



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

## INSTITUTO DE INGENIERÍA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA

### ***“CUANTIFICACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS POR AMPEROMETRÍA DE PULSOS Y UN SENSOR ENZIMÁTICO”***

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE: **Maestro en Ingeniería**

PRESENTA: **VERONICA AGUAYO GONZALEZ**

DIRECTORA DE TESIS: **MARGARITA STILIANOVA STOYTCHIEVA**

CODIRECTORA DE TESIS: **GISELA MONTERO ALPÍREZ**

**Mexicali, B. C. Agosto del 2014**





# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

## INSTITUTO DE INGENIERÍA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA

### ***“CUANTIFICACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS POR AMPEROMETRÍA DE PULSOS Y UN SENSOR ENZIMÁTICO”***

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE: **Maestro en Ingeniería**



PRESENTA: **VERONICA AGUAYO GONZALEZ**

DIRECTORA DE TESIS: **MARGARITA STILIANOVA STOYTCHVA**

CODIRECTORA DE TESIS: **GISELA MONTERO ALPÍREZ**

Mexicali, B. C. Agosto del 2014

*A mi querido hijo Pedro Míjael y  
a mis padres Rosario y Pedro.*

## AGRADECIMIENTOS

Al culminar este proyecto vienen a mi mente todos los tropiezos que surgieron a lo largo del mismo, vienen a mi mente todas las personas que de una u otra manera fueron parte clave para concluirlo, a todos ellos les agradezco infinitamente, especialmente:

A Dios y a mi familia, porque este logro sin ellos no hubiera sido posible; gracias por ese apoyo moral e incondicional, por ser y estar en todo momento. A mi pequeño hijo, por ser ese motor que ayuda a que mi vida se mueva, por ser gran parte de la fuerza para continuar cuando el cansancio agobia. A mis padres, por el cariño y comprensión entregado día a día en forma limpia y desinteresada; por su ayuda en el cuidado de mi pequeño hijo, gracias por su aliento, durante estos tiempos, gracias, aunque saben muy bien, que mis triunfos y logros son suyos también.

Y de todo corazón agradezco también a mi directora de Tesis, la Dra. Margarita Stoytcheva, por su guía, su ayuda, su apoyo; por todas sus sabías palabras entregadas durante todo este tiempo; ayuda sin la cual no hubiera sido posible esto.

A mi codirectora de Tesis, la Dra. Gisela Montero Alpírez, por ser un aliciente y una guía durante mi estancia en la institución; por su calidez humana y por ser parte fundamental para el inicio de esta aventura.

Al Instituto Tecnológico de Mexicali por el préstamo de sus instalaciones para la realización de estudios de laboratorios, en especial a la Dra. Lydia Toscano Palomar por el apoyo brindado con la realización de las pruebas FTIR. Por ser una persona inspiradora, un ejemplo a seguir.

A la empresa Autolite, especialmente al Ing. Cesar Hurtado, por su ayuda en la evaluación física de los biosensores diseñados, mediante el equipo SEM.

Al Comité de Sanidad Vegetal y a la Secretaría de Salud de Baja California, por las facilidades otorgadas en la obtención de información estadística de nuestro estado, referente al uso de plaguicidas y las intoxicaciones registradas por los mismos. Datos con los cuales se complementó esta tesis, especialmente al Ing. Arturo Arévalo y la Ing. Jazmín Zarate Ruíz, miembros activos de las respectivas instituciones ya mencionadas.

A la Universidad Autónoma de Baja California, al Instituto de Ingeniería y a sus respectivos encargados, a mis maestros por ser cúmulos de información, por todo ese conocimiento y aprendizaje que me entregaron, gracias, por formarme, gracias por ayudar en la formación de nuevos investigadores.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la confianza entregada y por permitirme gozar del apoyo económico que otorga y con la cual realice estos estudios.

# ÍNDICE

	Página
<u>AGRADECIMIENTOS.</u>	i
<u>LISTADO DE FIGURAS.</u>	vii
<u>LISTADO DE TABLAS.</u>	x
<u>NOMENCLATURA.</u>	x
<u>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.</u>	
1.1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2. HIPÓTESIS.....	3
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	3
1.4. OBJETIVOS.....	4
1.4.1. General.....	4
1.4.2. Específicos.....	5
<u>CAPÍTULO 2 ANTECEDENTES GENERALES.</u>	
2.1. PLAGUICIDAS.....	6
2.1.1. Consumo y Producción.....	6
2.1.2. Intoxicaciones y Contaminación.....	10
2.2. PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS.....	12
2.2.1. Estructura.....	13
2.2.2. Efectos en la Salud y Marco Legal.....	16
2.3. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LOS PLAGUICIDAS OP.....	20
2.3.1. Métodos Oficiales en la Determinación de Pesticidas OP.....	21
2.3.2. Métodos Fluorométricos.....	24
2.3.3. Aplicación de Sensores en la Determinación de Pesticidas OP.....	25
A. Métodos de Inmovilización.....	25
B. Enzimas y Técnicas Empleadas.....	29
C. Sensores Electroquímicos Bacterianos.....	37
D. Nanomateriales.....	39
2.3.4. Combinaciones.....	40
<u>CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA PROPUESTA.</u>	
3.1. SELECCIÓN DEL TRANSDUCTOR Y DE PARÁMETROS DE DETERMINACIÓN DEL PNP.....	41

3.1.1. Selección del Transductor Adecuado para la Oxidación Electroquímica del PNP Producido por Hidrólisis Enzimática de los Pesticidas Organofosforados Cuantificados con Mínimo Ensuciamiento y Pasivación.....	42
A. <u>Preparación del Electrodo GCE y SGE</u> .....	42
B. <u>Preparación del Electrodo Ti/TiO<sub>2</sub></u> .....	42
C. <u>Preparación del Biosensor Enzimático SGE</u> .....	43
D. <u>Preparación del Biosensor Enzimático nAu-SGE</u> .....	43
3.1.2. Determinación del Potencial del Electrodo de Trabajo Seleccionado para la Detección de PNP.....	44
3.1.3. Optimización de los Parámetros de Detección de PNP por Amperometría de Pulsos (PAD).....	45
3.2. MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DEL ELECTRODO.....	47
3.2.1. Evaluación de la Actividad Enzimática.....	48
3.2.2. Inmovilización de la Enzima.....	49
3.2.3. Aplicación y Caracterización de la Uniformidad de la Capa de Biorreconocimiento con Respecto a la Optimización y Estandarización de los Métodos de Deposición.....	51
3.3. CUANTIFICACIÓN DE PESTICIDAS OP POR AMPEROMETRÍA DE PULSOS, USANDO UN BIOSENSOR BASADO EN ORGANOFOSFOHIDROLASA.....	53
3.3.1. Cuantificación de Pesticidas OP en Muestras Sintéticas.....	53
3.3.2. Aplicación del Método Desarrollado en la Determinación de Pesticidas OP en Muestras Reales.....	53
3.4. VALIDACIÓN ANALÍTICA DEL MÉTODO.....	54
3.4.1. Exactitud.....	54
3.4.2. Precisión.....	54
3.4.3. Sensibilidad.....	54
3.4.4. Límite de Detección (LOD).....	55
3.4.5. Límite de Cuantificación (LOQ).....	55
3.4.6. Estabilidad de los Biosensores.....	55
3.4.7. Estudio Cinético de la Reacción Enzimática.....	56

#### CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

---

4.1. SELECCIÓN DEL TRANSDUCTOR Y DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DEL ELECTRODO DE TRABAJO.....	56
A. ELECTRODO GCE PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PESTICIDAS OP POR VOLTAMETRÍA CÍCLICA.....	56

B. ELECTRODO SGE PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PESTICIDAS OP POR VOLTAMETRÍA CÍCLICA.....	57
C.ELECTRODO Ti/TiO <sub>2</sub> PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PESTICIDAS OP POR VOLTAMETRÍA CÍCLICA.....	58
4.2. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DETECCIÓN DE PNP POR AMPEROMETRÍA DE PULSOS.....	59
4.3. DESARROLLO DEL SENSOR AMPEROMÉTRICO MODIFICADO CON LA ENZIMA ORGANOFOSFOHIDROLASA.....	61
4.3.1. Evaluación de la Actividad Enzimática de la Enzima OPH Presente en el Producto Enzimático.....	61
4.3.2. Caracterización de la Uniformidad de la Capa de Biorreconocimiento con Respecto a la Optimización y Estandarización de los Métodos de Deposición.	62
4.3.3. Evaluación de la Estabilidad Enzimática Mediante FTIR.....	62
4.4. BIOSENSORES.....	65
4.4.1. BIOSENSOR SGE/NAU MODIFICADO CON OPH.....	65
4.4.2. BIOSENSOR SGE MODIFICADO CON OPH.....	65
4.4.3. Efecto de la Temperatura.....	65
4.4.4. Cuantificación de Pesticidas OP en Muestras Sintéticas y Reales.....	66
<u>CONCLUSIONES.</u>	70
<u>REFERENCIAS.</u>	71
<u>ANEXOS.</u>	85

## LISTADO DE FIGURAS

Figura	Página
<u>CAPÍTULO 2 ANTECEDENTES GENERALES.</u>	
2.1. Consumo de plaguicidas.....	6
2.2. Consumo Aparente de Plaguicidas, por componentes.....	7
2.3. Producción de plaguicidas (agrícola líquido y agrícola polvo) e insecticidas (fungicidas, herbicidas y defoliantes) de la Encuesta Industrial Mensual.....	8
2.4. Producción de plaguicidas (agrícola líquido y agrícola polvo) e insecticidas (fungicidas, herbicidas y defoliantes) de la Encuesta Mensual de la Industria Manufacturera.....	8
2.5. Comparativo de Producción de Plaguicidas e Insecticidas entre la Encuesta Industrial Mensual y la Encuesta Mensual de la Industria Manufacturera.....	9
2.6. A) Casos registrados por intoxicación de plaguicidas. B) Tasa de incidencia nacional de intoxicación por plaguicidas, México 1995-2012.....	11
2.7. Casos registrados por intoxicación de plaguicidas en Baja California. Del 2010 al 2013.....	12
2.8. Estructura general de los compuestos organofosforados.....	13
2.9. Principales tipos de pesticidas organofosforados (R generalmente es un radical del tipo metil o etil; el grupo liberado X es un alifático, homocíclico-heterocíclico).....	13
2.10. Estructuras de Armas Químicas Neurotóxicas.....	15
2.11. Estructuras de pesticidas organofosforados.....	15
2.12. A) Hidrólisis enzimática de acetilcolina.; B) Inhibición de la acetilcolinesterasa por OP y su reactivación; C) Inhibición de la acetilcolinesterasa por OP y su envejecimiento. (E-serina-OH representa la enzima acetilcolinesterasa).....	17
2.13. Compendio de las técnicas aplicadas en la detección de pesticidas OP...	21
2.14. Esquema de un biosensor.....	25
2.15. Métodos de Inmovilización.....	26
2.16. Esquema de la reacción de hidrólisis catalizada por OPH de los compuestos OP. X es un oxígeno o azufre, R es un grupo alcoxi variando	

	en tamaño de metoxi a butoxi, 'R es un grupo alcoxi o fenólico y Z es un grupo fenoxi, tiol, cianuro o fluor.....	34
2.17.	Ejemplos de estructuras de nanotubos (a) Nanocono de carbono, (b) Nanocuerno de carbono, (c) fullereno, (d)Nanotubo de carbono de pared sencilla, (e) Nanotubo de carbono multipared.....	39

### CAPÍTULO 3 METODOLOGÍA PROPUESTA.

3.1.	Pulido de superficie de electrodo.....	42
3.2.	A) Disolución pura Enzimática, previo a centrifugación. B) Disolución Enzimática centrifugada. C) Sobrenadante de disolución Enzimática.....	
3.3.	Voltamograma cíclico para una solución de PNP 1 mM en solución amortiguadora Britton-Robinson pH 8.5. Electrodo de grafito espectroscópico.....	43
3.4.	Gránulos de Producto Enzimático.....	44
3.5.	Composición del gránulo.....	47
3.6.	Estructura molecular del quitosano.....	47
3.7.	A) Hidrogel de Quitosano entrecruzado [204]. B) Entrecruzamiento de Enzima OPH (E, círculo verde) en Quitosano y Glutaraldehído (G, círculo rojo).....	49
3.8.	OPH inmovilizada en un gel de quitosano sobre la superficie del transductor electroquímico.....	50
3.9.	A) Recubrimiento por goteo y B) recubrimiento por rotación.....	51
3.10.	Reacción enzimática de la enzima-sustrato OPH-Paraoxon.....	52
		53

### CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.	Voltamograma cíclico para una solución de PNP 1 mM en búfer de Britton-Robinson pH 8.5. Electrodo de carbón vítreo.....	
4.2.	Voltamograma cíclico para una solución de PNP 1 mM en búfer de Britton-Robinson pH 8.5. Electrodo de grafito espectroscópico.....	56
4.3.	Voltamograma cíclico para una solución de PNP 1 mM en solución búfer de Britton-Robinson pH 8.5, T= 25 °C. Electrodo de grafito espectroscópico. 50 ciclos evaluados.....	57
4.4.	Comparativo entre Carbón vítreo y Grafito espectroscópico.....	58
4.5.	Curvas de Calibración y Coeficientes de Variación obtenidos al determinar Paraoxon a las concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 µM. Aplicando: 1. Amperometría (•), 2. Amperometría de Pulsos a un	59

	$\tau_{cl}=0.06664$ s (●) y con 3. $\tau_{cl}=0.1666$ s (●).....	
4.6.	Curvas de Calibración y Coeficientes de Variación obtenidos al determinar Paraoxon a las concentraciones de 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360 y 400 $\mu$ M. Aplicando: 1. Amperometría (●), 2. Amperometría de Pulsos a un $\tau_{cl}=0.06664$ s (●) y con 3. $\tau_{cl}=0.1666$ s (●).....	60
4.7.	A) Curva de Actividad Enzimática. B) Ecuación lineal de la Actividad Enzimática.....	60
4.8.	Micrografía en 18X, 500X y 4000X para el recubrimiento por goteo (A, C, E) y por giro (B, C, F).....	61
4.9.	Espectros de FTIR de Quitosano, Enzima OPH y mezcla Enzima/Quitosano.	63
4.10.	Comparativo entre Curvas de Calibración para el Paraoxon a 25 y 50°C.	64
4.11.	Curvas de Calibración para los pesticidas A) Paraoxon, C) Paratión etil y D) Paratión metil. Y Rangos de linealidad para B) Paraoxon, D) Paratión etil y E) Paratión metil.....	66
4.12.	Estabilidad del Biosensor a través del Tiempo.....	67
		68

## LISTADOS DE TABLAS

Figura	Página
<u>CAPÍTULO 2 ANTECEDENTES GENERALES.</u>	
2.1. Clasificación de Plaguicidas.....	14
2.2. Niveles máximos permitidos de pesticidas organofosforados en agua potable..	20
<u>CAPÍTULO 3 METODOLOGÍA.</u>	
3.1. Parámetros para la determinación de PNP en PAD.....	46
3.2. Comparación Gota-recubrimiento y recubrimiento por rotación.....	52
<u>CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</u>	
4.1. Datos para calcular ecuación de la recta para Actividad Enzimática.....	62
4.2. Datos obtenidos de la evaluación de pesticidas.....	66
4.3. Valores de Km, Vmax, Km/Vmax para cada sustrato analizado.....	69

## NOMENCLATURA

AChE	= ACETILCOLINESTERASA
CESVBC	= COMITÉ ESTATAL DE SANIDAD VEGETAL DE BAJA CALIFORNIA
COFEPRIS	= COMISIÓN FEDERAL PARA LA PROTECCIÓN CONTRA RIESGOS SANITARIOS
DDT	= DICLORODIFENILTRICLOROETANO
ECBC	= EDGEWOOD CHEMICAL BIOLOGICAL CENTER/CENTRO QUÍMICO BIOLÓGICO EDGEWOOD
EPA	= ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY/AGENCIA DE PROTECCIÓN AMBIENTAL
GC	= GLASS CARBON/CARBONO VÍTREO
OP	= ORGANOFOSFORADO
OPH	= ORGANOFOSFOHIDROLASA
PAD	= PULSES AMPEROMETRY DETECTION/AMPEROMETRÍA DE PULSOS
PNP	= PARANITROFENOL
SG	= SPECTRUM GRAPHITE/GRAFITO GRADO ESPECTROSCÓPICO
VC	= VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

### 1.1. INTRODUCCIÓN.

Durante las últimas décadas la agricultura ha tenido grandes avances, a nivel mundial se tiene un promedio de 1,476724.51 miles de hectáreas de superficie sembrable, de las cuales México mantiene valores promedio de 20 millones de hectáreas, dándose incrementos de hasta un 23%, de 1980 al 2011. Esto sería imposible, sin uno de sus impulsores principales que son los plaguicidas, los cuales, han tenido incrementos en su consumo en más de un 200% en los últimos 20 años [1], sin embargo, este aumento no ha sido proporcional a las superficies cultivadas.

Los plaguicidas presentan un evidente potencial económico, en términos de la producción creciente de alimentos, son de amplio uso en el sector agrícola con la finalidad de llevar a control plagas y enfermedades que puedan mermar el rendimiento y calidad de los cultivos. Además, su uso ayuda a tener en menor tiempo; una mayor producción agropecuaria. Dando oportunidad a tener mayores cosechas, con beneficios directos y positivos hacia el agricultor y el consumidor final; por la respectiva reducción de costos. Esto ha ocasionado su uso excesivo y su presencia residual en los productos, más allá de lo permitido de acuerdo a la normatividad vigente, desencadenando en una exposición directa e indirecta para la población, principalmente a través de los alimentos procesados, aire, ríos, lagos, fauna, flora y resto del medio ambiente. Exposición que se da en bajas dosis, pero al ser en forma crónica en muchos de los casos es muy perjudicial. El agua es una de los elementos mayormente contaminados y más críticos debido a su importancia implícita, esta se contamina durante el riego de los cultivos tratados con plaguicidas, es agua que no se alcanza a purificar por sí misma, llevando este contaminante a otros lugares, y siendo consumida por la población o utilizada nuevamente para riego. Cabe mencionar que en nuestro país, el agua para uso potable, solo es evaluada en búsqueda de pesticidas organoclorados, dejando de lado el resto de los plaguicidas, lo que constituye un riesgo latente para la población.

De acuerdo a las diversas fuentes consultadas, "un plaguicida se define como cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores que transmiten las enfermedades humanas y de animales, las

especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal, por ejemplo, las que causan daño durante el almacenamiento o transporte de los alimentos u otros bienes materiales, así como las que interfieran con el bienestar del hombre y de los animales. También se incluyen en esta definición las sustancias defoliantes y las desecantes [2]. De acuerdo a su estructura, simplemente se clasifican como organofosforados, organoclorados, piretroides y carbamatos [3].

Los primeros compuestos utilizados como tal en la agricultura, fueron de tipo sulfuroso y arsenical, buscando efectos fungicidas e insecticidas, respectivamente; restringiéndose posteriormente debido a su alta toxicidad. En la búsqueda e investigación de nuevas opciones, aparecieron los pesticidas organoclorados, representados ampliamente por el Diclorodifeniltricloroetano (DDT), el cual se utilizó enormemente durante décadas hasta que se descubrieron sus inconvenientes. Entre los que destacan su alta persistencia y lipofilia, haciéndolo bioacumulable e implicando una severa afectación hacia el medio ambiente; por esta razón su uso se reguló y en otros casos se prohibió. Mientras en otros países el DDT era restringido y hasta prohibido, en México se comenzó a utilizar después de la segunda mitad del siglo pasado y actualmente sigue siendo autorizado aunque con ciertas restricciones.

En los países desarrollados se comenzó a utilizar mezclas de otros plaguicidas menos tóxicos y de menor persistencia en el ambiente, incluso se usaron combinaciones con otros productos orgánicos. Dejando de lado, aparentemente, a los organoclorados y empezando a usar mayormente los organofosforados, piretroides y carbamatos; teniendo gran preponderancia los primeros. Los primeros registros de su conocimiento y existencia datan del siglo XVIII, aunque no es hasta finales de la década de los 30's y principios de los 40's que se comienza a usar como insecticida. Primeramente sintetizan Bladan, conteniendo tetraetilpirofosfato (TEPP) y posteriormente se sintetiza uno de los más conocidos y utilizados hasta el momento, paratión. Estos pesticidas presentan menor persistencia, estabilidad y bioacumulación; haciéndolo ideal para su aplicación en hortalizas, árboles frutales, cereales y plantas de ornato. Así como en áreas domésticas, urbanas y de salud pública. Son generados a partir de las armas químicas, por lo que comparten su estructura.

Considerando el uso indiscriminado que se ha dado en las últimas décadas de estos pesticidas, para algunos países el llevarlo a control es parte ya de los lineamientos oficiales y primordiales; mayormente por sus efectos secundarios, desconocidos inicialmente. Y al

ser el agua uno de las áreas más afectadas, por su importancia implícita y ser un líquido imprescindible para el desarrollo humano. La presencia de estos contaminantes, aunado al desabasto actual que existe de ella; lo convierte en una situación de riesgo y peligro. Generando que diversas entidades busquen métodos cada vez más rápidos y efectivos, para la detección y de ser posible, la limpieza y descontaminación de este líquido.

En el presente trabajo se aprovechan los principios químicos que tienen en común las armas químicas nerviosas y los pesticidas organofosforados, ambos sustratos específicos para la enzima Organofosfohidrolasa (OPH). Para lograr el objetivo de encontrar un método de detección rápida y precisa de este tipo de compuestos, estando en un medio acuoso. Se diseñó y desarrolló un biosensor seleccionando mediante Voltamperometría Cíclica (VC) el transductor, en este caso Grafito grado Espectroscópico. Posteriormente se realizó la optimización de parámetros de trabajo por Amperometría de Pulsos (PAD) y por último, fue modificado con un producto, contenedor de la enzima OPH; además se realizó la evaluación de pesticidas sintéticos y muestras reales de agua potable. El producto enzimático forma parte de los métodos más recientes de limpieza y descontaminación de agua, con el que cuenta el ejército estadounidense, utilizado específicamente para la neutralización de armas químicas. El producto fue desarrollado por el Centro Químico Biológico Edgewood del Ejército de EE.UU (ECBC).

## 1.2. HIPÓTESIS.

Se espera la cuantificación de pesticidas organofosforados mediante la técnica electroanalítica de amperometría de pulsos así como el uso de diversos sensores modificados con nanopartículas de oro y con la enzima Organofosfohidrolasa. Ya que esta técnica, limita la contaminación y pasivación del electrodo, obteniéndose así una alta sensibilidad, reproducibilidad y repetibilidad en la determinación y resultados.

## 1.3. JUSTIFICACIÓN.

En México SEMARNAT en conjunto con otras dependencias desarrollaron diversos indicadores medioambientales, dentro de los que se encuentra la Disponibilidad de Agua, también denominada "Disponibilidad natural media de agua per cápita", este indicador evalúa el posible estrés que pueden enfrentar los habitantes de una región o país dado, considerando que valores menores a 1 700 m<sup>3</sup> por habitante por año, constituye una situación de estrés hídrico. De 1950 al 2010, este valor ha bajado en un 76%, es decir de los

17,742 m<sup>3</sup>/hab/año disponibles inicialmente, disminuyo a 4,090 m<sup>3</sup>/hab/año para el año 2010 [4]; siendo las regiones con menor disponibilidad per cápita: las Aguas del Valle de México, Río Bravo y nuestro estado junto con Baja California Sur, presentando valores de 164, 1107 y 1234 m<sup>3</sup>/hab/año, respectivamente.

Algunos de los efectos de una exposición excesiva de plaguicidas sobre la salud humana son: toxicidad neurológica aguda, deterioro neurológico crónico, disfunción de los sistemas inmunológico, reproductor, respiratorio y endocrino. Presentándose a corto plazo intoxicaciones agudas sobre todo en la población ocupacionalmente expuesta y a largo plazo, afectaciones sistémicas en el organismo. La exposición crónica indirecta de la población general a través del aire, el agua y los alimentos contaminados con residuos de plaguicidas, promueve también; su introducción a las cadenas tróficas, generando una alteración ecológica. Y como consecuencia la bioacumulación y biomagnificación de sus efectos en los organismos que alcanza a entrar. Aunado a esto, se desarrollan mecanismos de resistencia en las plagas agrícolas y en vectores transmisores de enfermedades.

Tomando como base la situación actual del agua en nuestro país, en términos de su disponibilidad per cápita y cobertura de agua potable, además de los riesgos latentes implícitos en los plaguicidas. La protección de la calidad del agua potable es una de las disposiciones principales para cualquier país. Es importante que la misma cumpla con las propiedades y características consideradas aptas para el consumo humano, con el fin de evitar enfermedades y riesgos a la población. De ahí la importancia de tener un método alternativo para la detección y cuantificación de plaguicidas organofosforados en agua potable, el cual debe ser rápido, selectivo y preciso; además de poder realizarse en tiempo real, acorde con las últimas tendencias analíticas. Todos estos requisitos, son cubiertos perfectamente por los biosensores, por tal motivo se desarrolla y presenta esta investigación como una alternativa de detección para los mismos.

#### 1.4. OBJETIVOS.

##### 1.4.1. General.

Desarrollo de un nuevo enfoque para la cuantificación de pesticidas organofosforados, aplicando la técnica de amperometría de pulsos y desarrollando un

sensor modificado con Organofosfohidrolasa y nanopartículas de oro, logrando la mejora del rendimiento analítico.

#### 1.4.2. Específicos.

1. Selección del transductor y de parámetros de trabajo para la optimización del nuevo biosensor amperométrico modificado con OPH.
2. Evaluación de la sensibilidad del biosensor modificado con OPH y nanopartículas de oro.
3. Evaluación de la actividad enzimática, selección del método de inmovilización y caracterización de la uniformidad de la capa de biorreconocimiento con respecto a la optimización y estandarización de los métodos de deposición.
4. Cuantificación de pesticidas organofosforados (OP) en muestras sintéticas y reales por amperometría de pulsos usando el sensor basado en OPH.
5. Validación del método empleando técnicas de análisis estadístico.

## CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES GENERALES.

### 2.1. PLAGUICIDAS.

Los plaguicidas se han empleado extensamente en las últimas décadas debido a su capacidad biocida y amplio espectro en muchos de los casos, con el fin de asegurar una mejor producción agrícola, junto a una mayor calidad alimentaria. El término incluye una gran variedad de productos químicos y biológicos utilizados para matar o controlar diversas plagas y enfermedades. Se utilizan en todo tipo de cultivos, además de tener uso industrial, veterinario, doméstico e incluso farmacéutico, entre otros.

#### 2.1.1. Consumo y Producción.

A nivel mundial el consumo de plaguicidas se ha duplicado durante los últimos 30 años [1], tal como se muestra en la figura 2.1.

