- RodriguezLopez, J.N., Smith, A.T., y Thorneley, R.N.F. (1996b). Role of Arginine 38 in horseradish peroxidase a critical, residue for substrate binding and catalysis. J. Biol. Chem. 271, 4023-4030.
- Rosen, H., Klebanoff, S.J., Wang, Y., Brot, N., Heinecke, J.W., y Fu, X.Y. (2009). Methionine oxidation contributes to bacterial killing by the myeloperoxidase system of neutrophils. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 18686-18691.
- Ross, E.J.H., Kramer, S.B., y Dalton, D.A. (1999). Effectiveness of ascorbate and ascorbate peroxidase in promoting nitrogen fixation in model systems. Phytochemistry 52, 1203-1210.
- Ruan, M., Li, Y., Li, X., Luo, J., y Kong, L. (2012). Qualitative and quantitative analysis of the major constituents in Chinese medicinal preparation Guan-Xin-Ning injection by HPLC-DAD-ESI-MSn. 59, 184-189.
- Ruiz-Duenas, F.J., Camarero, S., Perez-Boada, M., Martinez, M.J., y Martinez, A.T. (2001). A new versatile peroxidase from Pleurotus. Biochem. Soc. Trans. 29, 116-122.
- Ruiz-Duenas, F.J., Morales, M., Perez-Boada, M., Choinowski, T., Martinez, M.J., Piontek, K., y Martinez, A.T. (2007). Manganese oxidation site in Pleurotus eryngii versatile peroxidase: A site-directed mutagenesis, kinetic, and crystallographic study. Biochemistry 46, 66-77.
- Ruzgas, T., Csoregi, E., Katakis, I., Kenausis, G., y Gorton, L. (1996). Preliminary investigations of an amperometric oligosaccharide dehydrogenase-based electrode for the detection of glucose and some other low molecular weight saccharides. 9, 480-484.

- Ryan, B.J., Carolan, N., y O'Fagain, C. (2006). Horseradish and soybean peroxidases: comparable tools for alternative niches? Trends Biotechnol. 24, 355-363.
- Sadecka, J., y Tothova, J. (2012). Spectrofluorimetric determination of ellagic acid in brandy. Food Chem. 135, 893-897.
- Sadettin, S., y Donmez, G. (2007). Simultaneous bioaccumulation of reactive dye and chromium(VI) by using thermophil *Phormidium sp.* 41, 175-180.
- Sahin, S., Demir, C., y Malyer, H. (2011). Determination of phenolic compounds in Prunella L. by liquid chromatography-diode array detection. 55, 1227-1230.
- Saleem, A., Walshe-Roussel, B., Harris, C., Asim, M., Tamayo, C., Sit, S., y Arnason, J.T. (2009). Characterisation of Phenolics in Flor-Essence (R)-a Compound Herbal product and its Contributing Herbs. Phytochem. Anal. 20, 395-401.
- Salgueiro-Gonzalez, N., Concha-Grana, E., Turnes-Carou, I., Muniategui-Lorenzo, S., Lopez-Mahia, P., y Prada-Rodriguez, D. (2012). Determination of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples by dispersive liquidliquid microextraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for compliance with environmental quality standards (Directive 2008/105/EC). J. Chromatogr. A 1223, 1-8.
- Salleh, M.A.M., Mahmoud, D.K., Karim, W., y Idris, A. (2011). Cationic and anionic dye adsorption by agricultural solid wastes: A comprehensive review. Desalination 280, 1-13.
- Sanchez Martinez, D., Martinez-de la Cruz, A., y Lopez Cuellar, E. (2011). Photocatalytic properties of WO<sub>3</sub> nanoparticles obtained by precipitation in presence of urea as complexing agent. 398, 179-186.
- Santos, A., Yustos, P., Quintanilla, A., Rodriguez, S., y Garcia-Ochoa, F. (2002). Route of the catalytic oxidation of phenol in aqueous phase. Appl. Catal. B-Environ. 39, 97-113.
- Sarafraz-Yazdi, A., Mofazzeli, F., y Es'haghi, Z. (2010). Determination of chlorophenols in environmental water samples using directly suspended droplet liquid-liquid-liquid phase microextraction prior to high-performance liquid chromatography. 90, 1108-1118.
- Sarwan, B., Pare, B., Acharya, A.D., y Jonnalagadda, S.B. (2012). Mineralization and toxicity reduction of textile dye neutral red in aqueous phase using BiOCI photocatalysis. *116*, 48-55.
- Sathishkumar, P., Arulkumar, M., y Palvannan, T. (2012). Utilization of agro-industrial waste *Jatropha curcas* pods as an activated carbon for the adsorption of reactive dye Remazol Brilliant Blue R (RBBR). J. Clean Prod. 22, 67-75.
- Satterlee, J.D., Erman, J.E., y Deropp, J.S. (1987). Proton hyperfine resonance assgnments in cyanide-ligated cytochrome-C peroxidase using the nuclear overhauser effect. 262, 11578-11583.
- Satterlee, J.D., Erman, J.E., Lamar, G.N., Smith, K.M., y Langry, K.C. (1983). Assignment of hyperfine shifted resonances in high-spin forms of cytochrome-C peroxidase by reconstitutions with deuterated hemins. 743, 246-255.
- Saunders, B.C., Homes-Siedle, A.G y Stark, B.P (1964). Peroxidase. The properties and uses of a versatile enzyme and some related catalysts. (London, Butterworths).
- Sayan, E., y Edecan, M.E. (2008). An optimization study using response surface methods on the decolorization of Reactive Blue 19 from aqueous solution by ultrasound. 15, 530-538.