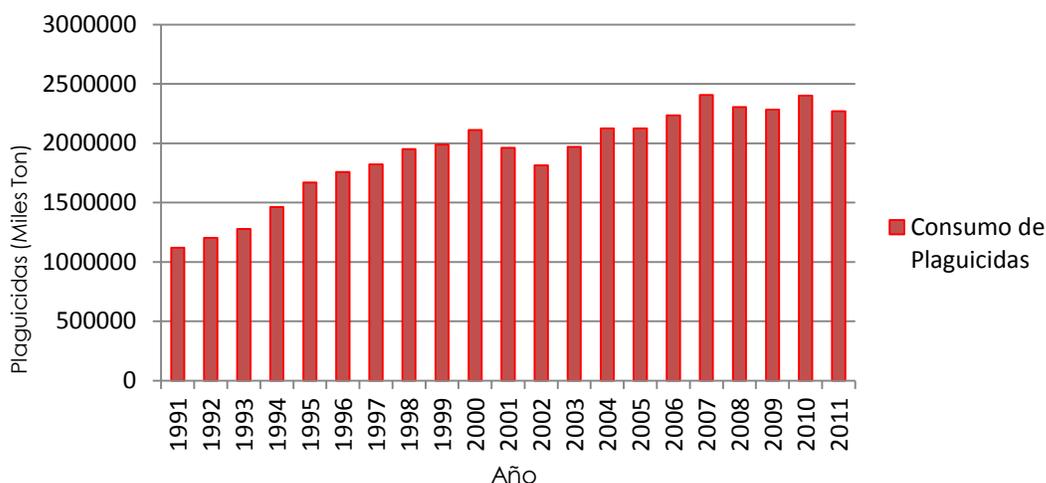


Fig. 2.1. Consumo de plaguicidas.

Su uso ha favorecido enormemente la agricultura en nuestro país, minimizando las bajas eficiencias asociadas a pestes y enfermedades que tentativamente pueden contraerse. En contraparte y con el fin de erradicar completamente estos problemas asociados a plagas, los agricultores recurren continuamente a los plaguicidas, sin una capacitación adecuada sobre su uso y manejo, generando exposición innecesaria y

excesiva de los mismos, tanto en la población laboral, como en la población en general, esto último debido a su aplicación desmesurada en los cultivos; más allá de las recomendaciones que los proveedores o las dependencias gubernamentales puedan dar. En México la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), a través de su Catálogo de Pesticidas, indica los plaguicidas autorizados y regula todos los puntos referentes a su aplicación; estas indicaciones pocas veces se cumplen, la mayoría de las veces por la falta de vigilancia que existe al respecto.

Así mismo, anualmente la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) evalúa una serie de indicadores, destacando el Consumo Aparente de Plaguicidas, el cual incluye información de la producción nacional, más la cantidad de material importado, menos el producto que es exportado y toma datos de referencia de la Industria Química en México y del Sector Alimentario. A partir de estos datos, y al hacer el análisis de la figura 2.2, podemos deducir que el consumo de plaguicidas ha estado claramente en aumento en los últimos años.

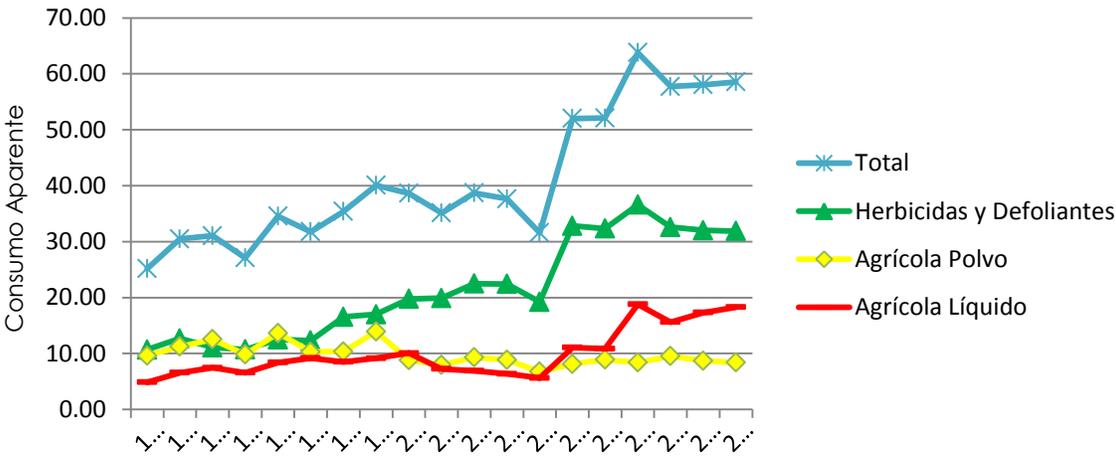


Fig. 2.2. Consumo Aparente de Plaguicidas por componentes.

La producción nacional de plaguicidas e insecticidas en México, inicialmente se manejó con la Encuesta Industrial Mensual (EIM), de la cual se tienen registros oficiales de 1994 al 2010; estaba basada únicamente en la Clasificación Mexicana de Actividades y Productos (CMAP), elaborado por el Instituto Nacional de Geografía y Estadística (INEGI); la cual se muestra en la figura 2.3. [4].

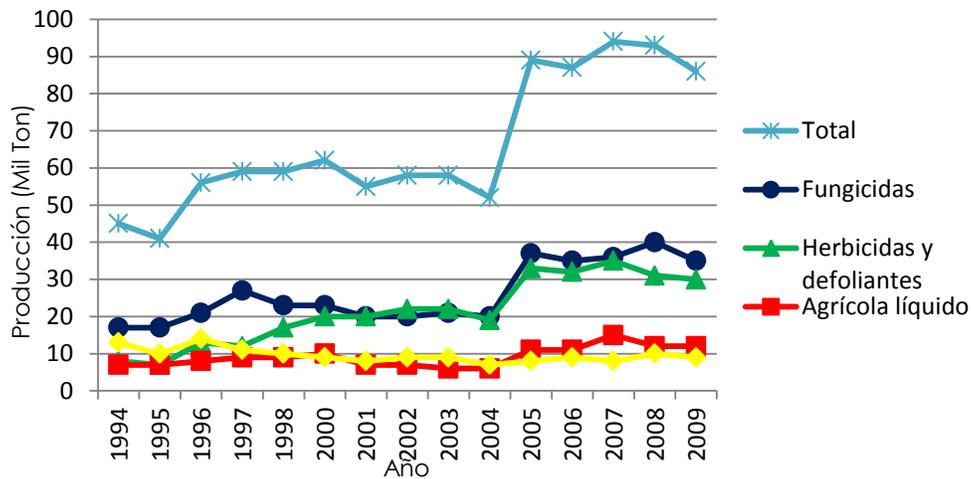


Fig. 2.3. Producción de plaguicidas (agrícola líquido y agrícola polvo) e insecticidas (fungicidas, herbicidas y defoliantes) de la Encuesta Industrial Mensual.

A partir de 2010, se dejó de lado para llevarse a cabo la Encuesta Mensual de la Industria Manufacturera (EMIM) mostrada en la figura 2.4.

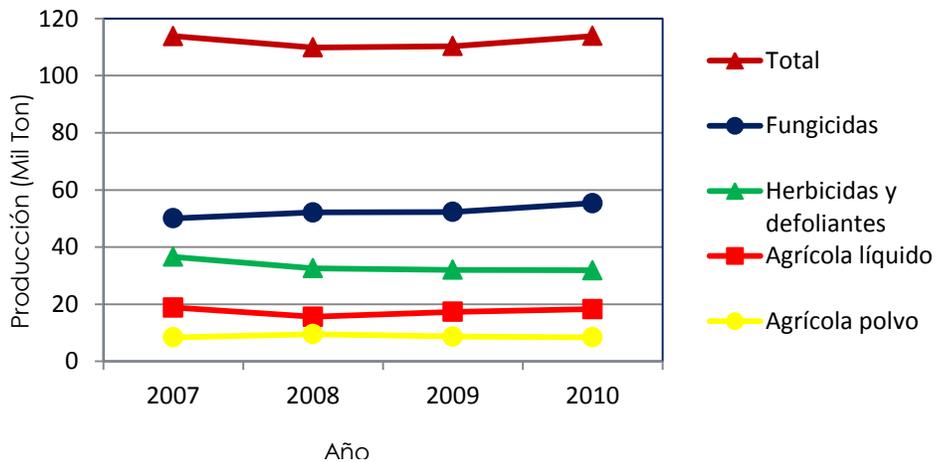


Fig. 2.4. Producción de plaguicidas (agrícola líquido y agrícola polvo) e insecticidas (fungicidas, herbicidas y defoliantes) de la Encuesta Mensual de la Industria Manufacturera.

Esta encuesta se basa en el Sistema de Clasificación Industrial de América del Norte (SCIAN), obteniéndose datos de empresas que conforman el programa para la Industria Manufacturera, Maquiladora y de Servicios de Exportación (IMMEX), regulado por la Secretaría de Economía; también incluye información de empresas que no la conforman y referencias provenientes de Censos Económicos. Al comparar los datos reportados por ambas encuestas durante los mismos años, se encuentran diferencias marcadas en los totales presentados, ya que la primera solo incluye información estadística, la segunda;

considera esta información más los datos que IMMEX puede proporcionar y que no necesariamente se incluye en los censos, como se puede observar en la figura 2.5. En ambos casos, se nota una tendencia marcada hacia el incremento en la producción de los plaguicidas, principalmente en los de tipo herbicida, incremento que responde a una demanda del mercado de consumo.

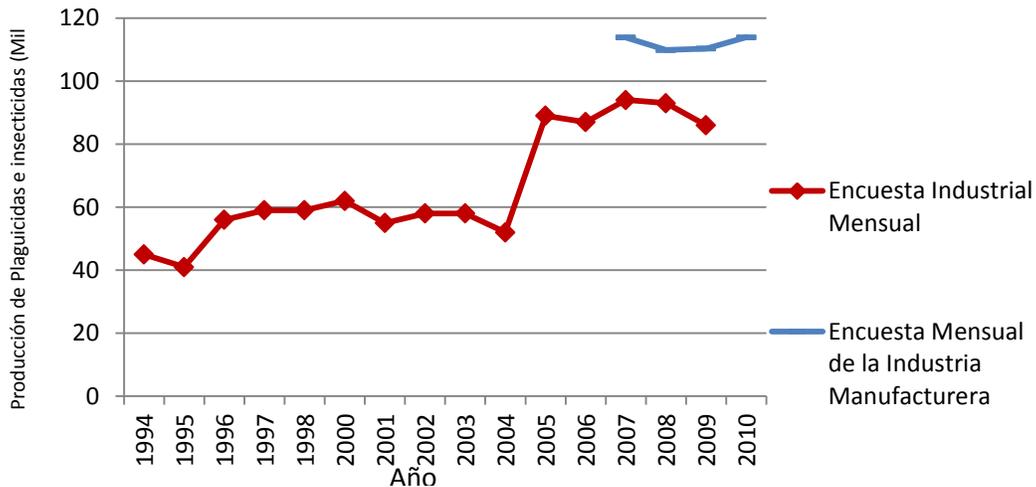


Fig. 2.5. Comparativo de Producción de Plaguicidas e Insecticidas entre la Encuesta Industrial Mensual y la Encuesta Mensual de la Industria Manufacturera.

A nivel nacional y por parte de los Comités Estatales de Sanidad Vegetal (CESV), se lleva en el campo, el programa: Sistema de Reducción de Riesgos de Contaminación, el cual brinda capacitación y busca apoyar con la recolección de todos los envases vacíos de plaguicidas desechados. Involucra únicamente a los horticultores, el resto son excluidos. Es un programa con carácter semiobligatorio, también se brinda el mismo servicio a todo aquel agricultor que desea entregar sus envases, este dentro o no del sistema. En Baja California se tiene un Padrón de 189 Empresas de Hortalizas Frescas, tan solo 106 están inscritas en el Programa antes mencionado [5]. Debido a estas deficiencias, el programa solo brinda información acerca del material entregado a los centros de acopio, no permite inferir si se está disponiendo todo el material comprado, ya que no existe un control sobre esto último. De acuerdo a los últimos datos entregados, durante el año del 2013, este Comité recolectó 308,393 envases, equivalentes al consumo de 90 toneladas de plaguicidas en Baja California.

## 2.1.2. Intoxicaciones y Contaminación.

De acuerdo con el Boletín Epidemiológico de la Secretaría de Salud [6], de 1995 al 2012, se registraron un total de 67711 casos de intoxicación por plaguicidas en todo el país por cada 100,000 habitantes (Fig. 2.5B); el análisis de afectación por grupos de edades, muestra que el grupo entre 25 a 44 años, se encuentra en primer lugar con un 30.91%; en segundo lugar las edades entre 15 a 24 años con un 29.20%. El resto de los porcentajes de incidencias está comprendido en grupos con edad menor de 15 años y mayor de 44 años (Fig. 2.6A). El 71.02% de las intoxicaciones fueron del sexo masculino, considerando este y la preponderancia en los grupos de edad afectados mayormente, muestra que continua siendo un riesgo asociado a la actividad laboral, la exposición a estos químicos.

En la figura 2.6B) se aprecia que en 1996 tuvo su máximo registro de eventos, disminuyendo gradualmente hasta el 2002, y manteniéndose variante hasta hace 4 años, tiempo desde el cual se ha observado una marcada tendencia a aumentar este tipo de eventos.

A nivel estatal y tan solo en el último año, se han registrado desde el 2010 al 2013 un total de 145 intoxicaciones por plaguicidas [7], como se muestra en la figura 2.7. De nueva cuenta, se observa que el principal grupo afectado, recayó en los grupos de 15 a 24 años, y de 25 a 44 años. Durante esta investigación, la autoridad informa que no se lleva un control estadístico por plaguicida en particular, los registros que se tienen, se dan por que el afectado, manifiesta la intoxicación por dicho contaminante, pudiendo ser mayor la proporción de personas afectadas, al desconocer la causa de su intoxicación.

Aunado a esto, existen evidencias ampliamente documentadas que demuestran los riesgos derivados del manejo de plaguicidas organofosforados y su respectiva exposición, así como los efectos que conllevan en la salud pública, tanto a nivel agrícola, como a nivel industrial. En nuestro país se han llevado a cabo varios estudios al respecto; en Sonora se detectó la presencia de diazinon, clorpirifos, malatión y paratión en muestras de semen, sangre y orina de trabajadores de la industria de plaguicidas [8].

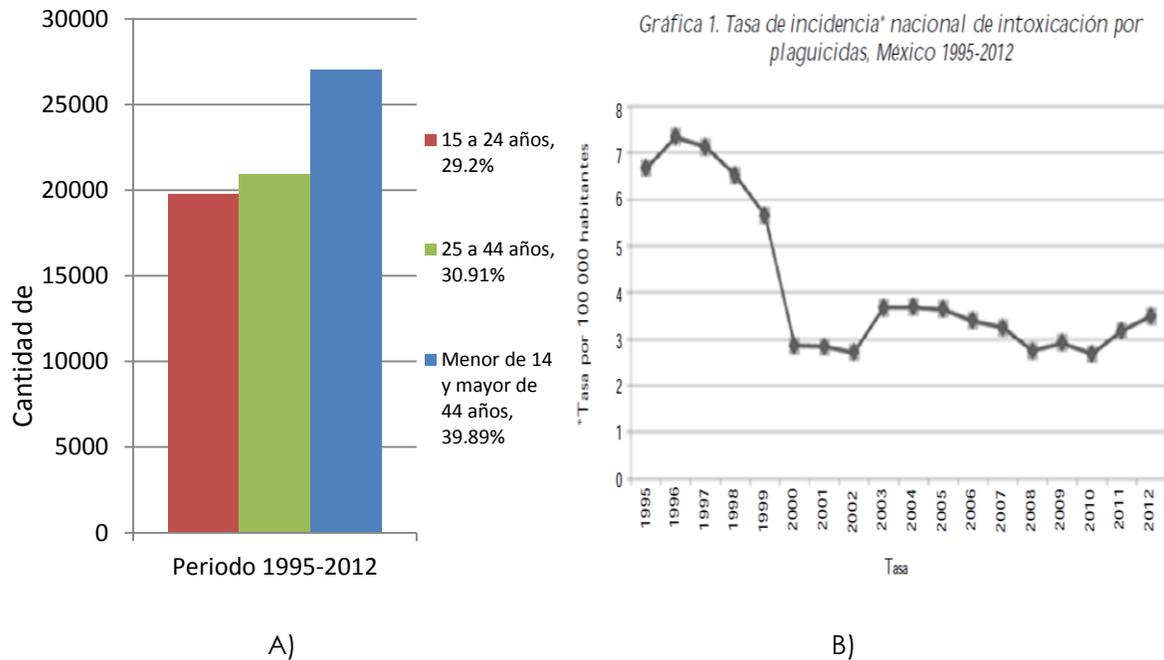


Fig. 2.6. A) Casos registrados por intoxicación de plaguicidas. B) Tasa de incidencia nacional de intoxicación por plaguicidas, México 1995-2012 [8].

Estudios recientes se inclinaron por evaluar la calidad del aire presente en áreas de trabajo donde los plaguicidas son elaborados, ya que es el personal primariamente expuesto a ellos, en Corea se realizó un estudio de este tipo, en 4 fábricas donde se sintetiza clorpirifos, EPN, paratión y forato; las muestras se evaluaron con el método validado por el Instituto Nacional de Seguridad Ocupacional (NIOSH); para la determinación de la concentración media aritmética presente en el aire contra tiempos de exposición. Para la mayoría de los plaguicidas evaluados, los resultados cumplieron los parámetros permitidos por el Límite de Exposición Ocupacional Coreano, excepto para clorpirifos, aun cuando estaba en la concentración máxima permitida, se exceda el tiempo de exposición [9].

En Muna, Yucatán se realizó una prueba estadística dirigida por Pérez Herrera y colaboradores [10]; a un grupo de 100 agricultores expuestos a plaguicidas, juntamente con sus esposas; buscando identificar los efectos en la salud reproductiva; comparando los resultados con un grupo similar de la misma comunidad, pero contacto con plaguicidas. Los resultados mostraron mayor incidencia de abortos, embarazos pretérmino y óbitos; así como disminución en la calidad del semen y daño en el ADN espermático en los agricultores que el grupo de control.

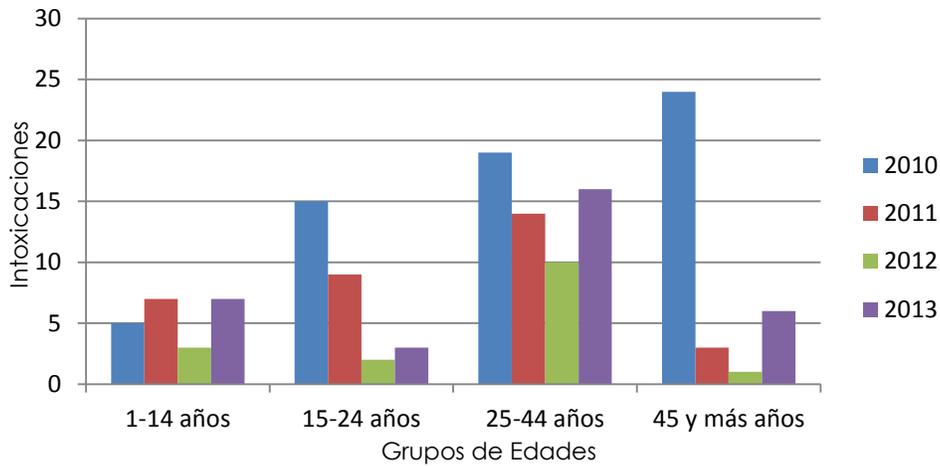


Fig. 2.7. Casos registrados por intoxicación de plaguicidas en Baja California. Del 2010 al 2013.

Además, su consumo excesivo en la agricultura ha derivado en la contaminación de alimentos y cuerpos de agua diversos. Análisis en muestras de leche de cabra [11], en la ciudad de Querétaro, Querétaro; demostró la existencia de residuos de plaguicidas organoclorados y de sus metabolitos, los pesticidas encontrados fueron heptacloro, epóxido de heptacloro, endosulfán I y  $\alpha$ -HCH, y con menor frecuencia  $\beta$ -HCH, DDD, dieldrín, endrín y endosulfán II. Siendo endosulfán I,  $\gamma$ -HCH,  $\beta$ -HCH y de p,p'DDD los valores más altos. En la bahía de Ouirá, en Topolobampo Sinaloa, se analizaron muestras de camarón [12], también encontrando residuos de más de 16 plaguicidas organofosforados en los mismos, por encima los límites máximos. Estudios profundos en ríos y bahías, encontraron distintos pesticidas y en grandes cantidades pululando las zonas de investigación, tal es el caso de la Ciénega de Santa Clara en Baja California [13], ríos en Guasave, Sinaloa [14], el Valle de Culiacán, Sinaloa [15] y en Valle de Bravo, Amalco [16] y a nivel internacional también es reportado, como es lo publicado por Peruzzo y colaboradores, donde analizan efecto de los cultivos en agua superficial y en los sedimentos [17].

## 2.2. PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS.

En la tabla 2.1 se describen las diversas clasificaciones que pueden tener los pesticidas, de acuerdo al Catálogo de Plaguicidas, que genera la dependencia gubernamental mexicana llamada COFEPRIS.

A nivel internacional, solo existe clasificación en función de su estructura química y de su organismo de control [3]. Atendiendo a su estructura, nos enfocaremos en los pesticidas clasificados como organofosforados, los cuales al ser considerados no bioacumulables, su uso se ha extendido enormemente en los últimos años, dejando de lado la toxicidad aguda que presentan.

### 2.2.1. Estructura.

Son compuestos químicos que presentan grupos funcionales estables conteniendo en mayor o menor medida, los enlaces P-O, P-S, P-N o P-CN; algunos son derivados orgánicos de ácidos inorgánicos fosforados. Están relacionados principalmente con plaguicidas y armas químicas de ataque nervioso, debido a sus semejanzas atómicas. La gran mayoría puede representarse con la siguiente estructura general [18, 19, 20], mostrada en la figura 2.8.

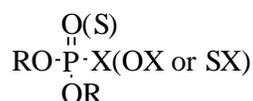


Fig. 2.8. Estructura general de los compuestos organofosforados [18, 19, 20].

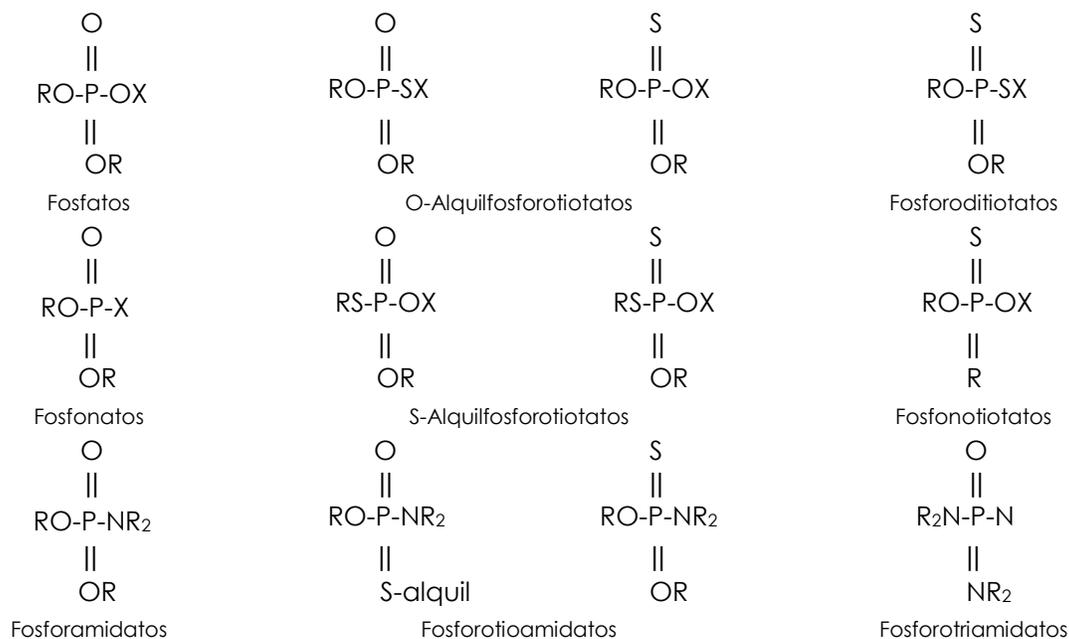


Fig. 2.9. Principales tipos de pesticidas organofosforados (R generalmente es un radical del tipo metil o etil; el grupo liberado X es un alifático, homocíclico-heterocíclico) [21].

## Clasificación de Pesticidas

Organismos de Control	Insecticida, Acaricida, Fungicida, Bactericida, Antibiótico, Herbicida, Rodentícida y Molusquícida.
Concentración	<p>Plaguicida técnico: contiene la máxima concentración del ingrediente activo obtenida como resultado final de su fabricación, de la cual se parte para preparar un plaguicida formulado (NOM-045-SSA1-1993).</p> <p>Plaguicida formulado: mezcla de uno o más plaguicidas técnicos, con uno o más ingredientes conocidos como "inertes", cuyo objeto es dar estabilidad al ingrediente activo o hacerlo útil y eficaz; constituye la forma usual de aplicación de los plaguicidas (NOM-045-SSA1-1993).</p>
Modo de acción	<p>De contacto: Actúa principalmente al ser absorbido por los tejidos externos de la plaga</p> <p>De ingestión: Debe ser ingerido por la plaga para su acción efectiva.</p> <p>Sistémico: Al aplicarse en plantas o animales, se absorbe y traslada por su sistema vascular a puntos remotos del lugar en que se aplica y en los cuales actúa.</p> <p>Fumigante: Se difunde en estado gaseoso o de vapor y penetra por todas las vías de absorción.</p> <p>Repelente: Impide que las plagas ataquen.</p> <p>Defoliante: Causa la caída del follaje de las plantas.</p>
Uso al que se destinan	<p>Agrícolas: sistemas de producción agrícola y en productos y subproductos de origen vegetal.</p> <p>Forestales: bosques y maderas</p> <p>Urbanos: áreas urbanas, industriales, áreas no cultivadas, drenes, canales de riego, lagos, presas, lagunas y vías de comunicación.</p> <p>Jardinería: jardines y plantas de ornato.</p> <p>Pecuarios: animales o instalaciones de producción intensiva o extensiva cuyo producto será destinado al consumo humano o a usos industriales. Incluye animales domésticos.</p> <p>Domésticos: interior del hogar.</p> <p>Industriales: materia prima en el proceso industrial para la formulación de plaguicidas o productos de uso directo. (NOM-045-SSA1-1993, NOM-046-SSA1-1993)</p>
Composición Química	<p>Compuestos inorgánicos: compuestos que carecen de carbono. En este catálogo sólo se consideran los derivados de cobre, azufre, zinc y aluminio.</p> <p>Compuestos orgánicos: contienen átomos de carbono en su estructura química, la mayoría son de origen sintético, fabricados a partir de compuestos químicos básicos; algunos son extraídos de plantas, por lo que se conocen como botánicos. Los compuestos orgánicos sintéticos utilizados como plaguicidas pertenecen a distintos grupos o familias químicas. Cada uno de estos grupos tiene algunas características comunes y en cualquiera de ellos puede haber insecticidas, acaricidas, herbicidas, fungicidas u otros tipos de plaguicidas.</p> <p>Plaguicidas biológicos: Se llama así a los virus, microorganismos o sus metabolitos, formulados como insumos, que pueden controlar a una plaga en particular. (PPP-6)</p>

Tabla 2.1 Clasificación de Plaguicidas [22].

Por estas diferencias entre los elementos presentes ya mencionadas, se generan subclasificaciones [21]. En la figura 2.9 se muestran algunas estructuras características de estos pesticidas. Estos compuestos comparten el mismo tipo de estructura con las armas neurotóxicas; en la Figura 2.10, se muestran algunos ejemplos de estas últimas.

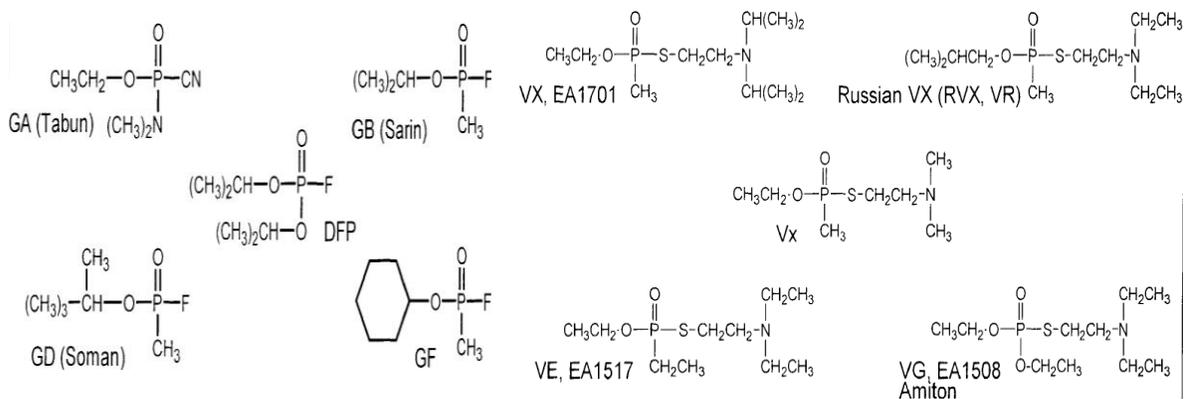


Fig. 2.10. Estructuras de Armas Químicas Neurotóxicas [23].

Las armas de tipo G, presentan los enlaces característicos P-F, P-O, P-CN, e incluso P-N; las del tipo V, muestran P-S y P-O. Coincidiendo los tipos de enlace con las estructuras de Paratión, Paratión metil, Paraxon y Fenitrotión por ejemplo, mostrados en la figura 2.11.

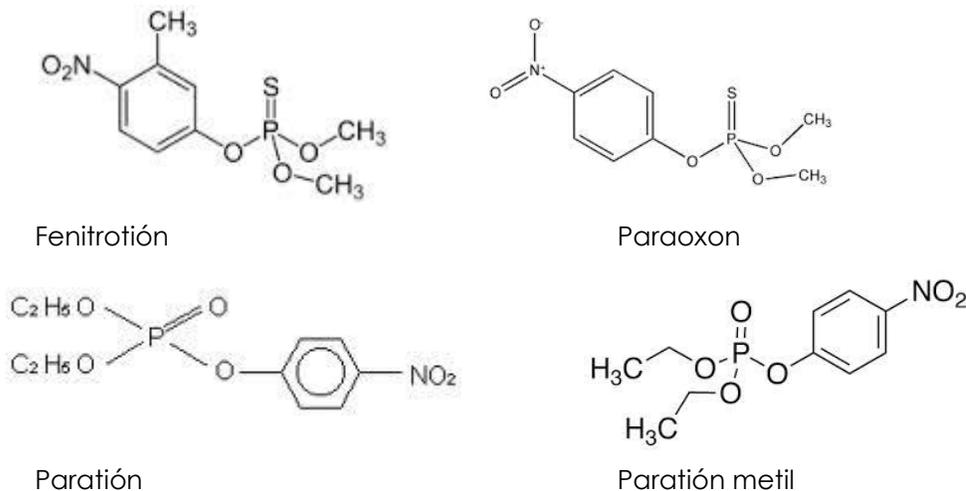


Fig. 2.11. Estructuras de pesticidas organofosforados.

Recordando que las variaciones estructurales, confieren diferencias en las propiedades físicas, químicas y biológicas de sustancias, aun siendo del mismo grupo o familia. Los pesticidas OP; no son la excepción, muchos compuestos, incluyendo estos pesticidas, contienen centros estructurales de asimetría, confiriéndole la propiedad de

estereoisomería, conocida como quiralidad, estos compuestos existen en dos o más formas, de acuerdo a la cantidad de centros quirales presentes, también son denominados como enantiómeros. Fonofos y malatión son un ejemplo, sus estereoisómeros pueden tener diferentes propiedades biológicas, lo cual es muy importante durante las evaluaciones toxicológicas. Al respecto y con este fin, se han llevado a cabo diversas investigaciones y de esta forma entender las biotransformaciones que generan su neurotoxicidad [24], las vías existentes para retrasar sus efectos neuropáticos en pacientes [25] y como disminuir su uso para proteger el medio ambiente, de acuerdo a sus propiedades de enantioselectividad [26].

Algunos de estos plaguicidas exhiben una toxicidad aguda; ya que pertenecen a la clase de toxicidad I (altamente tóxico), y II (moderadamente tóxico), según la clasificación de la EPA.

Aunque en promedio son considerados de baja persistencia, presentan excepciones como el diazinón, el cual es uno de los más persistentes con una vida media (VM) en suelo de 90 días, en contraste con el Malatión y Paratión que tienen una VM de una semana, aunque es importante notar que este último pesticida puede bioacumularse como su metabolito, es decir; en forma de Paraoxon, siendo este aún más persistente [27].

### 2.2.2. Efectos en la Salud y Marco Legal.

Debido a que tienen una persistencia moderada comparándolos contra otros pesticidas, su uso generalizado y en ocasiones desproporcionado, representa un riesgo para el hombre y su medio ambiente. La contaminación de pesticidas se genera por prácticas agrícolas, residuos o descargas industriales, filtración de material tóxico enterrado, y a partir de escurrimientos durante aspersiones.

El modo de acción bioquímico de los plaguicidas organofosforados implica principalmente la inhibición de enzimas colinesterasas; principalmente de la enzima acetilcolinesterasa. Ocurriendo a lo largo del sistema nervioso central y periférico, mediante la fosforilación de los hidroxilos presentes en la serina, ligados al sitio activo de la enzima, evitando así la realización de la hidrólisis de la acetilcolina; un neurotransmisor, de forma similar a lo mostrado en la figura. 2.12A) [18, 21, 28]. La acumulación resultante de acetilcolina en el nervio interrumpe la sinapsis neuronal, afectando la respuesta muscular y generando serias afectaciones en órganos vitales, dándose la muerte en casos severos.

La enzima fosforilada es hidrolizada por el agua, sucediendo una lenta recuperación, dependiendo de la naturaleza del radical R, la reactivación enzimática tiende a disminuir en los demetoxi, seguida por los dietoxi y finalizando con los diisopropoxi, gracias a la hidrólisis espontánea (Fig. 2.12B). Debido a que el agua es un débil nucleofílico, reactivaciones más rápidas suceden por el ataque de algunos derivados de las hidroxilaminas, conocidas como oximas; las cuales son utilizadas en terapias de intoxicación [29, 30]. No obstante, la inhibición irreversible de la enzima es presentada mediante el proceso de "Envejecimiento", el cual consiste en la pérdida del grupo alquilo ó alcoxi, presente en el residuo fosforilo unido a la serina del sitio activo de la enzima (fig. 2.12C). La única forma de reemplazarla, es por la síntesis de nuevas enzimas del mismo tipo, proceso que tomaría varios días [31].

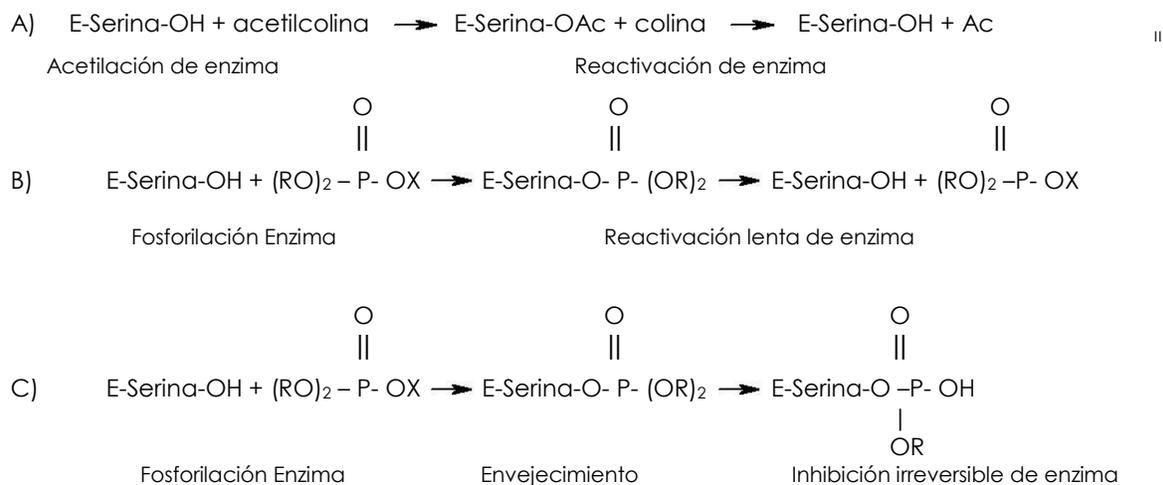


Fig. 2.12. A) Hidrólisis enzimática de acetilcolina.; B) Inhibición de la acetilcolinesterasa por OP y su reactivación; C) Inhibición de la acetilcolinesterasa por OP y su envejecimiento. (E-serina-OH representa la enzima acetilcolinesterasa).

Recientemente ha cobrado interés la afectación e inhibición de la enzima Butirilcolinesterasa (BuChE), como un indicador de exposición humana [32], ya que esta enzima inactiva los pesticidas al enlazarlos a la Ser198, al pasar las horas o días, puede suceder también el proceso de envejecimiento de la misma también por desalquilación. Es muy utilizado a nivel forense.

Estos procesos enzimáticos se reflejan como situaciones de crisis que pueden llevar a la muerte y han llevado a generar directrices para el control y detección de sus residuos y metabolitos, los cuales son más tóxicos y estables que los pesticidas de los que derivan. Su

producción, distribución, uso, exposición, niveles ambientales y tolerancias máximas en alimentos y agua potable; son objeto de una reglamentación de conformidad con las siguientes organizaciones principalmente: Comisión Europea (CE), Agencia Federal de Protección al Ambiente (EPA), Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización de Alimentos y Agricultura (FAO) y la Comisión del CODEX ALIMENTARIO a nivel internacional; así como COFEPRIS y los Comités Estatales de Sanidad Vegetal a nivel nacional y estatal.

Los residuos en las frutas y verduras, cereales, alimentos procesados para bebé, alimentos de origen animal y en algunos países, piensos animales; son controlados a través de un sistema de Límites Máximos de Residuos (LMR). Los LMR se definen como: La concentración máxima de residuos de plaguicidas (miligramos de residuo por kilogramo de producto, mg/kg) que probablemente ocurra en los productos alimenticios para consumo humano y animal después del uso de plaguicidas en cultivos, de acuerdo a las buenas prácticas agrícolas (BPA). Varían dentro del intervalo de 0,0001 a 130 mg/kg. Hay varias entidades que establecen LMR para sus alimentos y piensos, como CE, el Codex Alimentario, así como los gobiernos nacionales de cada país; en México los LMR para las diferentes sustancias activas y alimentos no han sido establecidos en su totalidad, se excluyen piensos animales y en algunos casos, los valores permitidos siguen en estudio [22], como se muestra en el Anexo I, en donde también se indica si los pesticidas autorizados en México, coinciden con los permitidos en el Codex Alimentario. En este anexo, se pueden observar, que existen diferencias entre autorizaciones, dadas en nuestro país y el Codex Alimentario. Estas discrepancias comienzan con el tipo de pesticidas, e incluye los valores de LMR, no se incluyen los datos estipulados por el Codex de este último criterio.

Anteriormente, la Unión Europea (UE) mantenía distintos LMR, es decir convivían conjuntamente los datos permitidos por la (CE) junto a los valores autorizados por las comunidades individuales. En el 2008, se estandarizan los límites, derogando las directivas 86/362/EEC, 86/363/EEC y 90/642/EEC existentes hasta el momento; estableciendo el 2 de septiembre del 2008 la Regulación 396/2005. Los productos fitosanitarios y su etiquetado se encuentra regulado por la Directiva 91/414/EEC [33], la cual contiene una lista de las sustancias activas revisadas y permitidas dentro de la UE, las modificaciones anteriormente mencionadas, causaron una reducción drástica del número de sustancias activas autorizadas inicialmente, así como de sus valores de LMR. Estos datos, eventualmente han sido trasladados a los anexos publicados en la Regulación 396/2005. Los casos de

pesticidas no incluidos en los anexos mencionados ya, se les establece un parámetro equivalente a 0.01 ppm.

La UE busca utilizar los plaguicidas en forma sustentable, es decir; únicamente cuando es estrictamente necesario y bajo condiciones muy específicas, con preponderancia a evitar cualquier riesgo latente hacia animales, personas, y medio ambiente. Aboga por el uso de plaguicidas menos agresivos, considerando siempre el límite mínimo de las cantidades requeridas, nunca la aplicación excesiva. Además, en materia de agua, la UE, pretende restablecer y asegurar las propiedades cuantitativas y cualitativas de la misma.

Tanto la UE y EPA llevan un listado de contaminantes prioritarios a controlar en agua, siendo más amplio y permisivo el de EPA. Únicamente el pesticida OP diclorvos está dentro del listado de control de la UE, el cual comprende un total de 25 sustancias teniendo el valor máximo de 70 pg/L. Por otra parte, EPA mantiene un inventario mucho mayor, aunque únicamente incluye al pesticida glifosato dentro de su control o límite máximo con un valor 0.7mg/L. Un catálogo mayor lo presenta la Red de Acción de Pesticidas (PAN, Pesticide Action Network) [34], en la tabla 2.2 se indican los pesticidas y límites permitidos por esta entidad.

No se encuentra Normatividad Mexicana o regulación vigente para la detección de plaguicidas OP en agua, existe una técnica para la determinación de pesticidas organoclorados, y la NOM-127-SSA1-1994 que las Comisiones Estatales de Servicios Públicos Estatales deben cumplir en sus controles de calidad de agua potable, los pesticidas organofosforados no están incluidos. Solo se encuentran referencias para la determinación de estos plaguicidas en depósitos marinos, de acuerdo al Compendio de Procedimientos operativos estandarizados para la Comisión Nacional del Agua [35], aunque no se encuentra la técnica en la red de internet. Existe un control de plaguicidas para la aplicación agrícola, regulado por COFEPRIS, así como un programa de control de recipientes, regulado por los Comités Estatales de Sanidad Vegetal.

Pesticida	P.M. ( $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ )	Exposición por un Día con Riesgo a la Salud ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	$\mu\text{M}$	Dosis de Referencia Dose ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ )	$\mu\text{M}$	Nivel Equivalente Agua Bebible U.S. ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	$\mu\text{M}$	Nivel de Exposición con Riesgo a la Salud de por Vida ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	$\mu\text{M}$	Concentración Máxima Aceptable (MAC) ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	$\mu\text{M}$
Azinfos metil	317.32	**	**	**	**	**	**	**	**	20.0	0.0630
Clorpirifos	350.62	30.0	0.0945	2.0	0.0063	0.3	0.0009	10.0	0.0315	90.0	0.2836
Diazinon	304.35	20.0	0.0630	1.0	0.0032	0.2	0.0006	7.0	0.0221	20.0	0.0630
Dimetoato	229.3	**	**	**	**	**	**	**	**	20.0	0.0630
Disulfoton	274.38	10.0	0.0315	0.7	0.0022	0.1	0.0003	3.5	0.0110	**	**
Fenamifos	303.36	9.0	0.0284	0.7	0.0022	0.1	0.0003	3.5	0.0110	**	**
Fonofos	246.3	20.0	0.0630	10.0	0.0315	2.0	0.0063	70.0	0.2206	**	**
Malatión	330.4	200.0	0.6303	500.0	1.5757	70.0	0.2206	2000.0	6.3028	190.0	0.5988
Metil Paratión	263.2	300.0	0.9454	1.0	0.0032	0.2	0.0006	7.0	0.0221	**	**
Paratión	291.258	**	**	**	**	**	**	**	**	50.0	0.1576
Forato	260.36	**	**	**	**	**	**	**	**	2.0	0.0063
Terbufos	288.45	5.0	0.0158	0.4	0.0013	0.1	0.0002	2.0	0.0063	1.0	0.0032

Tabla 2.2. Niveles máximos permitidos de pesticidas organofosforados en agua potable, \*\* No presentado [34].

### 2.3. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LOS PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS.

Actualmente se requieren métodos científicamente válidos de análisis a bajos niveles de concentración, muy cercanos de los Límites de Cuantificación (Low Quantification/LOQ) y Detección (Low Detection/LOD), los cuales son esenciales para la vigilancia y cumplimiento de los programas establecidos. Con el objetivo de minimizar los riesgos para la salud y lograr así, un uso más sostenible de los pesticidas. Se buscan métodos "in situ", de operación simple, con alta sensibilidad, exactos, rápidos, y a un costo redituable en poco tiempo, para la vigilancia y control de la contaminación generada por los pesticidas. Así mismo, en los últimos años, se ha dedicado especial atención el lograr análisis de residuos de pesticidas en los niveles considerados trazas, así como a la detección de sus metabolitos, debido a sus efectos en la salud.

Los métodos actuales se subdividen entre los oficialmente autorizados, de uso convencional, y en las tecnologías emergentes en las últimas décadas, ambos buscando cumplir las tendencias actuales de detección.

En la figura 2.13 se muestra una modificación al resumen presentando por Stoytcheva y Zlatev [36], de los métodos analíticos aplicados, en los últimos años para la determinación de los pesticidas organofosforados, donde se puede observar una preponderancia de los métodos cromatográficos en sus distintas variantes, seguido por los biosensores; existen también nuevas variantes que están investigándose con la finalidad de aplicarse en la determinación de este tipo de pesticidas, son: inmunoquímica, y fluorescencia, entre otros. En esta revisión se puede notar que la Espectrometría de Masas (SM) sigue presentando relevancia como opción de separación.

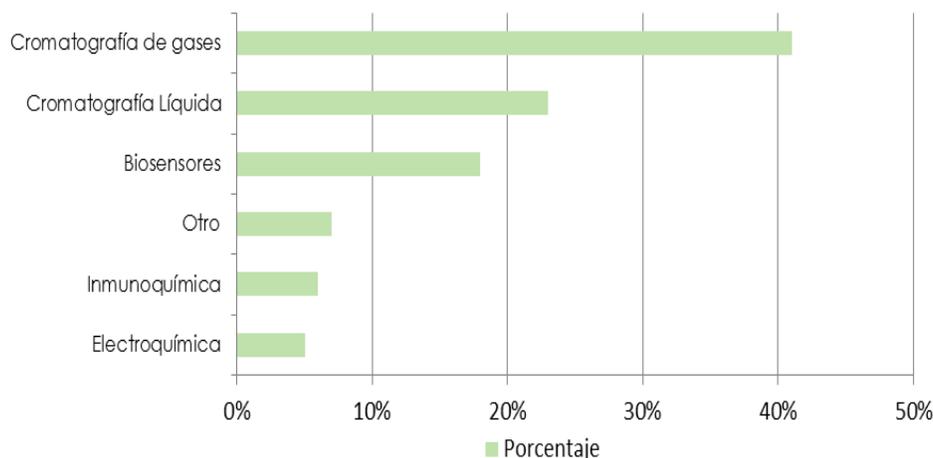


Fig. 2.13. Compendio de las técnicas aplicadas en la detección de pesticidas OP.

### 2.3.1. Métodos oficiales en la determinación de pesticidas OP.

Los métodos convencionales y oficiales para la cuantificación de los pesticidas OP, incluyen diversas técnicas cromatográficas como es Cromatografía de Gases (CG), Cromatografía de Gases con detección por Espectrometría de Masa (CG-EM), Cromatografía de Capa Fina (CCF) y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) [37, 38]. EPA y la UE han establecido regulaciones en agua y alimentos; han validados algunos métodos para la detección y cuantificación de los pesticidas organofosforados. EPA maneja los siguientes métodos: EPA 1699 y EPA 622, el primero es aplicable a algunos pesticidas OP solamente e incluye el uso de Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HRGC/HRMS) con Extracción en Fase Sólida (SPE) y Extracción Líquida-Líquida Continua (CLLE). La limpieza se da con Cromatografía por Permeación de Gel y técnicas analíticas de fase sólida. La segunda técnica se aplica a todos los pesticidas en general y está compuesta por Cromatografía de Gases (CG) y un Detector de Fósforo y Nitrógeno (NPD) en modo fósforo. La UE maneja el método EN12918, en él

considera procesos de extracción y el uso de CG, con aplicación para Paratión, Paratión metil, entre otros, para el monitoreo de aguas superficiales, residuales y potables. Cómo ya se mencionó, a nivel nacional, no existe regulación para la cuantificación o detección de este tipo de pesticidas.

Estos métodos conllevan procesos de preconcentración de las muestras de agua para obtener el analito de interés, y generalmente implican una serie de pasos que son complementados con técnicas extractivas en distintas fases: Extracción líquida-líquida (LLE), Extracción sólido-líquida (SPLE); aunque en los últimos años ha tenido gran interés los procesos extractivos con menor uso de solventes denominados de Micro Extracción en Fase Sólida (SPME) [39], Micro Extracción en Fase Líquida (LPME) y Micro Extracción Líquida-Líquida (LLME) [40]. Se ha reportado como método por J. S. Knaack [41] para la extracción de compuestos nerviosos OP en agua, hamburguesas y matrices terreas.

Acoplados a procesos de separación cromatográficos, los cuales son realizados principalmente por Cromatografía Líquida (CL) [42] y CG, [43, 44] en algunos casos se utiliza Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) para evaluar muestras de agua [45], o diversas muestras ambientales [46].

Asociados a un instrumento de detección y con distintas matrices, lo cuales pueden ser (1). Espectrometría de masas (MS) en muestras de agua [47, 48, 49, 50], muestras con alto contenido lipídico [51], algas marinas [52], vino y jugos de frutas [53]. (2). Detectores de Captura de Electrones (ECD) ligados a Detectores Selectivos de Fósforo-Nitrógeno (NPD) para el análisis de muestras de agua [54], plantas medicinales brasileñas [55], o nuevamente a MS para analizar frutas y vegetales [56]. (3) *Detector de Fotometría de Llama por pulsos* (PFPD) para analizar maíz y cowpea [57], después de una columna de carbón y alúmina activada.

Novedosas técnicas de extracción de multiresiduo, se han reportado, siendo un ejemplo el llamado Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS), acoplado a CL-MS/MS y CG-MS/MS en muestras de aguacate [58]; unidos a CG-MS para evaluar muestras de frutas y vegetales [59], ligado a Cromatografía Líquida de Ultra Eficiencia (UPLC/MS/MS) y aplicado en muestras de té [60] y hortalizas [61]. O simplemente usando CL-MS evaluando muestra de uvas y manzanas [62].

Como ya se mencionó, inicialmente se usa un proceso de extracción-concentración, seguido de una etapa cromatográfica, concluyendo con espectrometría de masas, haciendo uso de distintos detectores. Recientemente se han desarrollado interesantes combinaciones de nuevos métodos con los antes mencionados; siendo algunos Extracción por Solventes Asistida por Ultrasonido (UASE,) seguido de LLME, basado en la solidificación de la gota orgánica flotante para la determinación de pesticidas OP en cosechas de verano, determinándose los pesticidas por HPLC con detector Ultravioleta (UV) [63]. Otra variante es la reportada por L. Pareja [64], que utiliza Cromatografía líquida acoplada a una Trampa Cuadrupole Lineal de Iones (LC-QqLIT) y a MS para el análisis del agua residual de un campo de arroz. Así mismo Cazorla-Reyes ha reportado estudios aplicando CG acoplada a Trampa de iones tándem MS (GC-IT-MS/MS) y CG acoplada a Cromatografía Líquida de Ultra Alta Presión y a Triple Espectrometría de Masas Cuadrupolo (UHPLC-QqQ-MS/MS) [65] para el análisis de pesticidas en orina. Otra recomendación es la aplicación de CG acoplada Time of Flight y MS (GC-TOFMS) [66], una modificación a la metodología de Cervera la presenta Wei Jiang y colaboradores, agregando SPME como etapa previa y el uso de péptidos enriquecidos con óxido de titanio, con la finalidad de detectar en suero humano butilcolinesterasa inactivada por compuestos OP, un biomarcador que se está utilizando como medio alternativo de detección de exposición [67].

En la literatura podemos encontrar una gran cantidad de revisiones sobre los métodos específicos ya mencionados, de concentración y separación en matrices en agua [68], uso de LPME para la determinación de residuos [69], empleo de SPME en el análisis residual de pesticidas [70], uso de CG y el efecto intermatrices dado [71, 72, 73], LC-MS y su aplicación para la detección de pesticidas en el ambiente [74]. Otros resúmenes analizan el empleo combinado de CL y CG en la determinación de pesticidas en niveles traza, presentes en agua [75]. Así mismo, se han elaborado recopilaciones de interés específico hacia un alimento, como el elaborado por L. Pareja, esta recopilación muestra información sobre los métodos analíticos empleados para la detección de pesticidas en arroz [76]. También se pueden encontrar diversos resúmenes sobre métodos específicos pero en función de todas sus aplicaciones como el reportado por Hennion [77]. O los reportados por Martínez Vidal que en forma global analiza todos y cada uno de las etapas involucradas en la determinación de pesticidas [78], así como lo hecho por LeDoux y su análisis de pesticidas residuales [79].

Estas técnicas son muy utilizadas para análisis de pesticidas en niveles traza, ya que presentan niveles de sensibilidad, en rangos de ng/ml a pg/ml. Pero su aplicación en el análisis de este tipo de pesticidas presenta una serie de dificultades. Siguen teniendo la limitante de no poderse usar en línea, es decir en el sitio del muestreo; algunas de ellas no pueden ser aplicados directamente a analitos semivolátiles o volátiles o térmicamente lábiles como triclorfon, además de que generan metabolitos como paratión, no siendo el pesticida inicial de interés. Además se deben estar controlando y optimizando las temperaturas de las columnas con la finalidad de minimizar la mezcla entre fases, siendo esto algunos de los limitantes para cromatografía. Además, requieren el uso de detectores específicos, como el NPD, es decir; no todos los detectores son de amplio espectro. Para su uso, se debe de trabajar en el diseño de los acoplamientos requeridos para la detección del analito en cuestión. Debido a estos inconvenientes, se han buscado métodos alternos para su análisis y detección.