- Scherer, M., y Fischer, R. (1998). Purification and characterization of laccase II of Aspergillus nidulans. Arch. Microbiol. 170, 78-84.
- Schloss, P., Walter, C., y Mader, M. (1987). Basic peroxidases in isolated vacuoles of *nicotiana tabacum* L. Planta 170, 225-229.
- Schlosser, D., y Hofer, C. (2002). Laccase-catalyzed oxidation of Mn<sup>2+</sup> in the presence of natural Mn<sup>3+</sup> chelators as a novel source of extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and its impact on manganese peroxidase. Appl. Environ. Microbiol. 68, 3514-3521.
- Schuller, D.J., Ban, N., vanHuystee, R.B., McPherson, A., y Poulos, T.L. (1996). The crystal structure of peanut peroxidase. 4, 311-321.
- Secula, M.S., Cretescu, I., y Petrescu, S. (2011). An experimental study of indigo carmine removal from aqueous solution by electrocoagulation. Desalination 277, 227-235.
- Shakeri, M., y Shoda, M. (2007). Change in turnover capacity of crude recombinant dye-decolorizing peroxidase (rDyP) in batch and fed-batch decolorization of Remazol Brilliant Blue R. 76, 919-926.
- Shakeri, M., y Shoda, M. (2010). Efficient decolorization of an anthraquinone dye by recombinant dye-decolorizing peroxidase (rDyP) immobilized in silica-based mesocellular foam. J. Mol. Catal. B-Enzym. 62, 277-281.
- Shakeri, M., Sugano, Y., y Shoda, M. (2008). Stable repeated-batch production of recombinant dye-decolorizing peroxidase (rDyP) from Aspergillus oryzae. 105, 683-686.
- Shan, D., Mousty, C., Cosnier, S., y Mu, S.L. (2002). A composite poly azure B-clay-enzyme sensor for the mediated electrochemical determination of phenols. 537, 103-109.
- Shanmugam, S., Rajasekaran, P., y Thanikal, J.V. (2009). Synthetic dye decolourization, textile dye and paper

industrial effluent treatment using white rot fungi Lentinus edodes. Desalin. Water Treat. 4, 143-147.

- Shervedani, R.K., Yaghoobi, F., y Bagherzadeh, M. (2009). Electrocatalytic Determination of Hydroquinone with Mn+ Modified Gold-5-amino-2-mercaptobenzimidazole Self-Assembled Monolayer Electrodes. 6, 104-112.
- Shi, Y.T., Xia, D.S., y Zeng, Q.F. (2007). Comparative study on oxidation of two structurally different commercial reactive dyestuffs by microwave photochemistry (Beijing, Science Press Beijing).
- Shinde, V., Dhalwal, K., y Mahadik, K. (2008). High-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of gallic acid and ellagic acid in herbal extract and formulations. 60, A31-A31.
- Shiro, Y., Kurono, M., y Morishima, I. (1986). Presence of endogenous calcium ion and its functional and structural regulation in horseradish peroxidase. 261, 9382-9390.
- Shleev, S.V., Morozova, O., Nikitina, O., Gorshina, E.S., Rusinova, T., Serezhenkov, V.A., Burbaev, D.S., Gazaryan, I.G., y Yaropolov, A.I. (2004). Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. Biochimie 86, 693-703.
- Shu, M.-W., Leong, M.-I., Fuh, M.-R., y Huang, S.-D. (2012). Determination of endocrine-disrupting phenols in water samples by a new manual shaking-enhanced, ultrasound-assisted emulsification microextraction method. 137, 2143-2150.
- Siddique, M., Farooq, R., Khalid, A., Farooq, A., Mahmood, Q., Farooq, U., Raja, I.A., y Shaukat, S.F. (2009). Thermal-pressure-mediated hydrolysis of Reactive Blue 19 dye. J. Hazard. Mater. *172*, 1007-1012.
- Siddique, M., Farooq, R., Khan, Z.M., Khan, Z., y Shaukat, S.F. (2011a). Enhanced decomposition of reactive blue 19 dye in ultrasound assisted electrochemical reactor. Ultrason. Sonochem. *18*, 190-196.
- Siddique, M., Farooq, R., y Shaheen, A. (2011b). Removal of Reactive Blue 19 from Wastewaters by Physicochemical and Biological Processes-A Review. J. Chem. Soc. Pak. 33, 284-293.
- Silva, C.L., Pereira, J., Wouter, V.G., Giro, C., y Camara, J.S. (2011a). A fast method using a new hydrophiliclipophilic balanced sorbent in combination with ultra-high performance liquid chromatography for quantification of significant bioactive metabolites in wines. 86, 82-90.
- Silva, W.C., Pereira, P.F., Marra, M.C., Gimenes, D.T., Cunha, R.R., da Silva, R.A.B., Munoz, R.A.A., y Richter, E.M. (2011b). A Simple Strategy for Simultaneous Determination of Paracetamol and Caffeine Using Flow Injection Analysis with Multiple Pulse Amperometric Detection. 23, 2764-2770.
- Singh, A.D., Sabaratnam, V., Abdullah, N., Annuar, M.S.M., y Ramachandran, K.B. (2010). Decolourisation of chemically different dyes by enzymes from spent compost of Pleurotus sajor-caju and their kinetics. Afr. J. Biotechnol. 9, 41-54.
- Singh, G., Bhalla, A., Kaur, P., Capalash, N., y Sharma, P. (2011). Laccase from prokaryotes: a new source for an old enzyme. Rev. Environ. Sci. Bio-Technol. 10, 309-326.
- Singh, G., Capalash, N., Goel, R., y Sharma, P. (2007). A pH-stable laccase from alkali-tolerant gammaproteobacterium JB: Purification, characterization and indigo carmine degradation. Enzyme Microb. Technol. 41, 794-799.
- Smith, A.T., Santama, N., Dacey, S., Edwards, M., Bray, R.C., Thorneley, R.N.F., y Burke, J.F. (1990). Expression of a synthetic gene for horseradish peroxidase-C in *escherichia coli* and folding and activation of the recombinant enzyme with Ca<sup>+2</sup> and heme. 265, 13335-13343.
- Smith, A.T., y Veitch, N.C. (1998). Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. 2, 269-278.
- Smulevich, G., Wang, Y., Edwards, S.L., Poulos, T.L., English, A.M., y Spiro, T.G. (1990). Resonance raman spectroscopy of cytochrome-C peroxidase single crystals on a variable temperature microscope stage. Biochemistry 29, 2586-2592.
- Solangi, A.R., Memon, S.Q., Mallah, A., Memon, N., Khuhawar, M.Y., y Bhanger, M.I. (2011). Development and implication of a capillary electrophoresis methodology for ciprofloxacin, paracetamol and diclofenac sodium in pharmaceutical formulations and simultaneously in human urine samples. 24, 539-544.
- Solomon, E.I., Sundaram, U.M., y Machonkin, T.E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. Chem. Rev. 96, 2563-2605.
- Son, M.J., Rico, C.W., Nam, S.H., y Kang, M.Y. (2010). Influence of Oryzanol and Ferulic Acid on the Lipid Metabolism and Antioxidative Status in High Fat-Fed Mice. 46, 150-156.
- Song, S., Yao, J., He, Z., Qiu, J., y Chen, J. (2008). Effect of operational parameters on the decolorization of CI Reactive Blue 19 in aqueous solution by ozone-enhanced electrocoagulation. *152*, 204-210.
- Song, W., Li, Z., y Ding, F. (2011). Determination of bisphenol A in effluent water of analogue MBR wastewater treatment system using high-performance liquid chromatography. *15*, 8-12.
- Sotomayor, M.D.P.T., Sigoli, A., Lanza, M.R.V., Tanaka, A.A., y Kubota, L.T. (2008). Construction and application of an electrochemical sensor for paracetamol determination based on iron tetrapyridinoporphyrazine as a biomimetic catalyst of P450 enzyme. 19, 734-743.
- Sottomayor, M., Lopez-Serrano, M., DiCosmo, F., y Barcelo, A.R. (1998). Purification and characterization of alpha-3

',4 '-anhydrovinblastine synthase (peroxidase-like) from Catharanthus roseus (L) G. Don. 428, 299-303.

- Spiridonov, N.A., Konovalov, D.A., y Arkhipov, V.V. (2005). Cytotoxicity of some Russian ethnomedicinal plants and plant compounds. 19, 428-432.
- Srinivasan, M., Sudheer, A.R., y Menon, V.P. (2007). Ferulic acid: Therapeutic potential through its antioxidant property. 40, 92-100.
- Stege, P.W., Sombra, L.L., Messina, G.A., Martinez, L.D., y Silva, M.F. (2009). Environmental monitoring of phenolic pollutants in water by cloud point extraction prior to micellar electrokinetic chromatography. 394, 567-573.
- Steinmetz, R., Mitchner, N.A., Grant, A., Allen, D.L., Bigsby, R.M., y Ben-Jonathan, N. (1998). The xenoestrogen bisphenol A induces growth, differentiation, and c-fos gene expression in the female reproductive tract. 139, 2741-2747.
- Sudheer, A.R., Muthukumaran, S., Devipriya, N., y Menon, V.P. (2007a). Ellagic acid, a natural polyphenol protects rat peripheral blood lymphocytes against nicotine-induced cellular and DNA damage in vitro: With the comparison of N-acetylcysteine. 230, 11-21.
- Sudheer, A.R., Muthukumaran, S., Kalpana, C., Srinivasan, M., y Menon, V.P. (2007b). Protective effect of ferulic acid on nicotine-induced DNA damage and cellular changes in cultured rat peripheral blood lymphocytes: A comparison with N-acetylcysteine. 21, 576-585.
- Sugano, Y., Matsushima, Y., Tsuchiya, K., Aoki, H., Hirai, M., y Shoda, M. (2009). Degradation pathway of an anthraquinone dye catalyzed by a unique peroxidase DyP from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1. Biodegradation 20, 433-440.
- Sundaramoorthy, M., Gold, M.H., y Poulos, T.L. (2010). Ultrahigh (0.93 angstrom) resolution structure of manganese peroxidase from Phanerochaete chrysosporium: Implications for the catalytic mechanism. J. Inorg. Biochem. 104, 683-690.
- Sundaramoorthy, M., Kishi, K., Gold, M.H., y Poulos, T.L. (1994). The crystal structure of manganese peroxidase from phanerochaete crysosporium at 2.06 Angstrom resolution. 269, 32759-32767.
- Susla, M., Novotny, C., Erbanova, P., y Svobodova, K. (2008). Implication of *Dichomitus squalens* Manganese-Dependent Peroxidase in Dye Decolorization and Cooperation of the Enzyme with Laccase. Folia Microbiol. 53, 479-485.
- Susla, M., Novotny, C., y Svobodova, K. (2007). The implication of Dichomitus squalens laccase isoenzymes in dye decolorization by immobilized fungal cultures. 98, 2109-2115.