### 2.3.2. Métodos Fluorométricos.

Los métodos Fluorométricos están basados en derivados químicos, etiquetado fluorogénico y fluorescencia inducida fotoquímicamente, han servido como medios de detección para Cromatografía de Capa Fina (TLC), HPLC y Análisis por Inyección en Flujo (FIA), con aplicaciones ambientales. Limitado por la cantidad de compuestos marcadamente fluorescentes, aunque muchos compuestos poseen el grado mínimo de aromaticidad y puede ser convertidos a una sustancia fluorescente mediante distintas vías.

El elegir este método de detección, implica considerar si el pesticida es fluorescente y puede ser determinado directamente por este método, si no lo es, el grado posible de fluorescencia presente y la factibilidad de convertirlo de acuerdo a las técnicas actuales. Diversas publicaciones al respecto se han realizado, en algunos casos mediante detecciones directas de pesticidas organofosforados los cuales manifestaba una fluorescencia intrínseca; coumafos [80] y pirimifos metil [81], con LOD de 0.5 ng/ml y 0.3 ng/ml, respectivamente. En otros casos por pretratamientos fluorimétricos, azinfos [82] y clorpirifos [83], mostrando valores de LOD en el rango de nanogramos. Esta metodología presenta una gran sensibilidad, pero una baja selectividad por la presencia de componentes fluorescentes ajenos al analito en cuestión, esto es un limitante para ser considerada en los trabajos de detección.

Los inmunoensayos, son poco utilizados en la determinación de pesticidas OP, debido a que implican numerosas etapas de lavado, generando tiempo de análisis largos. Por lo tanto, estos métodos no son adecuados para las determinaciones en el campo y en donde se requiera monitoreo continuo.

### 2.3.3. Aplicación de sensores en la determinación de pesticidas OP.

De manera general se podría definir a un sensor químico como cualquier dispositivo miniaturizado que fuera capaz de responder de manera inequívoca a un analito concreto presente en una muestra compleja. Consta esencialmente de dos partes: el elemento de reconocimiento (enzima) que interactúa con el analito (sustrato de enzima) y concede selectividad al sensor y el transductor que permite convertir esa interacción fisicoquímica en una señal analítica eléctrica. Cuando el elemento de reconocimiento es un electrodo, este es considerado un sensor electroquímico, pero cuando en este elemento intervienen especies biológicas, estaremos en presencia de un biosensor, ver figura. 2.14.

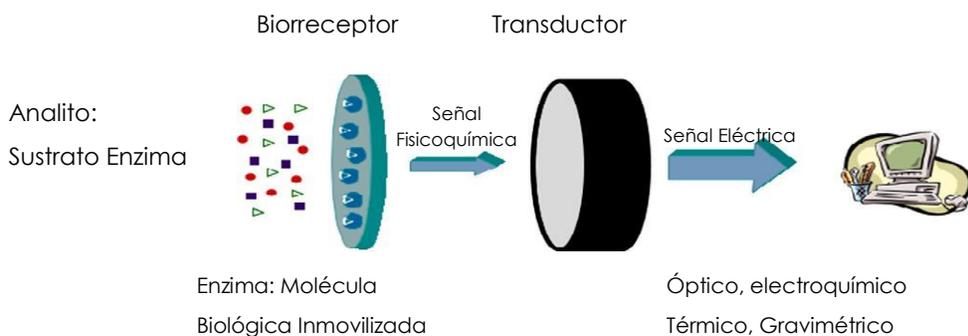


Fig. 2. 14. Esquema de un biosensor.

#### A. Métodos de Inmovilización.

La cantidad de publicaciones que aumentan año con año por el uso de biosensores es cada vez mayor, ya que las enzimas presentan una serie de ventajas; muestran una gran actividad catalítica, especificidad de sustrato -estereoselectividad y regioespecificidad; además de ser muy activas en condiciones estándar de trabajo.

Sin embargo, son muy inestables en condiciones normales de trabajo, solubles en agua; su separación de sustratos y productos es difícil, y por tanto, no se pueden reutilizar. Con el uso de métodos de inmovilización, se han controlado estas desventajas. En la

figura 2.15, se muestra una clasificación de estas metodologías, realizada por Sassolas [84], explicándose a continuación.

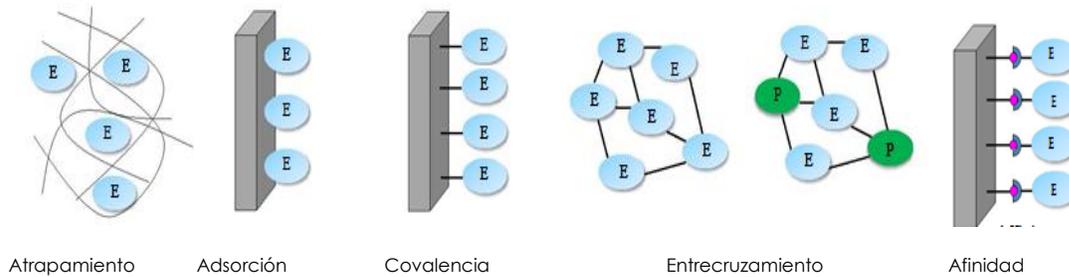


Fig. 2.15. Métodos de Inmovilización [84].

Cada método de inmovilización presenta ventajas e inconvenientes. La elección de la técnica más adecuada depende de la naturaleza de la enzima, el transductor y el método de detección asociado. El mejor método de inmovilización de enzimas depende de la aplicación del biosensor, sensibilidad o estabilidad requerida. Así como la reproducibilidad, el costo y la dificultad de la inmovilización empleada. La sensibilidad disminuye si la inmovilización causa la desnaturalización, cambios conformacionales o la modificación de la enzima, sobre todo en su sitio activo. La mejor sensibilidad se obtiene con la inmovilización orientada de enzimas en la superficie del transductor o mediante la selección de la naturaleza del espaciador entre la enzima y el apoyo en virtud de la unión covalente.

Enzimas orientados correctamente exponen correctamente su sitio activo de la fase en solución. Espaciadores Más bien largos y flexibles, tales como polietileno glicol puede evitar impedimentos estéricos y movilidad limitada de la enzima inmovilizada. Algunas de las técnicas de inmovilización, pueden implicar una mala orientación de los componentes de la enzima, induciendo a una parcial o total pérdida de la actividad, ya que la enzima sufrió una desnaturalización o un bloqueo del sitio activo, siendo esto último inaccesible para el sustrato. Las técnicas basadas en interacciones de afinidad entre las enzimas y moléculas de avidina, lectinas o azúcares permiten inmovilizar enzimas en forma ordenada y específica del sitio activo, a fin de desarrollar biosensores eficientes. De la misma manera, la inmovilización basada en capas monomoleculares autoensambladas, reducen el número de orientaciones aleatorias, generando estructuras uniformes, reproducibles y estables con una alta cobertura [85].

El uso de nanomateriales (nanocables de polímero, nanotubos de carbono, nanopartículas) para el diseño de dispositivos biosensores constituye un enfoque interesante y reciente para mejorar el rendimiento de detección. Las perspectivas muy prometedoras de nanomateriales son debido a sus únicas propiedades. Los nanotubos de carbono tienen propiedades eléctricas, mecánicas y estructurales notables [86]. Pueden mejorar la reactividad electroquímica de biomoléculas y pueden promover las reacciones de transferencia de electrones de las proteínas. Las nanopartículas de diferentes composiciones y tamaños también han sido utilizadas en los últimos años como trazadores versátiles y sensibles para la electrónica, como transducción óptica o micro gravimétricas de diferentes biomoléculas [87]. Las nanopartículas de metales presentan excelente conductividad, que les permite mejorar la transferencia de electrones entre el centro redox de la proteína y la superficie del electrodo [88, 89]. Las biomoléculas también se han inmovilizado con materiales nano estructurados por adsorción, covalencia o atrapamiento para desarrollar biosensores más sensibles. Las nanopartículas son superficies de inmovilización que presentan un área superficial grande. Por otra parte, la adsorción directa de las enzimas en las superficies de metal a granel con frecuencia resulta en la desnaturalización de la proteína y en la respectiva pérdida de bioactividad que se puede evitar si las enzimas son adsorbidas en soluciones de nanopartículas de metal antes de ser electro depositado sobre la superficie del electrodo [90]. A continuación se explican métodos de inmovilización enzimática.

#### a. Enlace Covalente.

El acoplamiento covalente de enzimas a soportes poliméricos es un popular método de inmovilización química utilizada para desarrollar biosensores enzimáticos. Para este propósito, los biocatalizadores se unen a la superficie a través de grupos funcionales que contienen y que no son esenciales para su actividad catalítica. La unión de las enzimas para el soporte sólido generalmente se lleva a cabo por la activación inicial de la superficie usando reactivos multifuncionales (por ejemplo, glutaraldehído o carbodimida), seguido por acoplamiento de la enzima al soporte activado, posteriormente, se da la eliminación del exceso y de las biomoléculas no consolidadas. El soporte puede ser un material inorgánico (vidrio poroso), natural (celulosa) o un polímero sintético (nylon). Existen membranas (por ejemplo Immunodyne, Ultrabind) disponibles ya preactivadas que también pueden ser ya utilizadas. Esta inmovilización puede llevarse a cabo directamente sobre la superficie del transductor o sobre una membrana delgada fijada sobre el transductor.

b. Entrecruzamiento.

La inmovilización de enzimas por reticulación con glutaraldehído u otros agentes bifuncionales, tales como glioxal o hexametildiamina, presentan otro enfoque para desarrollar biosensores. La enzima puede ser reticulada entre sí o en presencia de una proteína funcionalmente inerte tal como albúmina de suero bovino. Este método es atractivo debido a su simplicidad y la fuerte unión química alcanzado entre biomoléculas. El principal inconveniente es la posibilidad de pérdidas de actividad debido a la distorsión de la conformación activa de la enzima y las alteraciones químicas del sitio activo durante el reticulado.

c. Atrapamiento.

Las enzimas pueden ser inmovilizadas en matrices tridimensionales tales como una película electropolimerizada, un fotopolímero, un gel de sílice, un polisacárido o una pasta de carbono. Es fácil de realizar, en estos métodos, las enzimas, los mediadores y aditivos, se pueden depositar simultáneamente en la misma capa de detección. No hay modificación del elemento biológico para que la actividad de la enzima se conserve durante el proceso de inmovilización. Biosensores basado en enzimas atrapadas físicamente se caracterizan a menudo por el aumento de la estabilidad operacional y de almacenamiento. Sin embargo, las limitaciones tales como la lixiviación de barreras de difusión y posibles fugas del biocomponente pueden restringir la funcionalidad y eficiencia de los sistemas diseñados.

El quitosano es un derivado de la quitina, un poliaminosacarido natural encontrado en el exoesqueleto de los crustáceos o los insectos y en la célula fúngica pared. Se obtiene por la N-desacetilación de la quitina y se caracteriza por el grado de desacetilación. Por lo tanto, el quitosano es un copolímero de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina. El quitosano es insoluble en agua, pero la presencia de grupos amino induce su solubilidad en soluciones ácidas con pH de aproximadamente 6.5 [91]. Un biosensor amperométrico se desarrolló para detectar fenoles mediante la inmovilización de tirosinasa en una película de quitosan con un electrodo de carbono [92]. Las respuestas a fenol fueron lineales en el intervalo de  $1 \times 10^{-10} \text{M}$  a  $2.3 \times 10^{-8} \text{M}$  (límite de detección en  $5 \times 10^{-11} \text{M}$ ). Este biosensor retuvo el 75% de la actividad enzimática inicial de por lo menos 79 días.

d. Adsorción.

La Adsorción de enzimas sobre soportes sólidos representa el más fácil método de inmovilización física. Se disuelve la enzima en solución y el soporte sólido se pone en contacto con la misma, por un período fijo de tiempo. Luego se retira la enzima no adsorbida por lavado con solución tampón. Los mecanismos de adsorción se basan en enlaces débiles como fuerzas electrostáticas y de Van der Waals y electrostáticas y/o interacciones hidrofóbicas. Esta técnica no implica ninguna funcionalización del apoyo y es generalmente no destructiva para la actividad de la enzima. Aunque este método de inmovilización provoca poca o ninguna inactivación, esta técnica presenta inconvenientes; al estar las enzimas libremente unidas al soporte, puede darse desorción por cambios en la temperatura, pH y fuerza iónica, siendo el principal problema. Por lo tanto, los biosensores basados en la enzima adsorbida sufren de mala estabilidad operacional y de almacenamiento. Otro inconveniente es la adsorción no específica de otras proteínas o sustancias.

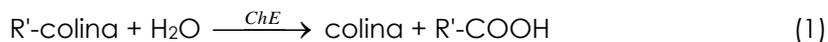
e. Afinidad.

Los esfuerzos se han logrado con el fin de desarrollar biosensores basados en orientar e inmovilización el sitio específico de las enzimas. Una estrategia es la creación de (bio) bonos de afinidad entre un soporte activado (con lectina, avidina, quelatos de metal) y un grupo específico (una etiqueta) de la secuencia de la proteína (por ejemplo, hidratos de carbono residual, biotina, histidina). Este método permite controlar la orientación de la biomolécula con el fin para evitar la desactivación de la enzima y/o el bloqueo del sitio activo. Varios métodos de inmovilización por afinidad se han descrito, a través de avidina-biotina, lectina-carbohidrato y metal quelante de cationes interactuantes. Una enzima puede contener etiquetas de afinidad en su secuencia (por ejemplo, un resto de azúcar), pero, en algunos casos, la etiqueta de afinidad (por ejemplo biotina) necesita ser unida a la secuencia de la proteína mediante ingeniería genética como mutagénesis, tecnología de fusión de proteína dirigida al sitio y modificación post-transcripcional [94].

B. Enzimas y Técnicas Empleadas.

La función de los sensores electroquímicos modificados con acilcolinesterasas (ChE), representadas por Acetilcolinesterasa (AChE) o Butirilcolinesterasa (BuChE) y fosfatasa (ácidos o alcalinas) se basa en la capacidad inhibitoria que tienen los compuestos OP sobre estas enzimas. La cuantificación se realiza por la medición de la variación de la actividad enzimática, la cual está en función de la concentración de los plaguicidas

organofosforados, requiriendo la aplicación de técnicas electroquímicas. Por lo tanto, de acuerdo con el modo de transducción, los biosensores reportados son principalmente potenciométricos o amperométricos. Los sensores potenciométricos modificados con ChE implican la siguiente reacción:



donde R' es un radical acetilo o butírico.

Acetilcolinesterasa (AChE EC 3. 1.1. 7.). Son disponibles comercialmente, pero inestables, debido a que fueron aislados de su medio natural. Favorecen el progreso del impulso nervioso durante la sinapsis colinérgica. La Acetilcolina debe de ser hidrolizada por esta enzima después de un impulso nervioso, lo cual es bloqueado por la presencia de OP, debido a la fosforilación de la serina 203 presente en el sitio activo de AChE, causando la acumulación de acetilcolina en el punto sináptico [95]. Se han reportado biosensores amperométricos modificados con AChE, y basados en su inhibición enzimática, midiendo tiocolina y p-aminofenol producto de la hidrólisis de butiriltiocolina y p-aminofenil acetato, respectivamente, [96, 97, 98, 99].

El cambio en el pH de la solución, resulta de la liberación de ácidos durante la hidrólisis enzimática de los ésteres de la colina, registrándose como una respuesta del sensor potenciométrico, en función de la actividad de la colinesterasa [100, 101].

Otro sistema potenciométrico es el desarrollado por Ghindilis [102], basado en la pérdida de la mediación bioelectrocatalítica:



(CHO es la enzima colina oxidasa y HRP es la enzima peroxidasa)

La reducción electrocatalítica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoca un cambio en el potencial del electrodo. Este sensor tri-enzimático, permite la detección de 2x10<sup>-13</sup> molL<sup>-1</sup> de triclorfon.

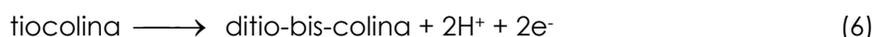
Los sensores amperométricos modificados con (ChE), proporcionan en general, una respuesta más rápida, así como una mayor sensibilidad y precisión que los potenciométricos; presentando dos variantes de acuerdo a Stoytcheva, [31].

a. Primera generación de Sensores amperométricos modificados con ChE

Aprovechan los procesos bienzimáticos descritos en las ecuaciones 2 y 3; es decir, el sensor detecta como señal de respuesta; las corrientes de oxidación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o reducción de O<sub>2</sub>, las cuales dependen de la concentración de sustrato y la respectiva actividad de la enzima. Sin embargo, ya que la oxidación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con un electrodo (E) se lleva a cabo a un potencial de 0,60 V/SCE, muchas sustancias contenidas en los líquidos biológicos y sometidos a una oxidación en los mismos potenciales (glutación, ascorbato, urato, etc) interfieren, corrompiendo la determinación. La señal de salida estará influenciada por las fluctuaciones en la concentración de oxígeno, también.

b. Segunda generación de sensores amperométricos modificados con ChE.

Utilizan sustratos sintéticos (tiocolina o ésteres indoxilacetato), transformados durante la hidrólisis catalítica en productos capaces de ser fácilmente oxidados, como por ejemplo:



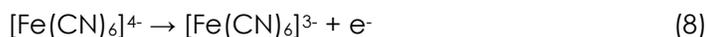
Sin embargo, R'-tiocolina es sujeto de hidrólisis no enzimáticas espontáneas. Aunque leves, pueden producir un aumento en la respuesta de la corriente anódica. Además, la oxidación de la tiocolina provoca una pasivación de los ánodos de platino, debido a su interacción con los compuestos que contienen azufre, lo cual debe ser tomada en consideración.

El proceso de oxidación directa de la tiocolina se produce en 0,80 V/SCE en transductores de metal y grafito convencionales [97, 103, 104], implican la transferencia de un electrón desde el tiol y un dimerización del compuesto intermedio a disulfuro [94,

108]. El alto valor potencial sin embargo provoca la aparición de una alta corriente de fondo, así como interferencias por compuestos electroactivos.

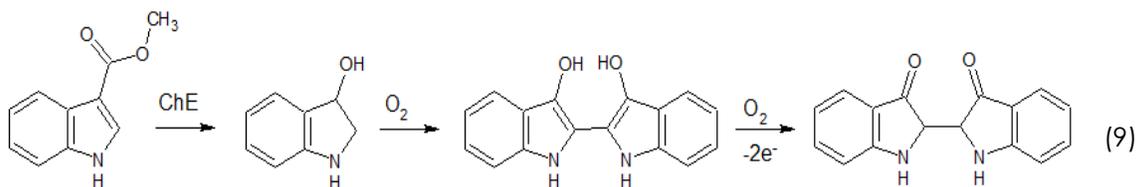
Se encuentra documentado varios tipos de electrodos enzimáticos, que proporcionan una detección electroquímica sensible de tiocolina; generados a bajos potencial, tales como los químicamente modificados con ftalocianinas [105, 106], azul de Prusia [106] y tetracianoquinodimetano [107, 108]. Sin embargo, la adición de estos mediadores, podría provocar interferencias.

Una opción para evitar la reducción de potencial, sin necesidad de modificar el electrodo implica la hidrólisis enzimática con aciltiocolina (Ec. 5), la reducción química de la tiocolina producida en solución (Ec. 7), y la detección electroquímica del producto de la reacción redox homogénea (Ec. 8), según lo sugerido por Ovalle, respectivamente [109]:



Sin embargo, la sensibilidad reportada para la determinación de OP (clorofos) es menor en comparación con lo alcanzado por oxidación directa de tiocolina.

La reacción de respuesta, base de algunos sensores de segunda generación, modificados con (ChE) para la cuantificación de OP, es la oxidación electroquímica del leucoindigo, producido tras la hidrólisis enzimática de indoxilacetato [110]:



La desventaja de este método consiste en que el leucoindigo está expuesto a sustancias químicas, así como a la oxidación electroquímica con  $\text{O}_2$ , complicando la formación de la señal analítica.

Butilcolinesterasa (BuChE, EC 3. 1.1. 8.). Empleada cuando no es posible hacer la detección por inhibición de AChE, es conocida como una pseudocolinesterasa, está

relacionada a AChE, difiriendo en que la segunda se inhibida por exceso de sustrato, es más utilizada como un indicador de exposición o intoxicación, mayormente con fines forenses.

Fosfatasa Alcalina (ACP, EC 3.1.3.1.) La inhibición de fosfatasa, aunque reversible, no requiere reactivación de la enzima, catalizan la transferencia del grupo fosfato al agua (hidrólisis) o alcohol (transfosforilación) [111]. La enzima se caracteriza por un alto pH y una amplia especificidad al sustrato, usando varios fosfomonoesteres. Es una metaloenzima dimérica con dos iones Zn y un ion Mg coordinados dentro del sitio activo de cada monómero [112]. La actividad enzimática puede ser inhibida por etilendiamina tetraacético ácido (EDTA). No es tan aplicado como AChE para la detección de pesticidas mediante biosensores electroquímicos [113].

Fosfatasa Ácida (AP, EC 3.1.3.2.) Son enzimas con bajo pH que catalizan la reacción: monoéster ortofosfórico + Agua  $\rightarrow$  Alcohol + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Tienen bajo nivel de aplicación, se han utilizado en forma conjunta con otras enzimas, Glucosa Oxidasa (GOD) en sensores bioenzimáticos para la detección de malatión (1.5 µg/L), metil paratión (0.5 µg/L) y paraoxon (1.5 µg/L) [114].

Las determinaciones enzimáticamente inhibitorias, aunque muy sensibles, son indirectas. Presentan baja selectividad y necesitan, en algunos casos, de incubación y reactivación/regeneración de la enzima. Además, como se muestra por Gunaratna [115], la colinesterasa es muy sensible a su micro-entorno, incluso pequeños cambios provocan una pérdida significativa de su actividad, además al ser inhibida por neurotóxicas, lo que incluye también a los carbamatos; no podría usarse para la cuantificación de un tipo o grupo particular de pesticidas, lo cual es necesario en procesos de desintoxicación. Además de requerir múltiples pasos para medir la inhibición de la enzima, es decir, la enzima es medida y después incubada junto con el analito, por espacio de 10 a 15 minutos o más, si se busca mejorar la sensibilidad. Posteriormente se vuelve a medir, para evaluar el grado de inhibición y así obtener la concentración de OP en el analito. Además de requerirse reactivación de la enzima con el fin de continuar usando el electrodo. La cual puede ser parcial y en ocasiones ya no posible, debido al proceso de envejecimiento que sufre la enzima, en el cual la inhibición se vuelve irreversible.

Análisis directos de pesticidas OP se logra aplicando OPH en sensores electroquímicos [116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123]. Es una enzima hidrolizante

organofosfotriesterasa, manifiesta una amplia especificidad hacia sustratos como son: paraoxon, paratión, coumaphos, diazinón, Dursban, paratión metílico, etc, y hacia algunos agentes químicos de guerra; sarín, somán, tabun , VX, etc [124, 125]. Como se muestra en la fig. 2.16. La detección de paratión también es posible con el uso de paratión hidrolasa (PH) [126]. La hidrólisis de los sustratos OP catalizados enzimáticamente, implica cambios en el pH y genera productos electroactivos:

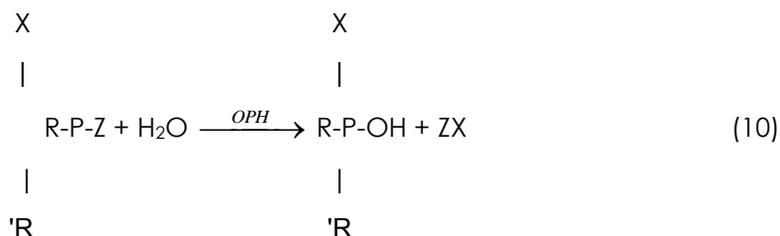


Fig. 2.16. Esquema de la reacción de hidrólisis catalizada por OPH de los compuestos OP. X es un oxígeno o azufre, R es un grupo alcoxi variando en tamaño de metoxi a butoxi, 'R es un grupo alcoxi o fenólico y Z es un grupo fenoxi, tiol, cianuro o fluor [127].

Por lo tanto, la detección se puede realizar en un solo paso, utilizando potenciometría sensible al pH o transductores amperométricos.

Organofosforohidrolasa (OPH, EC 3.1.8.1). Inicialmente aislada de *Pseudomonas diminuta* y *Flavobacterium sp* en 1980, ambos organismos propios del suelo [128, 129]. La forma nativa se expresa como una metaloenzima homodimérica presente en la membrana, la precursora de esta proteína tiene una secuencia de 29 aminoácidos en su terminal N para la selección objetivo de la membrana [130]. La enzima madura es una metaloproteína de 36-kDa con dos iones  $\text{Zn}^{2+}$  presentes en la enzima nativa. OPH tiene un amplio perfil de pH (pH 8-10) con una actividad y temperatura óptima a un pH de 8,5 y 50°C [131]. Es de gran interés ya que puede desintoxicar un amplio rango de pesticidas organofosforados (OP) y agentes químicos nerviosos, por su capacidad de romper varios tipos de enlaces fosforoéster (P-O, P-F, P-CN, P-S), tiene un papel importante en la degradación de este tipo de compuestos y es muy utilizada en la biorremediación de la contaminación ocasionada por estos químicos [132].

Si bien contiene iones zinc en su estructura, debido a las modificaciones que ha sufrido, presenta variantes en el efecto que pudieran reflejar los metales en ella; algunos autores reportan que al ser sustituidos por otros iones como  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , o  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , muestran mayor actividad catalítica [133, 134]. Dentro de las armas químicas

presenta mayores rangos de velocidad hacia fosfotriesteres como sarín y tabún, en comparación de los valores logrados con las armas químicas, VX y RVX [135, 136].

Los sistemas basados en OPH permiten la determinación selectiva de la familia de los compuestos OP, en contraste con las técnicas basadas por inhibición de la enzima, aunque el límite de detección reportado es mayor [127]. El uso de enzimas presenta inconvenientes importantes, debido a que no son comerciales; se requieren procesos de extracción y purificación sumamente complejos, de larga duración, y caros, se realiza en laboratorios especializados de microbiología.

No.	Analito	Técnica	Inmovilización	Transductor	Linealidad (M)	LOD	Ref.
1	Paraoxon	Amperometría	Enlace covalente	SWCNTs	$5 \times 10^{-7}$ - $8.5 \times 10^{-6}$	$10^{-8}$	[137]
2	Paraoxon	Amperometría	Atrapamiento	Carbón mesoformo	$2 \times 10^{-7}$ - $8 \times 10^{-6}$	$1.2 \times 10^{-7}$	[138]
3	Paraoxon	Amperometría	Atrapamiento	MWCNTs	$> 4 \times 10^{-6}$	$15 \times 10^{-8}$	[139]
4	Paraoxon	Amperometría	Entrecruzamiento	MWCNTs	$5 \times 10^{-7}$ - $2 \times 10^{-6}$	$0.3142 \times 10^{-6}$	[140]
5	Paratión etil	Amperometría	Enlace covalente	**	ND	$< 3.4 \times 10^{-9}$	[141]
6	Paratión metil	Amperometría	Enlace covalente	AuNPs-MWCNTs-QDs	$1.9 \times 10^{-8}$ - $7.6 \times 10^{-7}$	$3.8 \times 10^{-9}$	[142]
7	Paratión	Amperometría	Entrecruzamiento	CNTs	$2 \times 10^{-9}$ - $4 \times 10^{-8}$	$15 \times 10^{-9}$	[143]

Tabla 2.3. Características de diferentes biosensores basados en OPH.

La hidrólisis implica un cambio de pH y la generación de especies electroactivas, permitiendo hasta el momento el desarrollo de sensores potenciométricos y amperométricos para la cuantificación de pesticidas, como se muestra en la tabla 2.3. El cambio en el pH se puede medir con un electrodo. Durante la hidrólisis se libera Paranitrofenol (PNP), su corriente de oxidación es proporcional a su concentración, lo cual es equivalente a la presencia del pesticida en análisis; esto es sensible a un biosensor. Dentro de sus inconvenientes esta, el que no todos los productos de la hidrólisis son electroactivos.

Estudios ulteriores muestran que al estar varios pesticidas presentes, pueden existir interferencias y alterar el sitio activo de la enzima para otros pesticidas. Kolakowki y colaboradores realizaron una caracterización de la hidrólisis del enlace P-S por OPH,

combinando Demeton-S y paraoxon; encontrando que el primero no fue una interferencia contra la degradación del segundo [135]. Solo mipafos, que también contiene un enlace P-F se mostró como un inhibidor competitivo [128].

En los últimos años se han aislado microorganismos con la capacidad de sintetizar compuestos considerados no degradables, el rango de crecimiento que presentan y la poca población existente de microorganismos con esa capacidad, aunado a la baja expresión del gen; son desventajas que ocasionan una reducida eficiencia de biorremediación. Por lo que la búsqueda de medios alternos para aumentar este rubro ha ido creciendo drásticamente. El gen opd (organofósforo degradante) presente en las bacterias que secretan esta enzima y decodificador como tal, se encuentra en cada plásmido nativo (43 kb de tamaño pPDL2 para *Flavobacterium* sp. ATCC 27551 y 66 kb de tamaño pCMS1 para *Pseudomonas diminuta*, respectivamente) [144, 145, 146]. Hasta el momento son pocas las secuencias reportadas de OPH en ADN. Algunas de ellos y apoyados con el uso de técnicas de ingeniería genética, se han expresado en diferentes sistemas, generando una serie de bacterias recombinantes, especialmente se ha buscado expresar cepas de la enzima de interés en la superficie de otras bacterias, tal es el caso de OPH (S5) mutante en *E. coli* con mejoras en su actividad enzimática [147], teniendo límites de detección de 0.2µM para el paraoxon. La mayoría de los estudios se han dirigido a mejorar la eficiencia de producción de la enzima en *E. coli*, basándose en fermentaciones [129, 148, 149]. Buscando mejorar la eficiencia de producción y también con bases fermentativas, se desarrolla otro método basado en *Ralstonia eutropa* [150], teniendo eficiencias de 4.3 g/l de OPH producida. También se aisló otra cepa bacteriana con la capacidad deseada, denominándose *Pseudomonas pseudoalcaligenes* [151], depositándose su secuencia en GenBank, siendo el gen ophc22 de 975 bp de largo, comprendiendo un polipéptido de 324 amino ácidos como marco de apertura de lectura, e incluyendo una señal peptídica de 24 amino ácidos. Posteriormente este gen se expresó en *Pichia pastoris*, teniendo mejores eficiencias [152], presentando mejoras de actividad en presencia de los siguientes iones: Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>; y disminución en presencia de Cr<sup>3+</sup>, Li<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, EDTA. También se han reportado resultados de la expresión del gen en *Deinococcus radiodurans*, mostrando actividad contra compuestos lactona y OP, aunque en menor proporción que la mostrada por *Pseudomonas diminuta* [153].

Metil Paratión Hidrolasa (MPH, EC 3.1.8). Es un tipo específico de OPH, es una enzima homodimérica con la habilidad de catalizar la hidrólisis de un amplio rango de agentes

organofosforados [154, 155]. Se ha expresado en *E. coli* y en algunas levaduras, realizado investigaciones y modificaciones a su termoestabilidad por mutagénesis de sitios activos, mediante técnicas de la ingeniería genética. Young Xia y colaboradores llevaron a cabo estudios para evaluar el efecto del disolvente 2,2,2-trifluoroetanol (TFE), con la finalidad de evaluar la desnaturalización química de esta enzima [156], considerando que algunos pesticidas tienden a disolverse más en medios orgánicos y que su análisis se realiza en medio acuoso. TFE sirve como codisolvente no polar, componente necesario en las investigaciones de cinética de doblamiento en proteínas y de equilibrio conformacional. Recientemente se ha despertado el interés de conocer el efecto de los disolventes en las proteínas, realizándose estudios similares, pero en otras enzimas. Encontrando inactivación reversible y desdoblamiento de la enzima en presencia de este disolvente, induciendo cambios en la estructura así como en el sitio activo.

En general aún se debe de trabajar en la problemática que implica desde expresar la enzima en sí, y una vez hecho este punto, lograr que la bacteria la exprese en su superficie o la excrete. Con la finalidad de tener más opciones viables para producir y utilizar esta enzima, tanto en la detección, neutralización de agua y biorremediación de suelos.

### C. Sensores Electroquímicos Bacterianos.

Se desarrollan mediante el acoplamiento de bacterias a los transductores electroquímicos. Ofrecen varias ventajas sobre las enzimas aisladas, ya que tienen un costo más bajo, debido a la eliminación de los procesos de extracción y purificación de las enzimas intracelulares; además de su capacidad de catalizar reacciones secuenciales que implican múltiples reacciones enzimáticas; presentan resistencia a los cambios de pH y temperatura, a causa de la retención de las enzimas en su entorno natural; muestran una mayor tolerancia a las sustancias tóxicas; y se da la recuperación de la actividad de la enzima en un medio nutriente. [157]

Los sensores electroquímicos bacterianos son menos sensibles y menos selectivos que los enzimáticos, y su tiempo de respuesta es relativamente largo, debido a las limitaciones difusionales en la pared celular bacteriana. Sin embargo, estos inconvenientes son superables, con ingeniería genética y permeabilización celular, respectivamente.

Sólo unos sensores electroquímicos bacterianos para la cuantificación de pesticidas OP se han desarrollado hasta ahora. Incluyen como elemento de biorreconocimiento a las bacterias *Moraxella* sp, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Escherichia coli*, así como el desarrollado con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* modificados genéticamente y con OPH expresada en la superficie [127, 148, 149, 158, 159, 160, 161]. El principio de detección es idéntico al empleado, utilizando la enzima aislada y purificada. Se han reportado sensores microbianos basados en el Electrodo de Clark, y modificados con bacterias recombinantes, capaces de oxidar y degradar el PNP, presentando actividad OPH [162, 163]. El OPH se manifiesta en la superficie y cataliza la hidrólisis de pesticidas OP con sustituyente nitrofenil para liberar productos metabolizables por las bacterias, mientras consumen oxígeno. El consumo de oxígeno se mide y se correlaciona con la concentración de OP.

Lei [163] informa de la construcción de un biosensor híbrido para la determinación directa de los pesticidas OP, utilizando OPH purificada para su hidrólisis inicial y *Arthrobacter* sp. JS443 para la posterior oxidación del (PNP), liberando al dióxido de carbono a través de intermediarios electroactivos. La capa biocatalítica se prepara con bacterias y enzimas co-inmovilizadas sobre un electrodo de pasta de carbono. La señal registrada es la corriente de oxidación de los compuestos intermedios, en función de la concentración de OP.

Los sensores microbianos e híbridos anteriormente mencionados para la cuantificación directa de plaguicidas organofosforados, muestran estabilidad a largo plazo, buena reproducibilidad precisión, y un tiempo de respuesta relativamente corto. Sin embargo, el límite de detección alcanzado es mayor que la concentración OP en muestras ambientales y superior a la de los sensores basados en la inhibición de ChE, inmunoensayos, CG, CL y CCF [141].

Stoytcheva [164], integra un elemento de biorreconocimiento híbrido que consiste en *Globiformis Arthrobacter* inmovilizado y acetilcolinesterasa libre (ACh) con un transductor en sonda de oxígeno tipo Clark. Las bacterias convierten la colina generada por ACh a betaína; con el respectivo consumo de oxígeno, el cual se mide como un cambio en la corriente de una sonda tipo Clark. Este cambio, que representa la respuesta del sensor, se correlaciona con la concentración de los pesticidas OP que inhiben la hidrólisis catalizada por ACh de acetilcolina a colina.

## D. Nanomateriales

Su uso inicia en 1985, cuando se descubre el Buckminsterfullerene  $C_{60}$  [165]. Aumentando desde entonces, el número de estructuras conocidas rápidamente. Los ejemplos de ellas incluyen nanotubos [166], la familia de los fullerenos, nanoconos de carbono, nanocuernos de carbono [167] y otros carbonos alotrópicos con diferentes nanopartículas. Algunos ejemplos de nanoestructuras de carbono son presentado en la figura. 2.17. Las propiedades extremas de estos materiales, tales como áreas de mayor superficie, marcada fuerza mecánica, eléctrica y conductividad térmica; le confieren una amplia gama de aplicaciones. Ellos pueden ser descritos como una hoja de grafito enrollada en un nano-tubo a escala. Dos formas estructurales de nanotubos (CNT) existen: de pared simple (SWCNTs) y multipared (MWCNTs). Debido a estas características y al interés que ha generado su uso, ha tenido aplicación en la detección de pesticidas, incluyendo los OP.

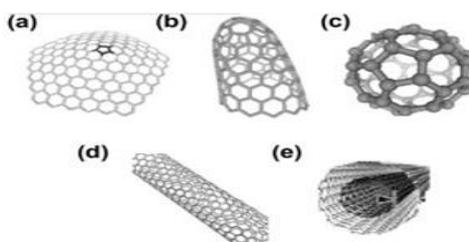


Fig. 2.17. Ejemplos de estructuras de nanotubos (a) Nanocono de carbono, (b) Nanocorno de carbono, (c) fullereno, (d) Nanotubo de carbono de pared sencilla, (e) Nanotubo de carbono multipared.

Como aplicación extractiva en fase sólida, se han realizado varias publicaciones donde se usa para la recuperación de pesticidas en jugos de frutas, ajo, agua marina y suelo; teniendo eficiencias de 73-103%, 97-104%, 79-102% y 54-91%; respectivamente [168, 169, 170, 171].

Generalmente los nanotubos tipo multipared ofrecen mayor capacidad de sorción que los SWCNTs debido a las capas concéntricas existentes de grafito [172].

Los nanomateriales más estudiados para la detección de pesticidas además de los CNTs, es el grafito, nanopartículas metálicas y los puntos cuánticos, especialmente desarrollados para el desarrollo de biosensores [173]. Presentan buenas opciones como

aplicación en marcadores químicos y biomarcadores. Ya que los nanomateriales son usados como transductores.

Con el uso de los nanomateriales como transductor y AChE como biomaterial, se han alcanzado valores en sensibilidad de 0.4 pM y 0.1 pM en muestras sintéticas de paraoxon [173], 0.1 ng/ml de paraoxon en saliva de rata [174], entre otros. Siendo valores similares a los obtenidos por los métodos oficiales; Debido a esto, los nanomateriales siguen siendo una opción viable para la determinación de pesticidas.

#### 2.3.4. Combinaciones.

Buscando mejorar las características analíticas del método desarrollado, algunos autores han realizado estudios combinando métodos extractivos con técnicas quimioluminiscentes y biosensores, Zhen-Lin Xu y colaboradores [175] desarrollaron una metodología que implica el uso de SPE acoplado al Inmunoensayo Quimioluminiscente Enzimático (SPE-dcCL-EIA) para la determinación de pesticidas OP en agua superficial, determinando paratión, cumafos, foxim, quinalfos, triazofos, diclofention y azinfos-etil, teniendo límites de cuantificación menores a 0.1 ng/ml.

## CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA PROPUESTA.

En este trabajo se describe un método de detección y evaluación de pesticidas del tipo organofosforado; mediante la aplicación de dos técnicas electroanalíticas: Voltamperometría Cíclica, con la se determinó los parámetros de trabajo y el transductor; con Amperometría de Pulsos, se realizó la optimización de parámetros y la detección propiamente de los plaguicidas. Cabe mencionar que esta última técnica nunca antes ha sido empleada en la determinación de pesticidas organofosforados. Así mismo se modificó la superficie del electrodo con el producto enzimático ya mencionado; el cual es utilizado en el saneamiento y descontaminación de armas químicas neurotóxicas presentes en agua; por ser sustratos específicos a la enzima OPH. Aumentando así, la sensibilidad en las determinaciones del biosensor. Fueron evaluados distintos plaguicidas sintéticos, además de muestras reales de agua potable.

A continuación se expone detalladamente cada una de las etapas implicadas en la preparación del biosensor. Así como los métodos empleados para la caracterización de la superficie del sensor. Por último, se describe el procedimiento utilizado para la evaluación de muestras sintéticas y reales.

### 3.1. SELECCIÓN DEL TRANSDUCTOR Y DE LOS PARÁMETROS DE DETERMINACIÓN DE PNP.

Todas las determinaciones electroquímicas fueron realizadas con un potenciostato CHI400A, apoyándose con un equipo agitador marca BASinstruments Rotating disk electrode RDE 2. Utilizando como electrodo de referencia y auxiliar Ag/AgCl/KCl 3M, respectivamente.

La temperatura estándar de trabajo fue 25 °C, así mismo se trabaja con una celda conteniendo siempre el electrolito soporte Britton-Robinson (2.16 ml ácido fosfórico, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 2.28 ml ácido acético, CH<sub>3</sub>COOH; 2.48 g ácido bórico, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 500 ml Agua, H<sub>2</sub>O; 450 ml Hidróxido de sodio, NaOH 0.2 M. Spectrochemicals), ajustado a un pH de 8.5; este electrolito es un buffer universal; se ha reportado alta sensibilidad en sensores modificados con esta enzima, manteniendo este valor [120, 176]. Además el proveedor recomienda mantener la enzima a este nivel de pH (Anexo I). Así mismo, el electrodo de trabajo giro a 750 rpm.

### 3.1.1. Selección del Transductor Adecuado para la Oxidación Electroquímica del PNP Producido por Hidrólisis Enzimática de los Pesticidas Organofosforados Cuantificados con Mínimo Ensuciamiento y Pasivación.

En la presente investigación se probaron los siguientes materiales como posibles electrodos de trabajo; carbono vítreo [Tokai GC 20, Japón; 3 mm de diámetro], grafito espectroscópico [Ringsdorf Werke, Alemania; 3 mm de diámetro], Ti/TiO<sub>2</sub> [Titanio comercial]; y grafito espectroscópico [Ringsdorf Werke, Alemania; 3 mm de diámetro] modificado con nanopartículas de oro [Spectrochemicals] utilizando la técnica de Khaydarov [177].

#### A. Preparación del electrodo GCE y SGE.

- a. Previo a cada determinación por Voltametría Cíclica y Amperometría de Pulsos, se aplicó un pre tratamiento de limpieza en los electrodos de titanio, grafito espectroscópico y carbono vítreo, para así obtener una superficie "limpia" y reproducible; es decir, los electrodos seleccionados, fueron pulidos individualmente, con el equipo Mini Vertical Milling/Drilling machine (Speedway series), durante 30 segundos (figura 3.1), con dos lijas humedecidas con agua destilada, de los números 1200 y 2400, alternando su uso. Concluyendo con enjuagues de agua destilada entre cada limpieza.



Fig. 3.1. Pulido de superficie de electrodo

#### B. Preparación del electrodo Ti/TiO<sub>2</sub>.

- a. En una celda electrolítica, utilizando como ánodo el electrodo de titanio y como cátodo un electrodo de platino comercial; sumergidos en una solución de glicerol al 70% (Spectrochemicals) disuelta con NH<sub>4</sub>F al 1% (Fluoruro de amonio, Spectrochemicals), aplicando un potencial de 30V por un tiempo de 2 horas.

### C. Preparación del biosensor enzimático SGE.

- a. Se prepara disolución de quitosano al 0.2% (Spectrochemicals) en agua destilada, posteriormente se mezcla con ácido acético 0.1M (Spectrochemicals), teniendo una solución final de 2% de concentración.
- b. Se realiza una disolución de Enzimática en agua, con una concentración de 100 mg/ml de agua destilada, de acuerdo a las especificaciones del proveedor (Anexo I). Figura 3.2 A).

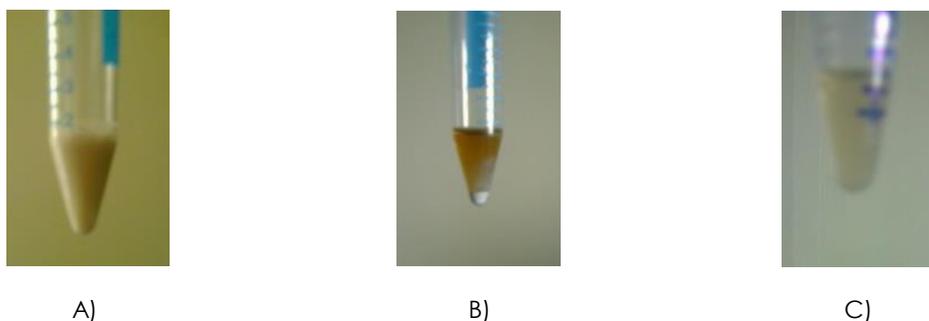


Fig. 3.2. A) Disolución pura Enzimática, previo a centrifugación. B) Disolución Enzimática centrifugada. C) Sobrenadante de disolución Enzimática.

- c. Se centrifuga a 3000 rpm por 10 min, preservándose el sobrenadante. Figura 3.2 A y B.
- d. Se hace disolución final en relación 1:1, es decir 50% de solución Enzimática con 50% de la mezcla de quitosano.
- e. La inmovilización de la enzima en la superficie se realiza por atrapamiento polimérico. Estando el electrodo girando a 750 rpm, se depositan 5  $\mu$ L de disolución quitosano-enzima superficialmente, dejándose reposar por 30 min. Posteriormente se colocan 5  $\mu$ L de glutaraldehído, dándole un tiempo de por 10 min. Se realizan enjuagues intermedios con agua destilada.

### D. Preparación del biosensor enzimático nAu-SGE

- a. Se prepara solución de nano partículas de oro suspendidas, aplicando el método electroquímico reportado por Khaydarov [177]. Usándose como ánodo y cátodo dos varillas pulidas de oro (5 mm de diámetro y 50 mm de largo), colocadas verticalmente y en paralelo, a una distancia de 10 mm. Los electrodos fueron sumergidos en 500 ml. de agua destilada. Se llevó a cabo electrolisis aplicando un voltaje constante de 25 V, cambiando la polaridad de la corriente cada 4 min,

manteniendo una agitación vigorosa para evitar la formación de precipitados y una temperatura de 60°C. La solución de nanopartículas obtenida fue filtrada con papel filtro, para descartar los coloides de oro presentes.

- b. Se prepara disolución de quitosano al 0.2% (Spectrochemicals) en agua destilada, posteriormente se mezcla con ácido acético 0.1M (Spectrochemicals), teniendo una solución final de 2% de concentración.
- c. Se realiza una disolución de Enzimática en la solución de nAu, con una concentración de 100 mg/ml de agua destilada, de acuerdo a las especificaciones del proveedor (Anexo I).
- d. Se centrifuga a 3000 rpm por 10 min, preservándose el sobrenadante.
- e. Se hace disolución final en relación 1:1, es decir 50% de solución Enzimática con 50% de la mezcla de quitosano.
- f. La inmovilización de la enzima en la superficie se realiza por atrapamiento polimérico. Se depositan 5  $\mu$ L de disolución quitosano-enzima superficialmente, dejándose reposar por 30 min. Posteriormente se colocan 5  $\mu$ L de glutaraldehído, dándole un tiempo de por 10 min. Se realizan enjuagues intermedios con agua destilada.

Será seleccionado como transductor, aquel que presente mayor sensibilidad de detección y exista menor pasivación de la superficie.

### 3.1.2. Determinación del Potencial del Electrodo de Trabajo Seleccionado para la Detección de PNP.

En la figura 3.3, se muestra un voltamograma típico para el PNP, el cual se obtuvo por Voltametría Cíclica, utilizando un electrodo de grafito espectroscópico y el electrolito soporte Britton-Robinson con un pH de 8.5.

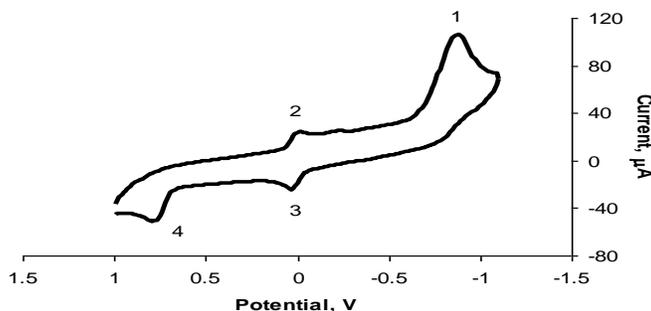


Fig. 3.3. Voltamograma cíclico para una solución de PNP 1 mM en solución amortiguadora Britton-Robinson pH 8.5. Electrodo de grafito espectroscópico.

En este gráfico se muestra la variación del rango de potencial entre +1.2 y +0.6 V/SGE, apreciándose 4 picos redox, tres de ellos aparecen asignados a la función nitro (picos 1, 2, y 3). El pico bien definido entre 0,6 V y 1,2 V/SGE (pico 4), se atribuye a la oxidación del grupo fenol, de acuerdo a la literatura previamente consultada, [178, 179, 180]. La detección de PNP se realizó directamente mediante el registro de esta corriente de oxidación mencionada. El pico 1 se describe mediante la ecuación 11, y los picos reversibles 2 y 3 son descritos con la ecuación 12:



En este estudio se evita la determinación indirecta de PNP, picos 2 y 3, debido a la baja estabilidad de los productos nitrosos formados, pico 2; y por la acumulación de subproductos en la superficie del electrodo, pico 3. Debido a esto, la determinación mayormente confiable de PNP se puede generar por el registro directo de sus corrientes de reducción y oxidación. En este trabajo, la evaluación de los compuestos PNP, proporcionales a la concentración de los plaguicidas organofosforados, se enfocará en la determinación de su potencial de oxidación directa, limitando las incrustaciones en la superficie del electrodo y su consiguiente pasivación.

Se aplica CV en la determinación del potencial anódico,  $E_{pa}$ , evaluando una solución de PNP 1mM, con un electrolito soporte Britton-Robinson.

### 3.1.3. Optimización de los Parámetros de Detección de PNP por Amperometría de Pulsos (PAD).

Una variante de la amperometría de potencial constante, es la Amperometría de pulsos, comúnmente utilizada para analitos que tienden a ensuciar los electrodos. Con esta técnica, un potencial de trabajo se aplica durante un corto período de tiempo, generalmente unos milisegundos, seguido de potenciales más altos o más bajos que se utilizan para la limpieza del electrodo. La corriente se mide sólo mientras se aplica el potencial de trabajo, posteriormente, mediciones de corriente secuenciales son procesados por el detector para producir una salida suave. PAD es la técnica más utilizada para la detección de los carbohidratos, después de una separación por intercambio de aniones.

Durante la aplicación de los potenciales de limpieza, la corriente y el ruido de fondo aumentan en comparación con lo esperado al usar Amperometría a potencial constante. Esto es debido a que el electrodo nunca se deja equilibrar durante más de unos pocos cientos de milisegundos antes de que nuevamente se de una pulsación. Por lo tanto, la optimización de los parámetros de PAD para la determinación de PNP, se consideró uno de los objetivos principales del presente trabajo.

Los parámetros seleccionados para la determinación PNP aplicando PAD se enlistan en la Tabla 3.1.

Potencial de Detección $E_d$ , V	Tiempo de Detección $\tau_d$ , ms	Potencial de Limpieza $E_{cl}$ , V	Tiempo de limpieza $\tau_{cl}$ , ms
$E_d=E_{pa}$	66,64	1.4	66.64
$E_d=E_{pa}$	66.64	1.4	166.6
$E_d>E_{pa}$	66.64	1.4	66.64
$E_d>E_{pa}$	66.64	1.4	166.6

Tabla 3.1. Parámetros para la determinación de PNP en PAD.

Durante la aplicación de PAD, se realizaron mediciones, igualando el potencial de detección con el anódico,  $E_d=E_{pa}$ , así como aumentando el potencial de detección respecto al anódico,  $E_d>E_{pa}$ . De esta manera, se identifican las posibilidades que ofrece la señal más alta que disminuya el ruido y genere una mayor señal de medición. Es decir, es esperado que al aumentar el potencial, se dé un incremento en la sensibilidad, y se favorezca el proceso de evolución del oxígeno, útil para la limpieza del electrodo.

Considerando  $E_d = 1.1$  V, durante las pruebas fueron constante el tiempo de detección ( $\tau_d=66.64$  ms) y el potencial de limpieza ( $E_{cl}= 1.4$  V). Cuando  $E_d= E_{pa}$ , se realizaron pruebas con distintos tiempos de limpieza ( $\tau_{cl}=66.64$  ms y 166.6 ms). Así mismo, al evaluar  $E_d > E_{pa}$ , se repitieron las pruebas con los tiempos de limpieza antes mencionados. Con la finalidad de medir la eficiencia del proceso de limpieza. Los valores de  $\tau_d$  y  $\tau_{cl}$  se seleccionan como múltiplos de la línea de energía eléctrica, la cual tiene períodos de 16,666 ms con el fin de reducir al mínimo el ruido que provoca.

El valor de 1,4 V para el potencial de limpieza fue elegido teniendo en cuenta datos encontrados en la literatura, lo que demuestra que el ensuciamiento más débil se logra en la región de evolución del oxígeno, probablemente debido tanto a la banda de burbujas de oxígeno presentes en las películas poliméricas y a la oxidación destructiva de

las películas por los radicales hidroxilo generados. Por lo tanto, los electrodos sucios podrían ser reactivados por la polarización anódica a altos potenciales [181]

### 3.2. MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DEL ELECTRODO.

En este trabajo se utilizó como fuente de la enzima, el producto enzimático de descontaminación producido por ECBC. Contiene OPH purificada obtenida de *Flavobacterium*. Una imagen física de la preparación granulada se muestra en la figura 3.4.



Fig. 3.4. Gránulos of Producto Enzimático.

Debido a que no se cuenta con un diagrama de su composición. Se adjunta en la figura 3.5, un ejemplo de un granulo que se usa en detergentes de ropa, mostrando sus partes componentes de la enzima. En esta figura, la capa interna es el núcleo, que puede estar compuesta de almidón, sacarosa, alcohol polivinílico (PVA) u otros materiales. Sirve de soporte para la enzima y proporciona resistencia mecánica para la baja generación de polvo. La capa enzimática está compuesta por la enzima, mezclada con PVA, proporcionando el poder de limpieza. En los EE.UU. y México, una capa de barrera de sulfato de amonio se utiliza para retirar el cloro del agua de lavado. Por último, la capa externa de  $\text{TiO}_2$ , PVA y el surfactante, proporcionan estabilidad a la enzima, bajo generación de polvo, y su color.