- Svobodova, K., Majcherczyk, A., Novotny, C., y Kuees, U. (2008). Implication of mycelium-associated laccase from Irpex lacteus in the decolorization of synthetic dyes. 99, 463-471.
- Systat, I. (2005). SigmaStat (San Jose, CA, Systat Software Inc.).
- Systat, I. (2006). SigmaPlot (San Jose, CA, Systat Software Inc.).
- Tadesse, M.A., D'Annibale, A., Galli, C., Gentili, P., y Sergi, F. (2008). An assessment of the relative contributions of redox and steric issues to laccase specificity towards putative substrates. Org. Biomol. Chem. 6, 868-878.
- Tan, S.K., Sim, C.S., y Goh, C.L. (2008a). Hydroquinone-induced exogenous ochronosis in Chinese two case reports and a review. Int. J. Dermatol. 47, 639-640.
- Tan, X.-j., Li, Q., Chen, X.-h., Wang, Z.-w., Shi, Z.-y., Bi, K.-s., y Jia, Y. (2008b). Simultaneous determination of 13 bioactive compounds in herba Artemisiae Scopariae (Yin Chen) from different harvest seasons by HPLC-DAD. 47, 847-853.
- Tanaka, M., Nagano, S., Ishimori, K., y Morishima, I. (1997). Hydrogen bond network in the distal site of peroxidases: Spectroscopic properties of Asn70->Asp horseradish peroxidase mutant. Biochemistry *36*, 9791-9798.
- Tang, C., y Sojinu, O.S. (2012a). Simultaneous determination of caffeic acid phenethyl ester and its metabolite caffeic acid in dog plasma using liquid chromatography tandem mass spectrometry. 94, 232-239.
- Tang, C.M., y Sojinu, O.S. (2012b). Simultaneous determination of caffeic acid phenethyl ester and its metabolite caffeic acid in dog plasma using liquid chromatography tandem mass spectrometry. Talanta 94, 232-239.
- Tatsumi, K., Wada, S., y Ichikawa, H. (1996). Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase. Biotechnol. Bioeng. 51, 126-130.
- Tavares, A.P.M., Cristovao, R.O., Gamelas, J.A.F., Loureiro, J.M., Boaventura, R.A.R., y Macedo, E.A. (2009). Sequential decolourization of reactive textile dyes by laccase mediator system. J. Chem. Technol. Biotechnol. 84, 442-446.
- Teresa Diez, M., Garcia del Moral, P., Antonio Resines, J., y Jesus Arin, M. (2008). Determination of phenolic compounds derived from hydrolysable tannins in biological matrices by RP-HPLC. *31*, 2797-2803.
- Thanabal, V., Deropp, J.S., y Lamar, G.N. (1987). H-1-NMR study of the electronic and molecular structure of the heme cavity in horseradish peroxidase. Complete heme resonance assgnments based on saturation transfer and nuclear overhauser effects. 109, 265-272.
- Thongchai, W., Liawruangrath, B., y Liawruangrath, S. (2007). High-performance liquid chromatographic

determination of arbutin in skin-whitening creams and medicinal plant extracts. 58, 35-44.

- Thongchai, W., Liawruangrath, B., y Liawruangrath, S. (2009). Arbutin determination in medicinal plants and creams. 31.
- Thorneby-Andersson, K., Sterner, O., y Hansson, C. (2000). Tyrosinase-mediated formation of a reactive quinone from the depigmenting agents, 4-tert-butylphenol and 4-tert-butylcatechol. Pigm. Cell. Res. 13, 33-38.
- Thulstrup, P.W., Thormann, T., Spanget-Larsen, J., y Bisgaard, H.C. (1999). Interaction between ellagic acid and calf thymus DNA studied with flow linear dichroism UV-VIS spectroscopy. 265, 416-421.
- Timonen, S., y Sen, R. (1998). Heterogeneity of fungal and plant enzyme expression in intact Scots pine Suillus bovinus and Paxillus involutus mycorrhizospheres developed in natural forest humus. New Phytol. 138, 355-366.
- Torres-Duarte, C., Roman, R., Tinoco, R., y Vazquez-Duhalt, R. (2009). Halogenated pesticide transformation by a laccase-mediator system. Chemosphere 77, 687-692.
- Torres-Martinez, L.M., Ruiz-Gomez, M.A., Figueroa-Torres, M.Z., Juarez-Ramirez, I., y Moctezuma, E. (2012). Sm<sub>2</sub>FeTaO<sub>7</sub> Photocatalyst for Degradation of Indigo Carmine Dye under Solar Light Irradiation.
- Torres, E., Bustos-Jaimes, I., y Le Borgne, S. (2003). Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. Appl. Catal. B-Environ. 46, 1-15.
- Twiehaus, T., Evers, S., Buscher, W., y Cammann, K. (2001). Development of an element-selective monitoring system for adsorbable organic halogens (AOX) with plasma emission spectrometric detection for quasicontinuous waste-water analysis. 371, 614-620.
- Tyson, H., Fieldes, M.A., Cheung, C., y Starobin, J. (1985). Isozyme relative mobility (RM) changes related to leaf position. Apparently smooth RM trends and some implications. 23, 641-654.
- Tyszczuk, K., Skalska-Kamniska, A., y Wozniak, A. (2011). Voltammetric method using a lead film electrode for the determination of caffeic acid in a plant material. 125, 1498-1503.