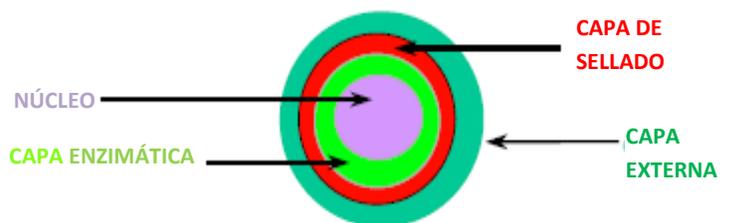


Fig. 3.5. Composición del gránulo

Como se certifica en la preparación comercial, de acuerdo al ANEXO II, la caracterización de la enzima en este trabajo se limitará solo a la determinación de la actividad de la enzima y a la evaluación de la capa de biorreconocimiento, lo que podría ser alterado durante el almacenamiento.

Durante la descripción de los distintos biosensores preparados durante este trabajo, se describe la técnica de inmovilización empleada de los biosensores enzimáticos propuestos.

### 3.2.1. Evaluación de la Actividad Enzimática.

Para evaluar la actividad enzimática, se preparó la muestra de la siguiente manera:

- Los gránulos de proteína se disolvieron en tampón Britton-Robinson, pH 8,5, a 25 °C (2%).
- Se tomó una muestra de la solución enzimática y se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm.
- Una alícuota del sobrenadante resultante se utilizó para los ensayos espectrofotométricos.

La actividad enzimática se mide mediante el control de la absorbancia del PNP formado durante la hidrólisis de paraoxon 1 mM, catalizada por la OPH, a 400 nm y un pH de 8.5. La siguiente fórmula se utiliza para calcular la actividad de la enzima:

$$U = \frac{\Delta A}{\Delta \tau} \frac{V_c}{\epsilon l V C} 10^6, \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \quad (13)$$

Dónde:  $\Delta A/\Delta \tau$  es el cambio de la absorbancia con el tiempo,  $\text{min}^{-1}$ ;  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar,  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ;  $l$  es la trayectoria de la luz, usualmente 1 cm;  $V_c$  es el volumen de la celda, L;  $V$  es el volumen de la muestra, mL;  $C$  es la concentración de proteínas,  $\text{mg mL}^{-1}$ .

La respuesta amperométrica de los biosensores depende de la cantidad de enzima inmovilizada en la superficie del electrodo. La actividad enzimática superficial se ha estimado midiendo el incremento de los valores de absorbancia, conforme aumenta la concentración de analito añadido. Como consecuencia de lo comentado, los valores del incremento de absorbancia obtenidos en cada caso se relacionan con la actividad enzimática mediante una curva de calibrado, en la que se representan dichos incrementos de absorbancia en función de la actividad enzimática que se obtiene y

utilizando disoluciones de OPH en cantidades ya conocidas. En este caso el calibrado ha sido preparado con disoluciones de enzima.

### 3.2.2. Inmovilización de la Enzima

Para garantizar la actividad catalítica se contempla la inmovilización de la enzima OPH por entrecruzamiento en un hidrogel de quitosano. Es de gran sencillez desde el punto de vista experimental, requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos, y como ventaja adicional, la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura.

El quitosano es un polímero natural (Fig. 3.6) que ha generado un enorme interés [182, 183, 184], debido a sus diversas ventajas como son actividad antimicrobiana, naturaleza hidrofílica, bajo costo y fácil disponibilidad; además de ser el segundo polímero natural más abundante; generado por desacetilación de la quitina, lo cual favorece su disolución en mezclas acuosas de ácido acético y fórmico. Se procesa fácilmente en películas y soportes porosos. Los hidrogeles obtenidos a partir de quitosano comparten su facilidad de procesamiento, presentan una buena biocompatibilidad y baja degradación.

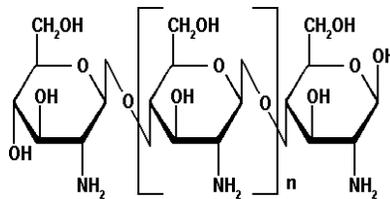


Fig. 3.6. Estructura molecular del quitosano

El quitosano por sí mismo fija la enzima a la superficie por medio de atrapamiento, pero al mezclarse con el glutaraldehído, un agente entrecruzante; se da una reacción entre el grupo aldehído y los grupos amino primarios del quitosano, formando un enlace imina. Debido a la resonancia establecida entre los enlaces dobles adyacentes, vía reacción de Schiff. Se obtiene, por lo tanto enlaces intermoleculares, entre estos dos componentes; irreversibles y resistentes a condiciones adversas de pH y temperatura.

El grado de entrecruzamiento es el principal parámetro de influencia en las propiedades de resistencia mecánica, hinchamiento y difusión, además de brindar una

estructura porosa. Condicionado por la concentración del agente entrecruzante, peso molecular, grado de desacetilación del quitosano y temperatura ambiente.

En la figura 3.7 se presenta una imagen del quitosano entrecruzado consigo mismo A) y del mismo estado presente entre esta proteína y el glutaraldehído, siendo soporte de la enzima OPH B). Este proceso se encuentra influenciado por ciertos parámetros como la concentración del agente entrecruzante, peso molecular, temperatura y grado de desacetilación del quitosano.

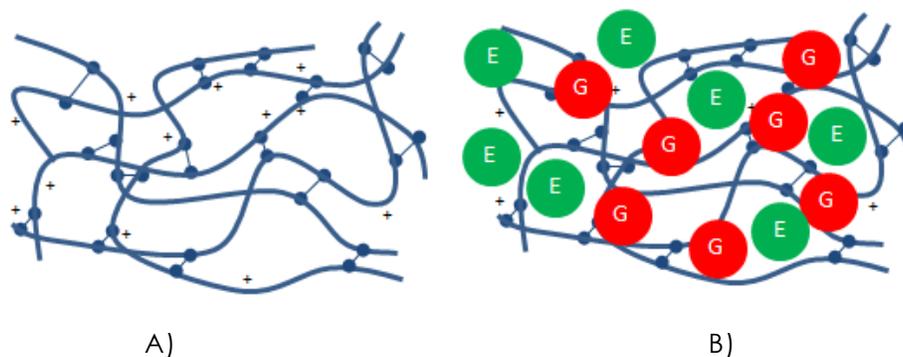


Fig. 3.7. A) Hidrogel de Quitosano entrecruzado [204]. B) Entrecruzamiento de Enzima OPH (E, círculo verde) en Quitosano y Glutaraldehído (G, círculo rojo).

Para comprobar que la naturaleza química del quitosano no altera los grupos reactivos de la enzima, se realiza evaluación por Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR). La figura 3.8 ilustra la arquitectura del biosensor.



Fig. 3.8. OPH inmovilizada en un gel de quitosano sobre la superficie del transductor electroquímico.

La técnica de FTIR permite el análisis de espectros complejos debido a su alta resolución y reproducibilidad. Basado en el principio del interferómetro de Michelson, la radiación golpea un divisor reflejante, escindiendo el haz de luz en dos, los haces son reflejados por dos espejos y retornados, interfiriendo con el divisor inicial. Uno de los espejos anteriores es móvil y posicionado frontalmente al haz de luz original, el segundo es fijo y perpendicular. La muestra se coloca en esta trayectoria y posteriormente el detector IR. La intensidad resultante de superponer los dos haces, se mide como desfase del espejo móvil al desplazarse respecto a la posición intermedia. Generando un gráfico, Intensidad V.S Desfase, y se denomina interferograma. Este gráfico contiene la información de todas

las frecuencias contenidas en el espectro completo, como una fotografía; y permite explicar las estructuras moleculares presentes en muestras de interés.

### 3.2.3. Aplicación y Caracterización de la Uniformidad de la capa de Biorreconocimiento con Respecto a la Optimización y Estandarización de los Métodos de Deposición.

Se evalúan dos técnicas potenciales para la aplicación de la capa de biorreconocimiento, la primera técnica es el recubrimiento por goteo (drop-coating) y la segunda es el recubrimiento por rotación (spin-coating), ver figura 3.6. El recubrimiento por goteo consiste en depositar gotas consecutivas de una solución en una superficie fija, formando una capa delgada y permitiendo que el disolvente se evapore. Por otra parte, el recubrimiento por rotación, implica dispensar con precisión un líquido sobre un sustrato físico, permitiendo que este gire, para lograr una película uniforme. Las ventajas y las limitaciones de cada técnica se indican en la Tabla 4.2. Para la aplicación de la capa enzimática se utiliza el soporte invertido del potenciostato CHI400A.

Como se mencionó anteriormente, dos técnicas se aplicarán para la deposición de la capa de biorreconocimiento de quitosano que contiene OPH: drop-coating y spin-coating (figura 3.9). El recubrimiento en gota consiste en la aplicación de una cubierta delgada de una muestra mediante el depósito de gotas consecutivas de una solución en su superficie, y permitiendo que el disolvente se evapore. En cambio el recubrimiento Spin implica dispensar con precisión un líquido sobre un sustrato, mientras este gira, para lograr una película uniforme. Las ventajas y los límites de cada técnica se listan en la Tabla 3.2.

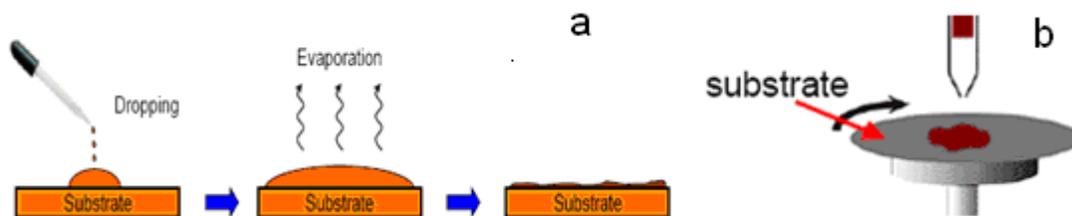


Fig. 3.9. A) Recubrimiento por goteo y B) recubrimiento por rotación.

Recubrimiento por Goteo		Recubrimiento por Rotación	
Ventajas	Desventajas	Ventajas	Desventajas
Sencillo	Espesor de difícil control	Buen control de espesor	Desperdicio de material
No desperdicio de material	Uniformidad pobre	Buena Uniformidad/ reproducibilidad	Película se seca rápido (Menor tiempo de ordenado de moléculas)

Tabla 3.2. Comparación Gota-recubrimiento y recubrimiento por rotación.

Se podría esperar que la escisión de revestimiento permita la obtención de una capa de biorreconocimiento uniforme y reproducible; por ende, resultados analíticos reproducibles. La uniformidad y la reproducibilidad de la capa depositada por ambas películas técnicas serán investigadas por microscopía electrónica de barrido.

Este método brinda información sobre la morfología y topografía de la superficie de los sólidos. Para obtener una imagen por microscopía de barrido electrónico de la superficie de un material, se focaliza sobre la muestra (de espesor suficiente para que sea opaca a los electrones) un haz de electrones acelerados por aplicación de un alto voltaje, realizando un barrido de la misma siguiendo una trayectoria de líneas paralelas.

En microscopía electrónica se trabaja siempre a vacío para que la trayectoria de los electrones no sea desviada por la presencia de átomos o moléculas ajenos a la muestra de análisis.

De todas las formas de radiación resultantes de la interacción del haz incidente y la muestra, hay dos realmente fundamentales en microscopía de barrido: los electrones secundarios y los electrones retrodispersados. Los primeros son electrones de baja energía (decenas de eV) que resultan de la emisión por parte de los átomos constituyentes de la muestra (los más cercanos a la superficie) debido a la colisión con el haz incidente. Los electrones retrodispersados son electrones del haz incidente que han interactuado (colisionado) con los átomos de la muestra y han sido reflejados. La intensidad de ambas emisiones varía en función del ángulo que forma el haz incidente con la superficie del material, es decir depende de la topografía de la muestra. De la señal producida por los electrones secundarios se obtiene una imagen de apariencia tridimensional de la muestra.

Para la caracterización de la superficie de los electrodos mediante esta técnica, es necesario que dicha superficie, una vez modificada, se encuentre totalmente seca.

### 3.3. CUANTIFICACIÓN DE PESTICIDAS OP POR AMPEROMETRÍA DE PULSOS USANDO EL SENSOR BASADO EN OPH.

#### 3.3.1. Cuantificación de Pesticidas OP en Muestras Sintéticas.

Una vez determinado los parámetros de trabajo por VC, basados en la tabla 3.1, se hizo la cuantificación de pesticidas sintéticos OP nitrofenil sustituidos; paraoxon, paratión, metil paratión y fenitrotión, por PAD, para así obtener el compuesto PNP. El PNP puede ser oxidado electroquímicamente en el ánodo, por un sensor electroquímico basado en OPH; lo cual implica la hidrólisis de los pesticidas en la capa enzimática y su respectiva detección anódica del PNP liberado. Las reacciones que se producen son las siguientes, se muestran en la figura 3.10, seleccionando al paraoxon como un modelo:

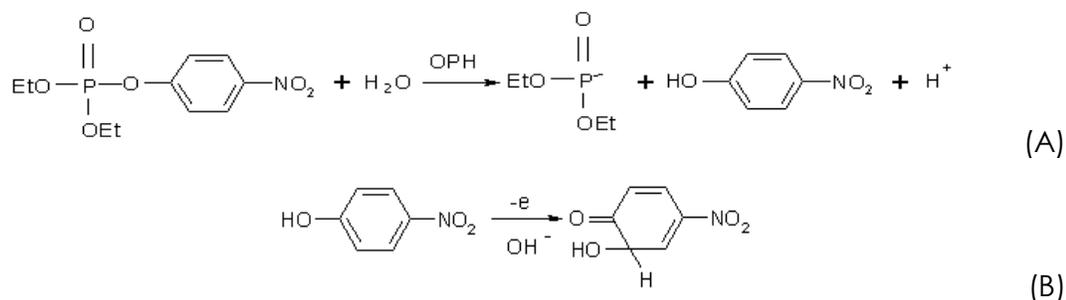


Fig. 3.10. Reacción enzimática de la enzima-sustrato OPH-Paraoxon [41].

La corriente de oxidación, que es la señal del sensor, medida a un potencial fijo, debe ser directamente proporcional a la concentración del PNP formado; y respectivamente, a la concentración del pesticida OP. La figura 3.10 A, ilustra los procesos que ocurren.

#### 3.3.2. Aplicación del Método Desarrollado en la Determinación de Pesticidas OP en Muestras Reales.

En este Proyecto se contempló la aplicación del método al análisis del agua potable en Mexicali, Baja California. La cual debe de estar libre de contaminantes, compuestos orgánicos volátiles, metales pesados (incluyendo selenio, uranio, arsénico y mercurio), así como pesticidas. De acuerdo con Los estándares de Calidad estipulados en

la norma mexicana NOM-127-SSA1-1994 [185] referente a la Salud Ambiental, agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización, la cual indica los límites permisibles para algunos plaguicidas. Así mismo, la OMS, indica también los valores de referencia provisional para todos los pesticidas aprobados.

### 3.4. VALIDACIÓN ANALÍTICA DEL MÉTODO.

La validación demuestra que el método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Se realiza mediante una serie de pruebas de las que se obtienen datos sobre los siguientes parámetros:

#### 3.4.1. Exactitud.

Grado de concordancia entre el resultado y un valor de referencia certificado. En ausencia de exactitud se tiene un error sistemático. Se llevará a cabo un análisis de varianza (ANOVA) para cada curva de calibración de los pesticidas evaluados. Para determinar si hay o no diferencia significativa entre la exactitud de los métodos comparados.

#### 3.4.2. Precisión.

Grado de concordancia entre los datos obtenidos de una serie. Refleja el efecto de los errores aleatorios producidos durante el proceso analítico. Se evaluará aplicando un tratamiento estadístico de los datos obtenidos que resulta en la determinación de los valores de la desviación estándar y de la desviación estándar relativa. La desviación estándar relativa o coeficientes de variación deben ser menores o iguales al 5%. La reproducibilidad puede ser 2 o 3 veces la repetibilidad.

#### 3.4.3. Sensibilidad.

Capacidad para discriminar entre pequeñas diferencias de concentración del analito. Se evaluará mediante la sensibilidad de calibración, que es la pendiente de la curva de calibración a la concentración de interés.

#### 3.4.4. Límite de detección (LOD).

Concentración correspondiente a una señal de magnitud igual al blanco más tres veces la desviación estándar del blanco. Se evaluará por tratamiento estadístico de los datos obtenidos.

#### 3.4.5. Límite de Cuantificación (LOQ).

Concentración correspondiente a 10 el límite de detección y es la cantidad mínima cuantificable. Se evaluará teniendo por tratamiento estadístico de los datos obtenidos para la construcción de la curva de calibración.

#### 3.4.6. Estabilidad de los biosensores.

Se evaluará la Reproducibilidad en la fabricación de los electrodos a lo largo, así como el Efecto de almacenamiento y el Tiempo de utilización del electrodo enzimático.

#### 3.4.7. Estudio cinético de la reacción enzimática.

Por lo cual se realizará el cálculo de la  $V_{max}$  y  $K_m$  para cada curva de calibración, según la ecuación de Michaelis-Menten. Determinando de esta forma la afinidad de la enzima al sustrato y su velocidad de reacción.

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 4.1. SELECCIÓN DEL TRANSDUCTOR Y DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DEL ELECTRODO DE TRABAJO.

Durante la evaluación por Voltamperometría Cíclica, el rango dinámico lineal de la determinación del PNP en el potenciostato CHI400A, fue de -0.4V a 1.25V, volviendo al valor inicial; realizándose cinco ciclos continuos. Se utilizó el electrolito soporte Britton-Robinson con un pH de 8.5, a una temperatura de 25°C y usando una solución de PNP 1 mM para la evaluación.

#### A. ELECTRODO GCE PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PESTICIDAS OP POR VOLTAMETRÍA CÍCLICA.

En la figura 4.1, se muestra un voltamograma para el PNP, obtenido por VC y utilizando como electrodo carbono vítreo (GC). Se realizan cinco ciclos completos.

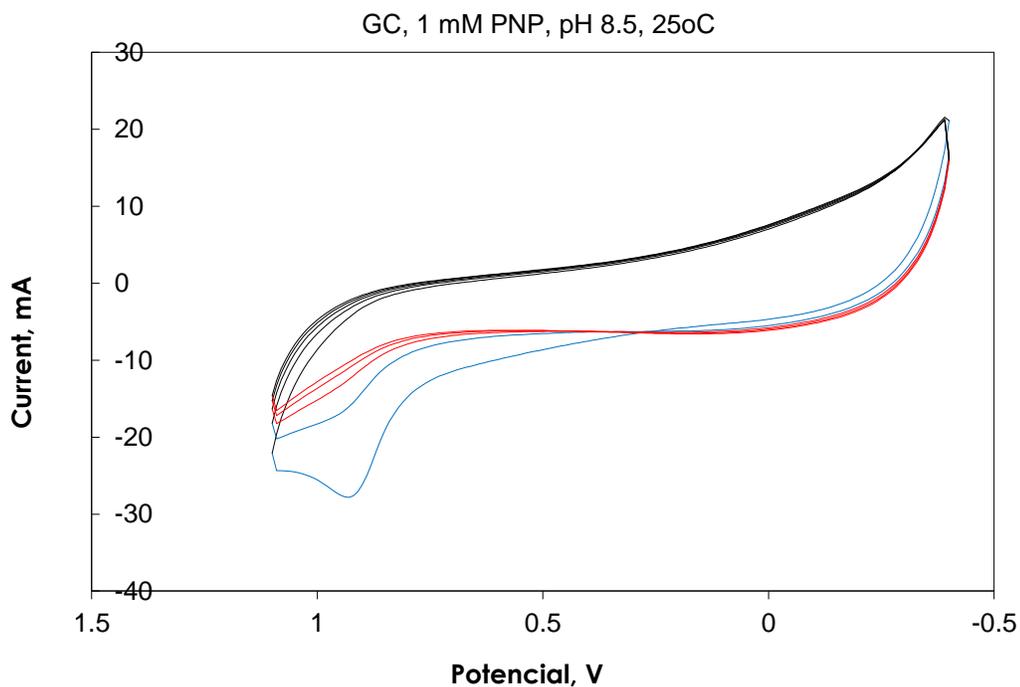


Fig. 4.1. Voltamograma cíclico para una solución de PNP 1 mM en búfer de Britton-Robinson pH 8.5. Electrodo de carbón vítreo.

Al realizar análisis continuos, las corrientes de oxidación del PNP disminuyeron debido a la pasivación del electrodo, por los compuestos fenoxi, subproductos de la hidrolisis, hasta dejar de detectarse dicho componente, aún antes de finalizar la prueba.

#### B. ELECTRODO SGE PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PESTICIDAS OP POR VOLTAMETRÍA CÍCLICA.

La evaluación de este material mostro que el grafito espectroscópico (SG) presenta resistencia a la pasivación, al terminar los cinco ciclos completos, el electrodo aún mostraba capacidad de detección del pico anódico, esto se muestra en la figura 4.2.

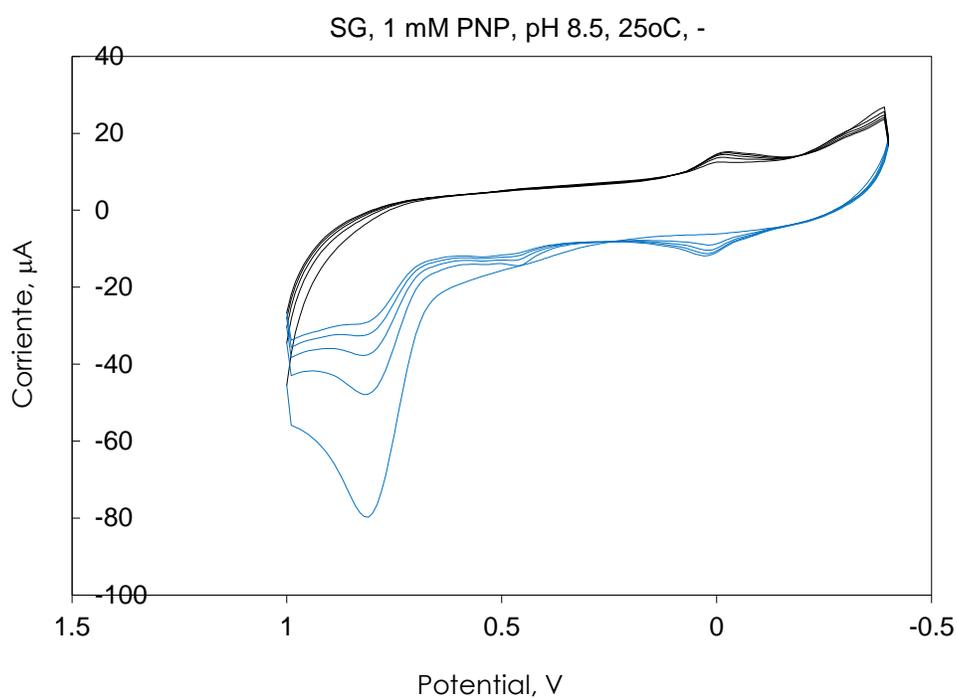


Fig. 4.2. Voltamograma cíclico para una solución de PNP 1 mM en búfer de Britton-Robinson pH 8.5. Electrodo de grafito espectroscópico.

Pruebas ulteriores mostraron que el transductor conservaba sus cualidades intactas de detección. En el voltamograma de la figura 4.3, se observa la prueba de 50 ciclos completos, donde continua mostrando sensibilidad para la detección.

### C. ELECTRODO Ti/TiO<sub>2</sub> PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PESTICIDAS OP POR VOLTAMETRÍA CÍCLICA.

Durante la evaluación de este material, no se detectó señal, por lo que se descarta como transductor. Se requieren estudios más profundos para su uso.

El análisis estadístico arrojó que el grafito espectroscópico presenta mayor linealidad y sensibilidad amperométrico en las determinaciones, con respecto al carbón vítreo; tal como se muestra en la figura 4.4.

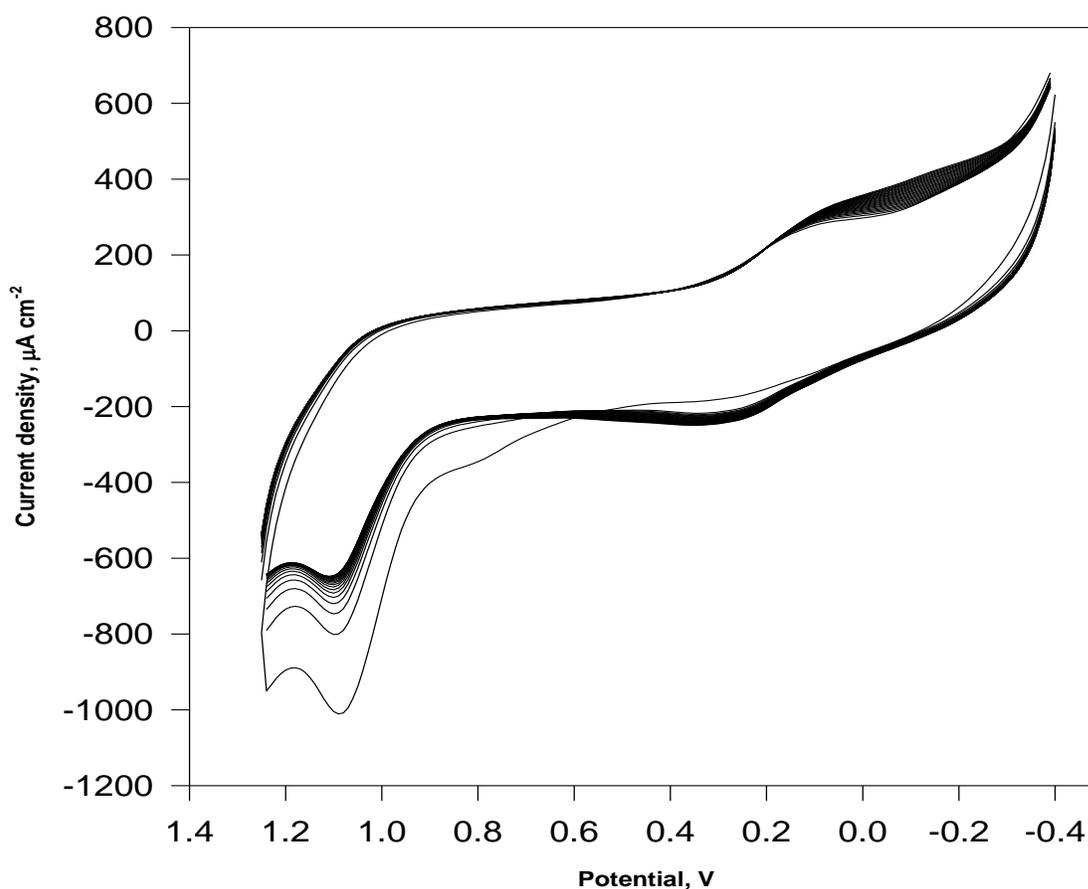


Fig. 4.3. Voltamograma cíclico para una solución de PNP 1 mM en solución búfer de Britton-Robinson pH 8.5, T= 25 °C. Electrodo de grafito espectroscópico. 50 ciclos evaluados.