- Tzanov, T., Basto, C., Gubitz, G.M., y Cavaco-Paulo, A. (2003). Laccases to improve the whiteness in a conventional bleaching of cotton. Macromol. Mater. Eng. 288, 807-810.
- Uang, Y.S., Kang, F.L., y Hsu, K.Y. (1995). Determination of caffeic acid in rabbit plasma by high-performance liquidchromatography. J. Chromatogr. B-Biomed. Appl. 673, 43-49.
- Uddin, S., Rauf, A., Kazi, T.G., Afridi, H.I., y Lutfullah, G. (2011). Highly sensitive spectrometric method for determination of hydroquinone in skin lightening creams: application in cosmetics. 33, 132-137.
- Uyama, H., y Kobayashi, S. (2006). Enzymatic synthesis and properties of polymers from polyphenols. In Enzyme-Catalyzed Synthesis of Polymers, S. Kobayashi, H. Ritter, and D. Kaplan, eds. (Berlin, Springer-Verlag), pp. 51-67.
- Valero, E., Carrion, P., Varon, R., y Garcia-Carmona, F. (2003). Quantification of acetaminophen by oxidation with tyrosinase in the presence of Besthorn's hydrazone. *318*, 187-195.
- Vautier, M., Guillard, C., y Herrmann, J.M. (2001). Photocatalytic degradation of dyes in water: Case study of indigo and of indigo carmine. J. Catal. 201, 46-59.
- Veitch, N.C. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. 65, 249-259.
- Veitch, N.C., Gao, Y., Smith, A.T., y White, C.G. (1997). Identification of a critical phenylalanine residue in horseradish peroxidase, Phe179, by site-directed mutagenesis and H-1-NMR: Implications for complex formation with aromatic donor molecules. Biochemistry 36, 14751-14761.
- Veitch, N.C., y Smith, A.T. (2001). Horseradish peroxidase. 51, 107-162.
- Veitch, N.C., Tams, J.W., Vind, J., Dalboge, H., y Welinder, K.G. (1994). NMR-studies of recombinant coprinus peroxidase and 3 site-directed mutants-implications for peroxidase sustrate-binding. 222, 909-918.
- Vieira, I.C., Lupetti, K.O., y Fatibello, O. (2003). Determination of paracetamol in pharmaceutical products using a carbon paste biosensor modified with crude extract of zucchini (Cucurbita pepo). 26, 39-43.
- Vijayaraghavan, K., Won, S.W., y Yun, Y.S. (2009). Treatment of complex Remazol dye effluent using sawdust- and coal-based activated carbons. J. Hazard. Mater. 167, 790-796.
- Vitello, L.B., Erman, J.E., Miller, M.A., Wang, J., y Kraut, J. (1993). Effect of Arginine-48 replacement on the reaction between cytochrome-C peroxidase and hydrogen peroxide. 32, 9807-9818.
- Walsh, M.T., Connell, K., Sheahan, A.M., Gleich, G.J., y Costello, R.W. (2011). Eosinophil Peroxidase Signals via Epidermal Growth Factor-2 to Induce Cell Proliferation. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 45, 946-952.
- Wan, Y.Y., Lu, R., Xiao, L., Du, Y.M., Miyakoshi, T., Chen, C.L., Knill, C.J., y Kennedy, J.F. (2010). Effects of organic solvents on the activity of free and immobilised laccase from *Rhus vernicifera*. Int. J. Biol. Macromol. 47, 488-495.
- Wang, F.G., Yang, J.Q., y Wu, K.B. (2009a). Mesoporous silica-based electrochemical sensor for sensitive determination of environmental hormone bisphenol A. 638, 23-28.
- Wang, H., Li, Q., He, N., Wang, Y., Sun, D., Shao, W., Yang, K., y Lu, Y. (2009b). Removal of anthraquinone reactive dye from wastewater by batch hydrolytic-aerobic recycling process. 67, 180-186.

- Wang, H., Li, Q., Lu, Y., He, N., Hong, J., y Zou, X. (2007a). Performance of batch-operated combined hydrolyticaerobic biofilm process in treating anthraquinone reactive dye wastewater. 24, 483-492.
- Wang, H.L., Li, Y.L., Ding, C.X., Zhao, X.N., You, J.M., y Suo, Y.R. (2006). Determination of five pharmacologically active compounds extracted from *Rhodiola* for natural product drug discovery with HPLC-APCI-MS. 29, 857-868.
- Wang, H.X., y Ng, T.B. (2004). Purification of a novel low-molecular-mass laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the mushroom *Tricholoma giganteum*. Biochem. Biophys. Res. Commun. *315*, 450-454.
- Wang, J., Hu, S.A., y Bai, X.H. (2010a). Determination of Trace Amounts of Chlorogenic Acid and Three of Its Metabolites Using Time-Resolved LPME and LC-UV Detection in Biological Specimens. Chromatographia 72, 453-458.
- Wang, J.M., Mauro, J.M., Edwards, S.L., Oatley, S.J., Fishel, L.A., Ashford, V.A., Xuong, N.H., y Kraut, J. (1990). Xray structures of recombinant yeast cytochrome-C peroxidase and 3 heme-cleft mutants prepared by sitedirected mutagenesis. 29, 7160-7173.
- Wang, L.-H., Hsu, K.-Y., Hsu, F.-L., y Lin, S.-J. (2008a). Simultaneous determination of caffeic acid, ferulic acid and isoferulic acid in rabbit plasma by high performance liquid chromatography. *16*, 34-40.
- Wang, P., Woodward, C.A., y Kaufman, E.N. (1999). Poly(ethylene glycol)-modified ligninase enhances pentachlorophenol biodegradation in water-solvent mixtures. 64, 290-297.