Debido a los resultados obtenidos al probar los tres electrodos, se selecciona al material grafito espectroscópico como el transductor para la cuantificación de plaguicidas OP, como ya se mencionó antes, por mostrar una mayor sensibilidad y resistencia a la pasivación.

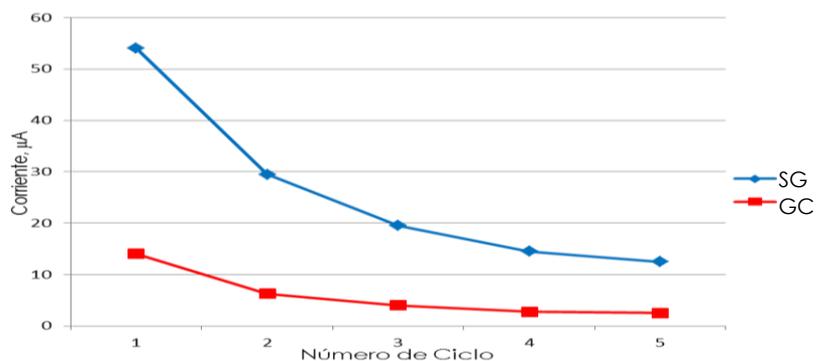


Fig. 4.4 Comparativo entre Carbón vítreo (GC) y Grafito espectroscópico (SG).

#### 4.2. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DETECCIÓN DE PNP POR AMPEROMETRÍA DE PULSOS (PAD).

Para determinar el potencial de trabajo ( $E_d$ ), se considera un potencial de limpieza en 1.4 V, aplicado a dos posibles tiempos  $\tau_{cl}$  = 66,64 ms/166,6 ms. Además de dos opciones como potencial de trabajo,  $E_d = E_{pa}$  y  $E_d > E_{pa}$ ; siendo  $E_{pa}$  igual a 1.1 V. Estos datos se basan en los resultados obtenidos por VC, considerando una temperatura de 25°C y el electrolito soporte Britton-Robinson a un pH de 8.5, evaluándose en total 4 opciones.

Durante las primeras pruebas se detectó que potenciales de trabajo muy altos, generan interferencias y por consiguiente afectan la sensibilidad de las determinaciones debido al ruido generado; se elige como potencial de trabajo,  $E_d = E_{pa}$ . También se considera en análisis, la necesidad o no del tiempo de limpieza requerido, utilizando Amperometría y Amperometría de Pulsos, para determinar en este último caso, el valor óptimo de limpieza. En todos los casos se utilizó el mismo valor de potencial de determinación y concentraciones finales de PNP en celda de 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{M}$ . Los datos obtenidos de su análisis estadístico se muestran en la figura 4.5, mostrando que al aplicar PAD y un tiempo de limpieza de 0.1666 s se obtiene el mayor rango de linealidad. Bajo las mismas condiciones de operación pero con concentraciones finales de PNP en celda de 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360 y 400  $\mu\text{M}$ , se vuelven a realizar estudios, los cuales se muestran en la figura 4.6. Nuevamente se observa que la curva con el número 3 es la que presenta el menor coeficiente de variación, así como el mayor valor de sensibilidad.

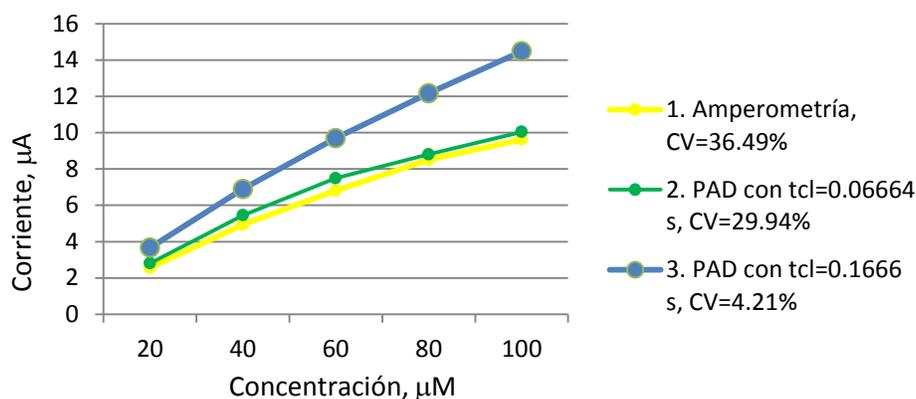


Fig. 4.5. Curvas de Calibración y Coeficientes de Variación obtenidos al determinar Paraoxon a las concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{M}$ . Aplicando: 1. Amperometría (●), 2. Amperometría de Pulsos a un  $\tau_{cl}=0.06664$  s (●) y con 3.  $\tau_{cl}=0.1666$  s (●).

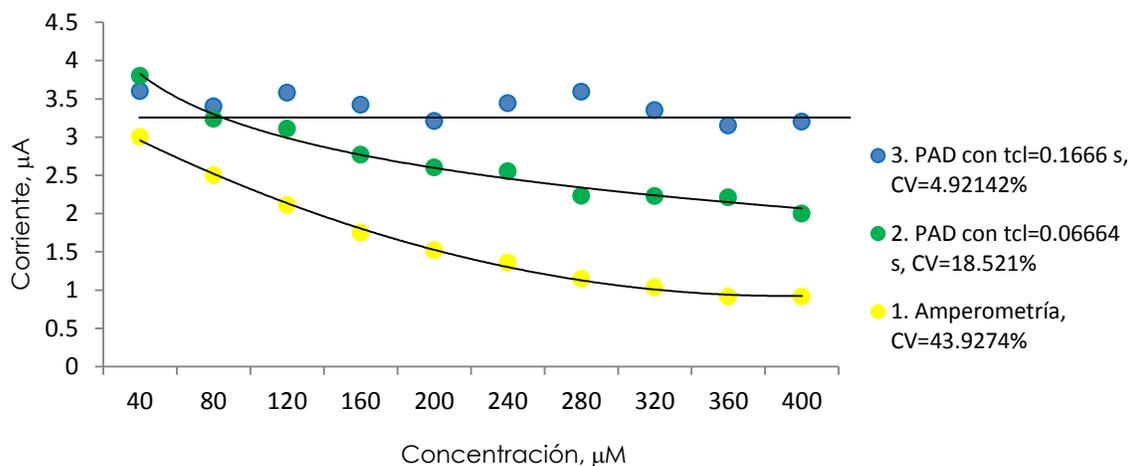


Fig. 4.6. Curvas de Calibración y Coeficientes de Variación obtenidos al determinar Paraoxon a las concentraciones de 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360 y 400  $\mu\text{M}$ . Aplicando: 1. Amperometría (●), 2. Amperometría de Pulsos a un  $\tau_{cl}=0.06664$  s (●) y con 3.  $\tau_{cl}=0.1666$  s (●).

El uso de PAD y la aplicación de potenciales de determinación en 1.1 V y tiempos de limpieza de 0.1666 s, quedan como las Condiciones Óptimas de Operación para las pruebas. Como se demostró ya, con la aplicación de esta técnica en tiempos de limpieza largos; se logra eliminar los radicales fenoxi que pasivan la superficie del electrodo de trabajo, favoreciendo así las determinaciones analíticas, ya que el mayor rango de linealidad y los mejores coeficientes de variación (4.21% y 4.92%) se obtienen en este caso.

### 4.3. DESARROLLO DEL SENSOR AMPEROMÉTRICO MODIFICADO CON LA ENZIMA ORGANOFOSFOHIDROLASA.

#### 4.3.1. Evaluación de la Actividad Enzimática de la Enzima OPH Presente en el Producto Enzimático.

Al evaluar las aptitudes de la enzima como elemento de biorreconocimiento, se determinó su actividad enzimática. Las concentraciones en que fue evaluada la actividad de la enzima y los resultados obtenidos, se muestran en la tabla 4.1 y en la figura 4.7; respectivamente, teniendo como condiciones de operación 25°C y un pH de 8.5.

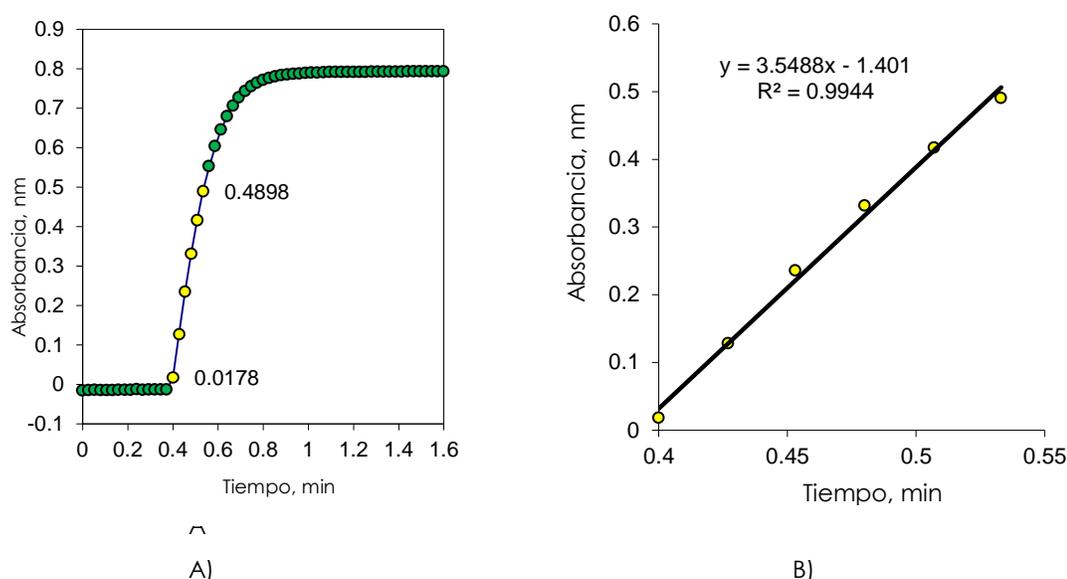


Fig. 4.7. A) Curva de Actividad Enzimática. B) Ecuación lineal de la Actividad Enzimática.

E, mg/ml	t, min	Absorbancia, nm
2	0.4	0.0178
2	0.427	0.1276
2	0.453	0.2354
2	0.48	0.3314
2	0.507	0.4165
2	0.533	0.4898
$\Delta=$	0.133	0.472

Tabla 4.1. Datos para calcular ecuación de la recta para Actividad Enzimática.

$$U = \frac{\Delta A}{\Delta \tau} \frac{V_c}{\epsilon l V C} 10^6, \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \quad (1)$$

De acuerdo a la gráfica anterior, la parte lineal de la gráfica tomo valores entre 0.0178 a 0.4898 nm, sirviendo de base para su análisis estadístico, datos que se muestran en la figura 4.6B y en la tabla 4.1.

A partir de la ecuación 1, se calcula en unidades equivalentes ( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$  proteína) la actividad enzimática de la enzima OPH, presente en el producto enzimático. Considerando:  $\Delta A = 0.472$  nm,  $\Delta\tau = 0.133$  min,  $V_c = 0.002$  L,  $\epsilon = 17,000$   $\mu\text{mol}$  [176, 186] y  $10^6 =$  Factor de conversión ( $\mu\text{mol}$  de  $\epsilon$  convertidos a mol).

$$U = \frac{(0.472)}{(0.133 \text{ min})} \times \frac{(0.002 \text{ L}) \mu\text{mol}\cdot\text{cm}\cdot\text{ml}}{(17,000 \text{ L}\cdot\text{cm})(1 \text{ ml})(0.02 \text{ mg})\text{min}} 10^6 =$$

$U = 20.9 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$  de proteína.

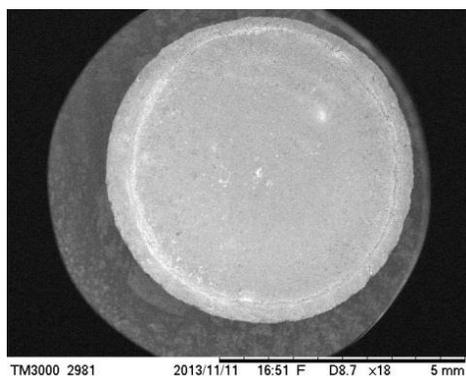
Demostrando que la enzima presente en el producto está activa y puede ser utilizada durante el uso del biosensor.

#### 4.3.2. Caracterización de la Uniformidad de la Capa de Biorreconocimiento con respecto a la Optimización y Estandarización de los Métodos de Deposición.

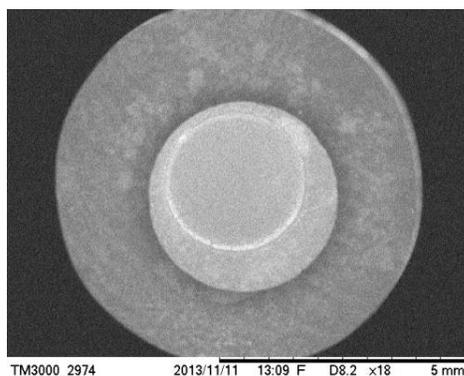
Al observar las muestras de la figura 4.8, se confirma que el método de recubrimiento por goteo es la opción más adecuada para realizar la aplicación del recubrimiento, ya que las imágenes superficiales de los electrodos analizados por SEM, presentan mayor porosidad en la capa formada.

#### 4.3.3. Evaluación de la Estabilidad Enzimática Mediante FTIR.

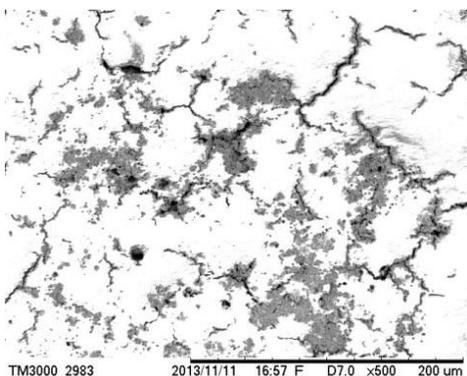
En la figura 4.9, se observan los espectros evaluados por Espectroscopia de Infrarrojo por Transformadas de Fourier (FTIR) para las siguientes muestras: quitosano, enzima; estando en forma individual y en mezcla. Los resultados para el espectro de quitosano puro mostraron los picos característicos en las regiones de  $3410 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1580 \text{ cm}^{-1}$  y  $1055 \text{ cm}^{-1}$  de los grupos funcionales R-OH, -N-H y -C-O-C, respectivamente. Así mismo, el espectro de la enzima pura, muestra picos de absorción característicos a 3355, 2920, 1660, 1426, 1055 y 602 para los grupos R - NH - R, - CH<sub>2</sub>-, - COO -, C - O - C-, C=O y C-OH.



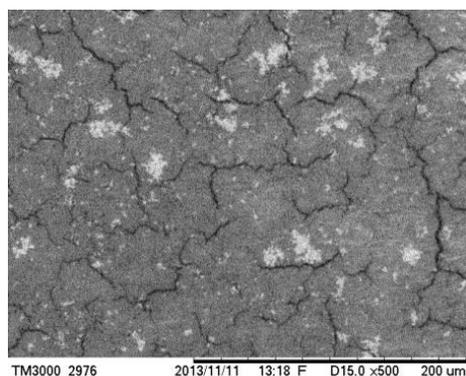
A)



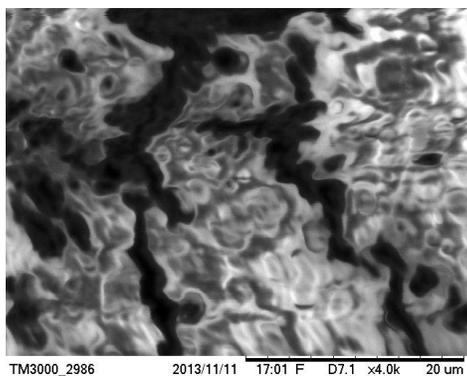
B)



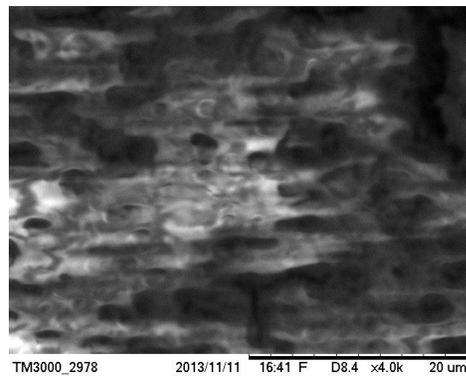
C)



D)



E)



F)

Fig. 4.8. Micrografía en 18X, 500X y 4000X para el recubrimiento por goteo (A, C, E) y por giro (B, C, F).

A partir de los espectros de FTIR se infiere que en la mezcla de enzima/quitosano no se presentan otros picos de absorción que no correspondan a los espectros de sus componentes individuales y por lo tanto el análisis por FTIR no muestra evidencia de cambios fuertes de interacción química que cambie la naturaleza de los grupos funcionales de la enzima por parte del quitosano. Es decir, presenta estabilidad durante el proceso de inmovilización.

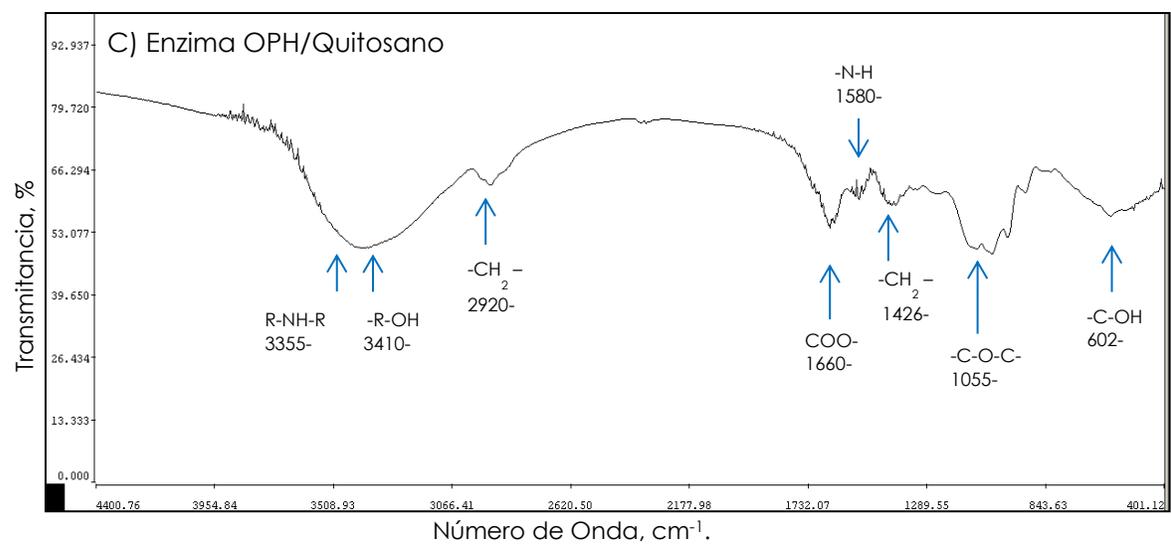
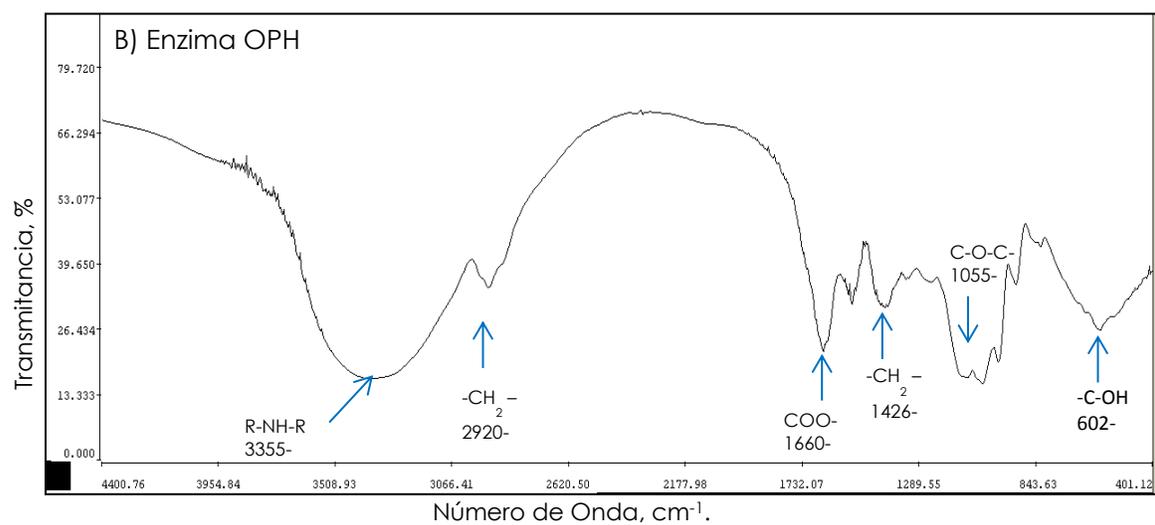
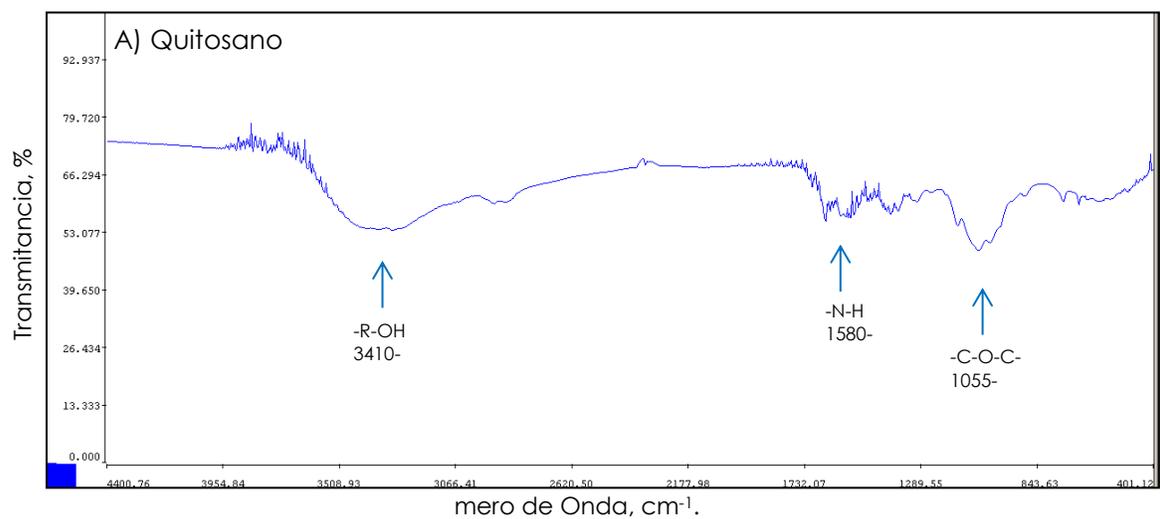


Fig. 4.9. Espectros de FTIR de Quitosano, Enzima OPH y mezcla Enzima/Quitosano.

#### 4.4. BIOSENSORES.

Para la cuantificación de los plaguicidas se realizaron dos diseños, el primero fue el biosensor SGE y la segunda opción fue el biosensor SGE/nAu, los resultados obtenidos se muestran a continuación.

##### 4.4.1. BIOSENSOR SGE/nAu MODIFICADO CON OPH.

Durante la evaluación No se encuentran diferencias significativas de sensibilidad, linealidad y coeficientes de variación entre este diseño y el anterior, por lo que se descarta. Estudios más profundos son requeridos, para potenciar sus características analíticas.

##### 4.4.2. BIOSENSOR SGE MODIFICADO CON OPH.

Este biosensor presento una mejora sustancial en la sensibilidad de las determinaciones, lo cual se demuestra en el apartado sobre cuantificación de los pesticidas sintéticos. Durante esta evaluación se realiza la respectiva validación analítica.

##### 4.4.3. Efecto de la Temperatura.

Los resultados de evaluar el efecto de la Temperatura, en el desempeño y sensibilidad de la determinación de Paraoxon como analito, se muestran en la figura 4.10; ambas curvas se realizaron con el biosensor SGE con OPH, bajo las mismas condiciones de operación y concentración. El comportamiento de la curva de calibración a 25°C, muestra un menor rango de linealidad comparado con los resultados obtenidos a 50°C; es decir, a mayor temperatura el rango de linealidad se duplica. Durante las pruebas se obtienen valores entre 5 a 80  $\mu\text{M}$  y de 5 a 160  $\mu\text{M}$  para las temperaturas menor y mayor, respectivamente. Esto coincide con los datos presentados por el proveedor de la enzima, que indica una mayor actividad para el pesticida paraoxon (Anexo II). El presente trabajo se desarrolla con la primera temperatura.

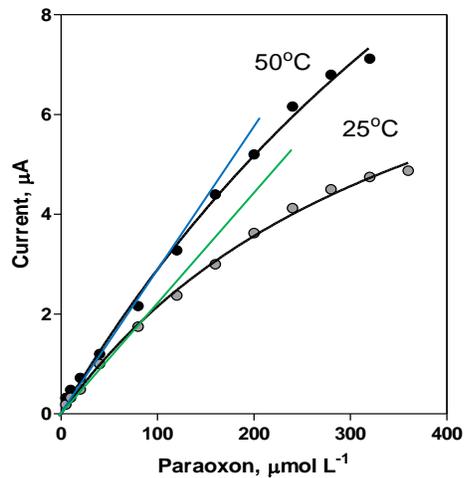


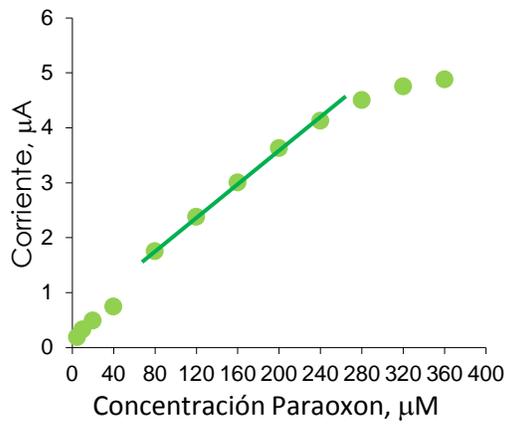
Fig. 4.10. Comparativo entre Curvas de Calibración para el Paraoxon a 25 y 50°C.