- Wang, Q., Bu, W., Chen, X., y Bai, X.H. (2012). Mechanism and Concentration of Phenylpropionic Acids by Ionic Liquid Dispersive Liquid Phase Microextraction. Chem. J. Chin. Univ.-Chin. 33, 700-706.
- Wang, S.-M., Su, W.-Y., y Cheng, S.-H. (2010b). A simultaneous and Sensitive Determination of Hydroquinone and Catechol at Anodically Pretreated Screen-Printed Carbon Electrodes. *5*, 1649-1664.
- Wang, W., Tang, J., Wang, S., Zhou, L., y Hu, Z. (2007b). Method development for the determination of coumarin compounds by capillary electrophoresis with indirect laser-induced fluorescence detection. *1148*, 108-114.
- Wang, X.-m., Wang, Y.-f., Pan, G.-x., y Yang, J. (2008b). HPLC determination of four active components in dengzhanxixin injection. 33, 1681-1683.
- Wang, X.-Y., Chen, X., y Bai, X.-H. (2009c). Application of Liquid Phase Microextraction with Back Extraction in the Analysis of Phenylpropionic Acids. 37, 35-40.
- Wang, Y.P., Zhu, K., Dong, G.W., Wang, H.T., Liu, Z.G., He, N., Li, Q.B., y Ren, N.Q. (2011). Bacterial Community Dynamics During Treatment of Anthraquinone Dye in a Hydrolytic Reactor, an Aerobic Biofilm Reactor, and a Combined Hydrolytic-Aerobic Reactor System. Environ. Eng. Sci. 28, 121-128.
- Wansi, J.D., Chiozem, D.D., Tcho, M.T., Toze, F.A.A., Devkota, K.P., Ndjakou, B.L., Wandji, J., y Sewald, N. (2010). Antimicrobial and antioxidant effects of phenolic constituents from Klainedoxa gabonensis. Pharm. Biol. 48, 1124-1129.
- Watts, D.G. (1994). Parameter estimates from nonlinear models. 240, 23-36.
- Wei, Y., Zhang, Z.J., Zhang, Y.T., y Sun, Y.H. (2007). Simple LC method with chemiluminescence detection for simultaneous determination of arbutin and L-ascorbic acid in whitening cosmetics. 65, 443-446.
- Welinder, K.G. (1976). Covalent structure of glycoprotein horseradish peroxidase (EC1.11.7). FEBS Lett. 72, 19-23.
- Welinder, K.G. (1979). Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase.4 amino and carboxyl termini, cyanogen-bromide and tryptic fragments, the complete sequence, and some structural characteristics of horseradish peroxidase-C. Eur. J. Biochem. 96, 483-502.
- Welinder, K.G. (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. Curr. Opin. Struct. Biol 2, 388-393.
- Welinder, K.G., y Gajhede, M. (1993). Structure and evolution of peroxidases. In Plant peroxidases. Biochemistry and Physiology, U.o.C.a.U.o. Geneva, ed., pp. 35-42.
- Wen, J., Kang, L., Liu, H., Xiao, Y., Zhang, X., y Chen, Y. (2012). A validated UV-HPLC method for determination of chlorogenic acid in *Lepidogrammitis drymoglossoides* (Baker) Ching, Polypodiaceae. 4, 148-153.
- Weon, J.B., Ma, J.Y., Yang, H.J., y Ma, C.J. (2012). Simultaneous determination of ferulic acid, hesperidin, 6gingerol and glycyrrhizin in Insampaedok-san by HPLC coupled with diode array detection. J. Anal. Chem. 67, 955-959.
- Wilson, T.A., Nicolosi, R.J., Woolfrey, B., y Kritchevsky, D. (2007). Rice bran oil and oryzanol reduce plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic acid in hypercholesterolemic hamsters. 18, 105-112.
- Williamson, P.R. (1994). Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans* Identification as a laccase. J. Bacteriol. *176*, 656-664.
- Witayakran, S., y Ragauskas, A.J. (2009). Synthetic applications of laccase in green chemistry. Adv. Synth. Catal. 351, 1187-1209.
- Wright, H., y Nicell, J.A. (1999). Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols. Bioresour. Technol. 70, 69-79.
- Wu, S., Yang, B., Xi, L., y Zhu, Y. (2012). Determination of phenols with ion chromatography-online electrochemical

derivatization based on porous electrode-fluorescence detection. 1229, 288-292.

- Wu, T., Wang, W.Y., Jiang, L.M., Chu, Q.C., Delaire, J., y Ye, J.N. (2008a). Determination of natural and synthetic endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in sewage based on SPE and MEKC with amperometric detection. 68, 339-344.
- Wu, Y.-Y., Shi, W.-X., y Chen, S.-Q. (2009). Determination of beta-estradiol, bisphenol A, diethylstilbestrol and salbutamol in human urine by GC/MS. 38, 235-241.
- Wu, Y.L., Hu, B., y Hou, Y.L. (2008b). Headspace single drop and hollow fiber liquid phase microextractions for HPLC determination of phenols. 31, 3772-3781.
- Xia, W., Li, Y., Wan, Y., Chen, T., Wei, J., Lin, Y., y Xu, S. (2010). Electrochemical biosensor for estrogenic substance using lipid bilayers modified by Au nanoparticles. 25, 2253-2258.
- Xiao, Q.-W., Li, Y.-Q., y Zou, X.-L. (2009). Determination of Phenolic Environmental Estrogens in Food Packing Materials by Nonaqueous Capillary Electrophoresis-Chemiluminescence. 37, 1611-1616.
- Xie, C., Veitch, N.C., Houghton, P.J., y Simmonds, M.S.J. (2004). Flavonoid glycosides and isoquinolinone alkaloids from Corydalis bungeana. Phytochemistry 65, 3041-3047.
- Xie, J., Zhang, Y., Kong, D., y Rexit, M. (2011). Rapid identification and determination of 11 polyphenols in Herba lycopi by HPLC-MS/MS with multiple reactions monitoring mode (MRM). 24, 1069-1072.
- Xu, F. (1996). Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *35*, 7608-7614.
- Xu, F. (1997). Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. J. Biol. Chem. 272, 924-928.
- Xu, F. (1999). "Laccase". In Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, Bioseparation, M.C. Flickinger, and S.W. Drew, eds. (New York, John Wiley & Sons Inc.), pp. 1545-1554.
- Xu, F., Palmer, A.E., Yaver, D.S., Berka, R.M., Gambetta, G.A., Brown, S.H., y Solomon, E.I. (1999). Targeted mutations in a *Trametes villosa* laccase - Axial perturbations of the T1 copper. 274, 12372-12375.
- Xu, F., Shin, W.S., Brown, S.H., Wahleithner, J.A., Sundaram, U.M., y Solomon, E.I. (1996). A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. Biochim. Biophys. Acta-Protein Struct. Molec. Enzym. 1292, 303-311.
- Xu, H., Yao, J.R., Cheng, J., Cui, Y.F., Song, D.D., y Feng, Y.Q. (2008). LC-Ultrasound-Assisted headspace liquid microextraction for the analysis of phenols in water. 68, 235-238.
- Xu, L.N., Han, X., Qi, Y., Xu, Y.W., Yin, L.H., Peng, J.Y., Liu, K.X., y Sun, C.K. (2009). Multiple compounds determination and fingerprint analysis of *Lidanpaishi* tablet and keli by high-performance liquid chromatography. Anal. Chim. Acta 633, 136-148.
- Xu, S., Liu, W., Hu, B., Cao, W., y Liu, Z. (2012). Biomimetic enhanced chemiluminescence of luminol-H2O2 system by manganese (III) deuteroporphyrin and its application in flow injection determination of phenol at trace level. 227, 32-37.
- Xue, Y., Hou, H., y Zhu, S. (2009). Adsorption removal of reactive dyes from aqueous solution by modified basic oxygen furnace slag: Isotherm and kinetic study. 147, 272-279.
- Yamazaki, I., y Piette, L.H. (1963). Mechanism of aerobic oxidase reaction catalyzed by peroxidase. 77, 47-&.
- Yang, Y.Z., Yang, W.S., Yang, F.L., y Zhang, X.W. (2005). Electrooxidative degradation of an anthraquinone dye with in-situ electrogenerated active chlorine in a divided flow cell. 13, 628-633.
- Yatsu, J., y Asano, T. (2009). Cuticle laccase of the silkworm, *Bombyx mori*: Purification, gene identification and presence of its inactive precursor in the cuticle. Insect Biochem. Mol. Biol. 39, 254-262.
- Ye, D., Xu, Y., Luo, L., Ding, Y., Wang, Y., y Liu, X. (2012a). LaNi0.5Ti0.5O<sub>3</sub>/CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-based sensor for sensitive determination of paracetamol. 16, 1635-1642.
- Ye, D.X., Xu, Y.H., Luo, L.Q., Ding, Y.P., Wang, Y.L., y Liu, X.J. (2012b). LaNi0.5Ti0.5O3/CoFe2O4-based sensor for sensitive determination of paracetamol. J. Solid State Electrochem. 16, 1635-1642.
- Yin, H.S., Zhou, Y.L., y Ai, S.Y. (2009). Preparation and characteristic of cobalt phthalocyanine modified carbon paste electrode for bisphenol A detection. 626, 80-88.
- Yin, H.S., Zhou, Y.L., Cui, L., Liu, X.G., Ai, S.Y., y Zhu, L.S. (2011). Electrochemical oxidation behavior of bisphenol A at surfactant/layered double hydroxide modified glassy carbon electrode and its determination. J. Solid State Electrochem. 15, 167-173.
- Yokota, K., y Yamazaki, I. (1965). Activity of horseradish peroxidase compound 3. 18, 48-&.
- Yokota, K., y Yamazaki, I. (1977). Analysis and computer simulation of aerobic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide catalyzed by horseradish peroxidase. *16*, 1913-1920.
- Yue, M.-E., Xu, J., Li, Q.-Q., y Hou, W.-G. (2012). Separation and Determination of Bromophenols in Trachypenaeus curvirostris and Lepidotrigla microptera by Capillary Zone Electrophoresis. 20, 88-93.
- Yun, E.S., Park, S.K., Kim, B.S., Chae, Y.Z., Cho, S.M., Yi, H., Cho, H.J., y Shin, H.C. (2012). Determination of the

esculetin contents of medicinal plants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Biomed. Chromatogr. 26, 1247-1251.

- Zaied, M., Chutet, E., Peulon, S., Bellakhal, N., Desmazieres, B., Dachraoui, M., y Chausse, A. (2011). Spontaneous oxidative degradation of indigo carmine by thin films of birnessite electrodeposited onto SnO<sub>2</sub>. Appl. Catal. B-Environ. 107, 42-51.
- Zalipsky, S., y Harris, J.M. (1997). Introduction to chemistry and biological applications of poly(ethylene glycol). In Poly(Ethylene Glycol): Chemistry and Biological Applications, J.M. Harris, and S. Zalipsky, eds., pp. 1-13.
- Zapp, E., Brondani, D., Vieira, I.C., Dupont, J., y Scheerenb, C.W. (2011). Gold Nanoparticles and Hydrophobic Ionic Liquid Applied on the Development of a Voltammetric Biosensor for Polyphenol Determination. 23, 1124-1133.
- Zeldow, B.J. (1963). Studies on antibacterial action of human saliva. 3 cofactor requirements of a lactobacillus bactericidin. 90, 12-&.
- Zen, J.-M., Yang, H.-H., Chiu, M.-H., Yang, C.-H., y Shih, Y. (2011). Selective Determination of Arbutin in Cosmetic Products Through Online Derivatization Followed by Disposable Electrochemical Sensor. *94*, 985-990.
- Zhang, H.-J., Wang, C.-Y., Huang, J.-S., y You, T.-Y. (2009a). Simultaneous Determination of Catechol and Hydroquinone at Electrospun Palladium Nanoparticle/Carbon Nanofibers Modified Electrode. 37, 1622-1626.
- Zhang, J., Xu, L., Wang, Y.Q., y Lu, R.H. (2009b). Electrochemical Sensor for Bisphenol A Based on Molecular Imprinting Technique and Electropolymerization Membrane. 37, 1041-1044.
- Zhang, L., Dong, S., Yang, Z., Wang, Q., He, P., y Fang, Y. (2008). Determination of four polyphenolic active ingredients from a pharmaceutical preparation by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. 48, 198-200.
- Zhang, M., Wu, F., Wei, Z.Y., Xiao, Y.Z., y Gong, W.M. (2006). Characterization and decolorization ability of a laccase from *Panus rudis*. Enzyme Microb. Technol. 39, 92-97.
- Zhang, P.-P., Shi, Z.-G., y Feng, Y.-Q. (2011a). Determination of phenols in environmental water samples by twostep liquid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography. *85*, 2581-2586.
- Zhang, S.J., Yang, M., Yang, Q.X., Zhang, Y., Xin, B.P., y Pan, F. (2003). Biosorption of reactive dyes by the mycelium pellets of a new isolate of Penicillium oxalicum. 25, 1479-1482.
- Zhang, W.Q., Zhu, G.B., Ma, J.Y., Zhang, X.H., y Chen, J.H. (2011b). A new electrochemical sensor based on Wdoped titania-CNTs composite for detection of pentachlorophenol. Indian J. Chem. Sect A-Inorg. Bio-Inorg. Phys. Theor. Anal. Chem. 50, 15-21.
- Zhang, X.Y., Liu, Y.X., Yan, K.L., y Wu, H.J. (2007). Decolorization of anthraquinone-type dye by bilirubin oxidaseproducing nonligninolytic fungus *Myrothecium sp.* IMER1. J. Biosci. Bioeng. *104*, 104-110.
- Zhang, Y., Li, W.W., Zeng, G.M., Tang, L., Feng, C.L., Huang, D.L., y Li, Y.P. (2009c). Novel Neural Network-Based Prediction Model for Quantifying Hydroquinone in Compost with Biosensor Measurements. 26, 1063-1070.
- Zhang, Y., Luo, L., Ding, Y., Liu, X., y Qian, Z. (2010). A highly sensitive method for determination of paracetamol by adsorptive stripping voltammetry using a carbon paste electrode modified with nanogold and glutamic acid. 171, 133-138.
- Zhang, Y., Wang, L.T., Lu, D.B., Shi, X.Z., Wang, C.M., y Duan, X.J. (2012). Sensitive determination of bisphenol A base on arginine functionalized nanocomposite graphene film. Electrochim. Acta *80*, 77-83.
- Zhao, D.Q., Gilfoyle, D.J., Smith, A.T., y Loew, G.H. (1996). Refinement of 3D models of horseradish peroxidase isoenzyme C: Predictions of 2D NMR assignments and substrate binding sites. 26, 204-216.
- Zhou, B., Wu, Z., Li, X., Zhang, J., y Hu, X. (2008a). Analysis of ellagic acid in pomegranate rinds by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *19*, 86-89.
- Zhou, L., Kang, J., Fan, L., Ma, X.C., Zhao, H.Y., Han, J., Wang, B.R., y Guo, D.A. (2008b). Simultaneous analysis of coumarins and secoiridoids in *Cortex Fraxini* by high-performance liquid chromatography-diode array detectionelectrospray ionization tandem mass spectrometry. J. Pharm. Biomed. Anal. 47, 39-46.
- Zhou, Y.-P., Chen, Q.-H., Cheng, H.-Z., Gui, L., Sun, L.-L., Lei, D.-Z., Ke, D.-S., y Tian, C.-E. (2011). Decolorization of indigo carmine by Ganoderma weberianum. In Environmental Biotechnology and Materials Engineering, Pts 1-3, Y.G. Shi, and J.L. Zuo, eds., pp. 1035-1040.
- Zhu, X.D., Gibbons, J., Garcia-Rivera, J., Casadevall, A., y Williamson, P.R. (2001). Laccase of *Cryptococcus* neoformans is a cell wall-associated virulence factor. Infect. Immun. 69, 5589-5596.
- Zhuang, Y.F., Zhang, J.T., y Cao, G.P. (2008). Simple and Sensitive Electrochemiluminescence Method for Determination of Bisphenol A Based on its Inhibitory Effect on the Electrochemiluminescence of Luminol. 55, 994-1000.