#### 4.4.4. Cuantificación de Pesticidas OP en Muestras Sintéticas.

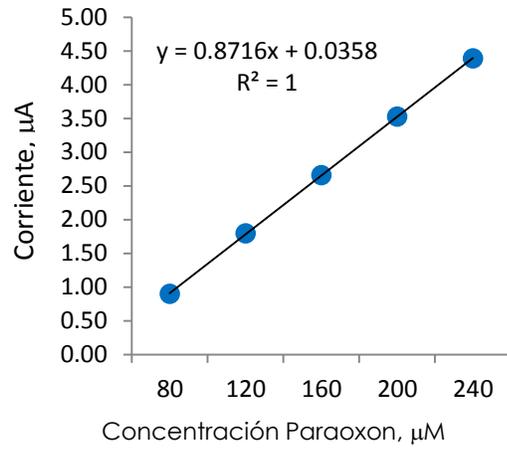
Soluciones sintéticas de los plaguicidas paratión etil, paratión metil y fenitrotión, con relaciones de concentración final en celda de 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360 y 400  $\mu\text{M}$  fueron evaluadas; para el paraoxon solo se evaluó hasta 360  $\mu\text{M}$ . Bajo las siguientes condiciones: solución búfer Britton-Robinson en pH 8.5, temperatura de 25 °C y 750 rpm. Se utiliza el biosensor SGE modificado con OPH. Los amperogramas registrados aplicando el método PAD se trataron analíticamente, obteniendo las siguientes curvas de calibración, mostrados en la figura 4.11. Los datos del plaguicida fenitrotión presento coeficientes de variación mayores al 5%, por lo que se descartan sus resultados, estudios más profundos son requeridos.

Pesticida	Linealidad $\mu\text{mol/L}$ - $\mu\text{g/L}$	RSD %	$R^2$	Sensibilidad A L/mol
Paraoxon	80-240	1.44	0.9983	0.87
Paratión	40-280	2.08	0.9966	0.98
Paratión metil	40-200	2.96	0.9619	1.77
Fenitrotión	**	**	**	**

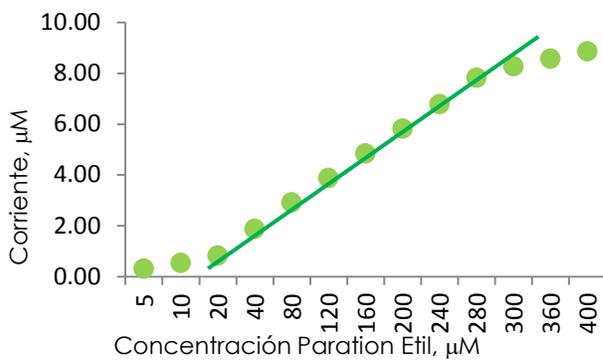
Tabla 4.2. Datos obtenidos de la evaluación de pesticidas.



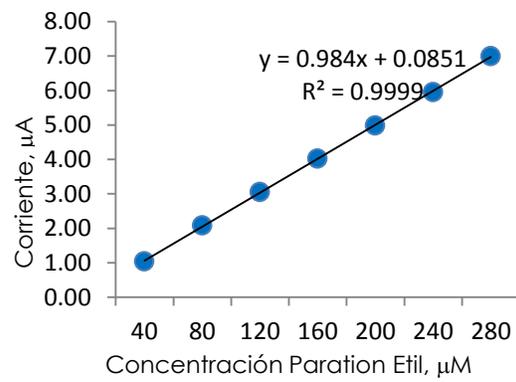
A)



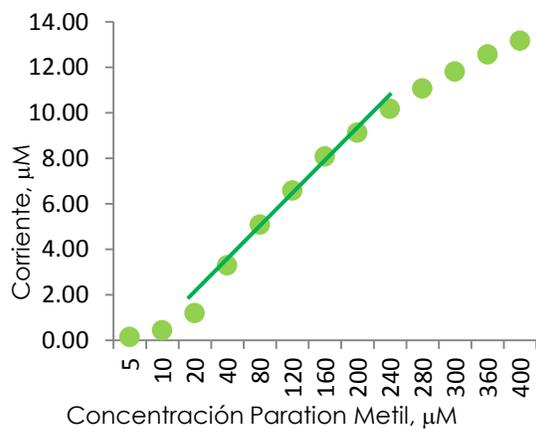
B)



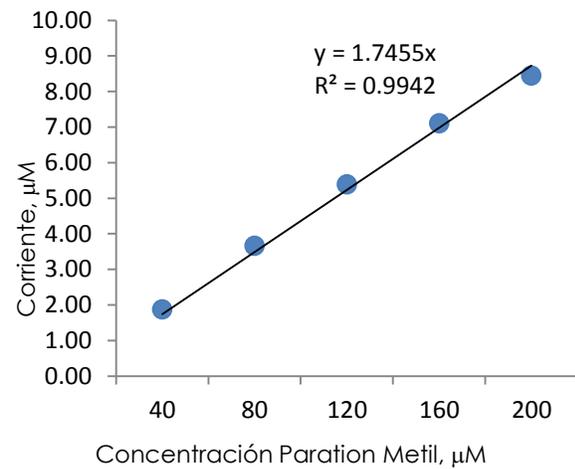
C)



D)



E)



F)

Fig. 4.11. Curvas de Calibración para los pesticidas A) Paraoxon, C) Paratión etil y D) Paratión metil. Y Rangos de linealidad para B) Paraoxon, D) Paratión etil y E) Paratión metil.

Los resultados bajo las condiciones antes descritas para los pesticidas paraoxon, paratión etil y paratión metil; respectivamente, muestran un rango de linealidad de 80 a 240, 40 a 280 y 40 a 200  $\mu\text{M}$ . Con coeficientes de variación de 1.75, 3.98 y 4.93%; valores de linealidad en 0.999, 0.9999 y 0.9986. Así como límites de detección de 0.05, 0.12 y 0.14; y límites de cuantificación de 0.52, 1.22 y 1.4. Al realizar análisis de varianza de diferentes curvas de calibración para los mismos pesticidas, mediante la prueba ANOVA; el pesticida Paraoxon fue el único que obtuvo una  $F_{\text{calc}} < F_{\text{tabla}}$ , es decir  $F_{\text{calc}} = 0.278$  y  $F_{\text{tabla}} = 3.89$  con un 95% de confiabilidad.

Los estudios de repetibilidad, bajo las condiciones de operación antes expuestas y con teniendo concentraciones finales en celda de 200  $\mu\text{M}$ , para cada uno de los pesticidas mostraron coeficientes de variación en rangos de 1.75%, 2.08% y 3.15% para el paraoxon, paratión etil y paratión metil.

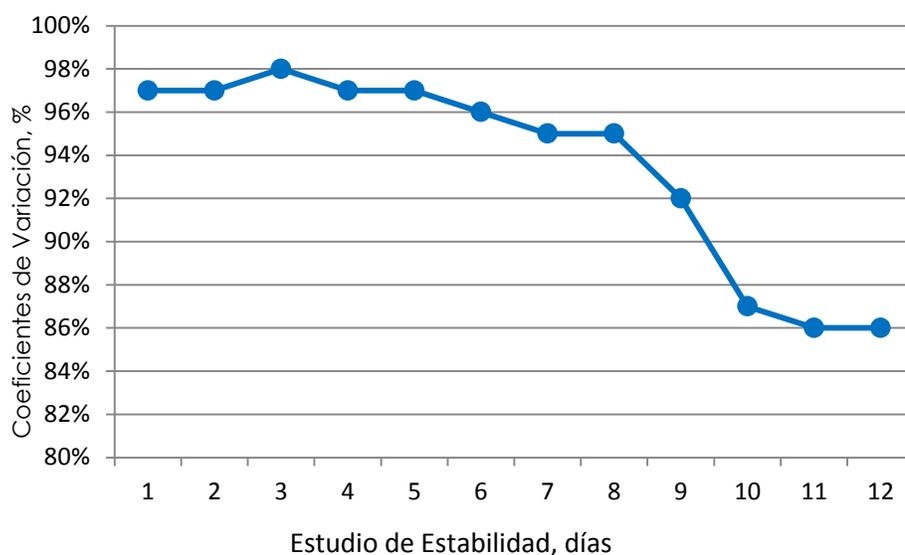


Fig. 4.12. Estabilidad del Biosensor a través del Tiempo.

Se llevan a cabo también estudios de Reproducibilidad, únicamente para el pesticida paraoxon. Y nuevamente bajo las mismas condiciones de operación, con concentraciones finales en celda de 40  $\mu\text{M}$ , pero elaborando un electrodo distinto en cada ocasión, el coeficientes de variación obtenido fue de 4.71%.

El análisis de estabilidad del biosensor a través del tiempo, mostraron coeficientes de variación menores al 5% hasta el día 8, en este caso, el valor fue igual al 5%, a partir de

este día dejaron de ser fiables sus resultados. Esto se traduce en eficiencias mayores al 95% hasta el día 8 antes mencionado, posterior a este día, tiende a decaer, tal como se muestra en la figura 4.12.

El estudio de cinética enzimática mediante la ecuación de Michaelis-Menten, para cada uno de los sustratos, revelo una menor velocidad de reacción de la enzima hacia el Paraoxon; aunque presento también una mayor afinidad enzimática, coincidiendo con los valores reportados en el certificado del producto comercial (Anexo II) y los estudios reportados previamente por Aubert [187] y Caldwell [188].

Sustrato	Km	Vmax	Km/Vmax
Paraoxon	465	11.86	39.2
Paratión	206	11.79	17.47
Paratión metil	246	19.98	12.31
Fenitrotión	**	**	**

Tabla 4. 3. Valores de Km, Vmax, Km/Vmax para cada sustrato analizado.

\*\* No determinado, se requieren mayores estudios.

Los resultados de recuperación al cuantificar el pesticida paraoxon en muestras de agua potable, utilizando el electrolito soporte Britton-Robinson a pH 8.5, 750 rpm y 25°C. Así mismo evaluando concentraciones de 20 y 40  $\mu\text{M}$  en forma acumulada; dieron valores de 97.77 y 102.5% de recuperación.

## CONCLUSIONES

El impacto de los residuos de pesticidas puede ser manejado y analizado por un sinnúmero de técnicas, muchas de las cuales presentan mayor sensibilidad, pero requieren mayor inversión de tiempo, dinero y capacitación, de lo cual, en ocasiones no se dispone. Es por ello la preponderancia de buscar métodos alternos, que den resultados en menor tiempo, cumpliendo con las estipulaciones analíticas requeridas nacionales e internacionales.

Una estrategia eficaz para hacer frente a la contaminación por plaguicidas en el medio ambiente, no solo los organofosforados; es comenzar con una evaluación de la magnitud del problema, no solo dejarlo a la detección si no implementar también medidas de prevención. Haciendo de herramientas como es la capacitación y el cumplimiento a las medidas mínimas de aplicación.

Por primera vez la técnica de Amperometría de Pulsos mediante el uso de biosensores es utilizada para la determinación de los pesticidas organofosforados e, por lo que se comprueba la hipótesis planteada durante esta investigación. Lo cual brinda una opción redituable para la detección de pesticidas, al hacer uso de un producto comercial y dejar de lado las implicaciones que conlleva el aislamiento de la enzima. Dando resultados satisfactorios analíticamente hablando y abriendo la puerta hacia el desarrollo de nuevas opciones de detección. La optimización de reacciones enzimáticas, mediante su análisis de operación. Así como el uso de vías enzimáticas alternas, para la detección de un mayor número de pesticidas.

Cabe mencionar que este producto fue diseñado con alta sensibilidad hacia la descontaminación de agua por armas químicas, es de esperarse que se utilicen enzimas modificadas genéticamente especialmente para su uso en biosensores, ya que estas tendrán mayor sensibilidad analítica hacia los mismos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[ 1 ]	FAOSTAT. 2014, FAOSTAT
[ 2 ]	de Salud, L. G. (2010). SSA.
[ 3 ]	EPA. 2014, EPA.
[ 4 ]	Semarnat. Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave y de Desempeño Ambiental. Edición 2012. México. 2013.
[ 5 ]	Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California. 2014, CESAVEBC.
[ 6 ]	SSA, Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Sistema Único de Información. Núm. 34, Vol. 30, Sem 34 2013, pag 1-28.
[ 7 ]	Secretaría De Salud, Subdirección de Baja California, 2014
[ 8 ]	Aldana-Madrid, M., Molina-Romo, E. D., Rodríguez-Olibarría, G., & Silveira-Gramont, M. I. (2005, March). Study of organophosphate insecticides and biochemical indicators in blood and urine of urban adult males. In ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (Vol. 229, pp. U78-U78). 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036 USA: AMER CHEMICAL SOC.
[ 9 ]	Han, D. H. (2011). Airborne Concentrations of Organophosphorus Pesticides in Korean Pesticide Manufacturing/Formulation Workplaces. <i>Industrial health</i> , 49(6), 703-713.
[ 10 ]	Herrera, N. E. P., Mejía, J. A. A., Burguete, M. T. C., Navarrete, R. L. G., & Vega, M. B. Q. Efectos reproductivos En agricultorEs Expuestos a plaguicidas En Muna, Yucatán. <i>Género, ambiente y contaminación por sustancias químicas</i> , 79.
[ 11 ]	GARCÍA, E. C., González, G. D., Tolentino, R. G., PÉREZ, M. N., FLORES, G. P., & LEÓN, S. V. Y. Residuos de plaguicidas organoclorados en leche de cabra de querétaro, querétaro, México. <i>Veterinaria México OA</i> , 38(003).
[ 12 ]	Osuna-Flores, I., & Riva, M. C. (2004). Plaguicidas organofosforados en camarones, sedimento y agua superficial de la Bahía de Ohuira, Topolobampo, Sinaloa, México. <i>Afinidad</i> , 61(513), 387-392.
[ 13 ]	García-Hernández, J., Romero-Hernández, S., & Cadena-Cárdenas, L. (2009). Monitoring water quality for human users and the environment in the Hardy River, Baja California, Mexico. Phase II.
[ 14 ]	HERNÁNDEZ-ANTONIO, A., & HANSEN, A. M. (2011). Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. <i>Revista internacional de contaminación ambiental</i> , 27(2), 115-127.
[ 15 ]	García-de la Parra, L. M., Cervantes-Mojica, L. J., González-Valdivia, C., Martínez-Cordero, F. J., Aguilar-Zárate, G., Bastidas-Bastidas, P., & Betancourt-Lozano, M. (2012). Distribution of pesticides and PCBs in sediments of agricultural drains in the Culiacan Valley, Sinaloa, Mexico. <i>Archives of environmental contamination and toxicology</i> , 63(3), 323-336.

[ 16 ]	Norma, P. F., & Miguel, E. M. DIAGNÓSTICO PARTICIPATIVO Y ANÁLISIS DEL PAISAJE COMO ELEMENTOS PARA LA ELABORACIÓN DEL MODELO DE MANEJO TERRITORIAL DE SANTA CATARINA DEL MONTE, MUNICIPIO DE TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO. GLOBALIZACIÓN Y TERRITORIOS RURALES: ESTÍMULO PARA EL DESARROLLO TERRITORIAL RURAL., 1.
[ 17 ]	Peruzzo, P., Marino, D., Cremonte, C., Da Silva, M., Porta, A., & Ronco, A. (2003). Impacto de pesticidas en aguas superficiales y sedimentos asociado a cultivos por siembra directa. In Memorias Conferencia Internacional Usos del Agua, Cartagena de Indias (pp. 135-142).
[ 18 ]	Corbett, J. R.; Wright, K. & Baillie, A. C. (1984). The biochemical mode of action of pesticides, 2nd ed., Academic press, ISBN 0-12-187860-0, ISBN-13: 978-0-12-187860-3, London
[ 19 ]	Eto, M. (1974). Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry. In Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry. CRC press.
[ 20 ]	Hassal, K. A. (1982). The Chemistry of Pesticides Verlag Chemie.
[ 21 ]	Gupta, R. C. (Ed.) (2005). Toxicology of organophosphate & carbamate compounds, 1st ed., Elsevier Academic Press ISBN-10: 0-12-088523-9, ISBN-13: 978-0-12-088523-7, London
[ 22 ]	COFEPRIS. Catálogo de plaguicidas, 2004.
[ 23 ]	DeFrank, J. J. (2006). Catalytic Enzyme-Based Methods for Water Treatment and Water Distribution System Decontamination. 1. Literature Survey (No. ECBC-TR-489). EDGEWOOD CHEMICAL BIOLOGICAL CENTER ABERDEEN PROVING GROUND MD RESEARCH AND TECHNOLOGY DIR.
[ 24 ]	Monroy-Noyola, A., Sogorb, M. A., & Vilanova, E. (2007). Stereospecific hydrolysis of a phosphoramidate as a model to understand the role of biotransformation in the neurotoxicity of chiral organophosphorus compounds. Toxicology letters, 170(2), 157-164.
[ 25 ]	Battershill, J. M., Edwards, P. M., & Johnson, M. K. (2004). Toxicological assessment of isomeric pesticides: a strategy for testing of chiral organophosphorus (OP) compounds for delayed polyneuropathy in a regulatory setting. Food and chemical toxicology, 42(8), 1279-1285.
[ 26 ]	Garrison, A. W. (2006). Probing the enantioselectivity of chiral pesticides. Environmental science & technology, 40(1), 16-23.
[ 27 ]	Aldana-Madrid, M. L., Silveira-Gramont, M. I., Zuno-Floriano, F. G., & Rodríguez-Olibarría, G. (2013). Insecticide Residuality of Mexican Populations Occupationally Exposed.
[ 28 ]	Matsumura, F. (1980). Toxicology of insecticides, Plenum Press, ISBN-10: 0-306-30787-1, ISBN-13: 978-0-306-30787-4, New York
[ 29 ]	Costa, L. G. (2006). Current issues in organophosphate toxicology. <i>Clinica chimica acta</i> , 366(1), 1-13.
[ 30 ]	Ashani, Y., Leader, H., Rothschild, N., & Dosoretz, C. (1998). Combined effect of organophosphorus hydrolase and oxime on the reactivation rate of diethylphosphoryl-acetylcholinesterase conjugates. <i>Biochemical pharmacology</i> , 55(2), 159-168.
[ 31 ]	Stoytcheva, M. (2010). Enzyme vs. Bacterial Electrochemical Sensors for Organophosphorus Pesticides Quantification.

[ 32 ]	Jiang, W., Murashko, E. A., Dubrovskii, Y. A., Podolskaya, E. P., Babakov, V. N., Mikler, J., ... & Lockridge, O. (2013). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of titanium oxide-enriched peptides for detection of aged organophosphorus adducts on human butyrylcholinesterase. <i>Analytical biochemistry</i> , 439(2), 132-141.
[ 33 ]	UNIÓN EUROPEA, 2014
[ 34 ]	PAN, 2014
[ 35 ]	CONAGUA. Compendio de Procedimientos operativos estandarizados para la Comisión Nacional del Agua. Edición 2013. México. 2014.
[ 36 ]	Stoytcheva, M., & Zlatev, R. (2011). Organophosphorus pesticides analysis. <i>Pesticides in the modern world-Trends in Pesticides Analysis (M. Stoytcheva, Ed.)</i> . InTech, Croacia, 143-164.
[ 37 ]	Dagnac, T., & Jeannot, R. (2006). Herbicide residues in the environment. <i>ChemInform</i> , 37(52).
[ 38 ]	Schlecht, P., O'Connor, P. F., Key-Schwartz, R., Lunsford, A., & Gagnon, Y. (2011). Analytical Performance Issues: NIOSH Manual of Analytical Methods 5th Edition—New Resources and Direction. <i>Journal of occupational and environmental hygiene</i> , 8(7), D59-D62.
[ 39 ]	Beceiro-González, E., Concha-Graña, E., Guimaraes, A., Gonçalves, C., Muniategui-Lorenzo, S., & Alpendurada, M. F. (2007). Optimisation and validation of a solid-phase microextraction method for simultaneous determination of different types of pesticides in water by gas chromatography–mass spectrometry. <i>Journal of chromatography A</i> , 1141(2), 165-173.
[ 40 ]	Dasgupta, S., Banerjee, K., Dhumal, K. N., & Adsule, P. G. (2011). Optimization of detection conditions and single-laboratory validation of a multiresidue method for the determination of 135 pesticides and 25 organic pollutants in grapes and wine by gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. <i>Journal of AOAC International</i> , 94(1), 273-285.
[ 41 ]	Knaack, J. S., Zhou, Y., Abney, C. W., Prezioso, S. M., Magnuson, M., Evans, R., ... & Johnson, R. C. (2012). High-throughput immunomagnetic scavenging technique for quantitative analysis of live VX nerve agent in water, hamburger, and soil matrixes. <i>Analytical chemistry</i> , 84(22), 10052-10057.
[ 42 ]	Morlock, G. E. (1996). Analysis of pesticide residues in drinking water by planar chromatography. <i>Journal of Chromatography A</i> , 754(1), 423-430.
[ 43 ]	Wolska, L., Wiergowski, M., Galer, K., Górecki, T., & Namieśnik, J. (1999). Sample preparation for GC analysis of selected pesticides in surface water. <i>Chemosphere</i> , 39(9), 1477-1486.
[ 44 ]	Jinno, K., Muramatsu, T., Saito, Y., Kiso, Y., Magdic, S., & Pawliszyn, J. (1996). Analysis of pesticides in environmental water samples by solid-phase micro-extraction—high-performance liquid chromatography. <i>Journal of chromatography a</i> , 754(1), 137-144.
[ 45 ]	Wang, Z., Zhao, X., Xu, X., Wu, L., Su, R., Zhao, Y., ... & Dong, D. (2013). An absorbing microwave micro-solid-phase extraction device used in non-polar solvent microwave-assisted extraction for the determination of organophosphorus pesticides. <i>Analytica chimica acta</i> , 760, 60-68.
[ 46 ]	Zulin, Z., Huasheng, H., Xinhong, W., Jianqing, L., Weiqi, C., & Li, X. (2002). Determination and load of organophosphorus and organochlorine pesticides at water from Jiulong River Estuary, China. <i>Marine Pollution Bulletin</i> , 45(1), 397-402.

[ 47 ]	Beltran, J., Lopez, F. J., Cepria, O., & Hernandez, F. (1998). Solid-phase microextraction for quantitative analysis of organophosphorus pesticides in environmental water samples. <i>Journal of chromatography a</i> , 808(1), 257-263.
[ 48 ]	Yrieix, C., Gonzalez, C., Deroux, J. M., Lacoste, C., & Leybros, J. (1996). Countercurrent liquid/liquid extraction for analysis of organic water pollutants by GC/MS. <i>Water research</i> , 30(8), 1791-1800.
[ 49 ]	Guo, H. J., Ying, Z. H., Xiang, J. S., Qiang, Z. Z., Ren, C. L., & Yu, O. Q. (1998). Preparation of Chiral Stationary Phases Coated Using Cellulose Derivatives and Study of Chiral Resolution in HPLC [J]. <i>CHEMICAL RESEARCH IN CHINESE UNIVERSITIES</i> , 4.
[ 50 ]	Rodríguez-Cruz, M. S., Sánchez-Martín, M. J., Andrades, M. S., & Sánchez-Camazano, M. (2007). Modification of clay barriers with a cationic surfactant to improve the retention of pesticides in soils. <i>Journal of hazardous materials</i> , 139(2), 363-372.
[ 51 ]	Carabias-Martinez, R., Rodriguez-Gonzalo, E., Paniagua-Marcos, P. H., & Hernández-Méndez, J. (2000). Analysis of pesticide residues in matrices with high lipid contents by membrane separation coupled on-line to a high-performance liquid chromatography system. <i>Journal of Chromatography A</i> , 869(1), 427-439.
[ 52 ]	Lorenzo, R. A., Pais, S., Racamonde, I., García-Rodríguez, D., & Carro, A. M. (2012). Pesticides in seaweed: optimization of pressurized liquid extraction and in-cell clean-up and analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. <i>Analytical and bioanalytical chemistry</i> , 404(1), 173-181.
[ 53 ]	Zambonin, C. G., Quinto, M., De Vietro, N., & Palmisano, F. (2004). Solid-phase microextraction–gas chromatography mass spectrometry: A fast and simple screening method for the assessment of organophosphorus pesticides residues in wine and fruit juices. <i>Food Chemistry</i> , 86(2), 269-274.
[ 54 ]	Viana, E., Redondo, M. J., Font, G., & Molto, J. C. (1996). Disks versus columns in the solid-phase extraction of pesticides from water. <i>Journal of chromatography a</i> , 733(1), 267-274.
[ 55 ]	Zuin, V. G., Yariwake, J. H., & Bicchi, C. (2003). Fast supercritical fluid extraction and high-resolution gas chromatography with electron-capture and flame photometric detection for multiresidue screening of organochlorine and organophosphorus pesticides in Brazil's medicinal plants. <i>Journal of Chromatography A</i> , 985(1), 159-166.
[ 56 ]	Gelsomino, A., Petrovičová, B., Tiburtini, S., Magnani, E., & Felici, M. (1997). Multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables by gel permeation chromatography followed by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection. <i>Journal of chromatography a</i> , 782(1), 105-122.
[ 57 ]	Akoto, O., Andoh, H., Darko, G., Eshun, K., & Osei-Fosu, P. (2013). Health risk assessment of pesticides residue in maize and cowpea from Ejura, Ghana. <i>Chemosphere</i> , 92(1), 67-73.
[ 58 ]	Chamkasem, N., Ollis, L. W., Harmon, T., Lee, S., & Mercer, G. (2013). Analysis of 136 Pesticides in Avocado Using a Modified QuEChERS Method with LC-MS/MS and GC-MS/MS. <i>Journal of agricultural and food chemistry</i> , 61(10), 2315-2329.

[ 59 ]	Camino-Sánchez, F. J., Zafra-Gómez, A., Pérez-Trujillo, J. P., Conde-González, J. E., Marques, J. C., & Vílchez, J. L. (2011). Validation of a GC-MS/MS method for simultaneous determination of 86 persistent organic pollutants in marine sediments by pressurized liquid extraction followed by stir bar sorptive extraction. <i>Chemosphere</i> , 84(7), 869-881.
[ 60 ]	Chen, G., Cao, P., & Liu, R. (2011). A multi-residue method for fast determination of pesticides in tea by ultra performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry combined with modified QuEChERS sample preparation procedure. <i>Food Chemistry</i> , 125(4), 1406-1411.
[ 61 ]	Chai, L. K., Zaidel, N. D., & Hansen, H. C. B. (2012). A rapid multi-residue method for the determination of pesticide residues in choy sum, yardlong beans and aubergines. <i>Food Chemistry</i> , 131(2), 611-616.
[ 62 ]	Sinha, S. N., Rao, M., & Vasudev, K. (2012). Distribution of pesticides in different commonly used vegetables from Hyderabad, India. <i>Food Research International</i> , 45(1), 161-169.
[ 63 ]	Pirsaheb, M., Sharafi, K., & Dargahi, A. (2012). Performance of Granular Activated Carbon to 2, 4-Dichlorophenoxy Acetic Acid Removal from Aqueous Environments. <i>Iranian Journal of Health and Environment</i> , 5(1), 21-28.
[ 64 ]	Pareja, L., Cesio, V., Heinzen, H., & Fernández-Alba, A. R. (2011). Evaluation of various QuEChERS based methods for the analysis of herbicides and other commonly used pesticides in polished rice by LC-MS/MS. <i>Talanta</i> , 83(5), 1613-1622.
[ 65 ]	Cazorla-Reyes, R., Fernández-Moreno, J. L., Romero-González, R., Frenich, A. G., & Vidal, J. L. M. (2011). Single solid phase extraction method for the simultaneous analysis of polar and non-polar pesticides in urine samples by gas chromatography and ultra high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. <i>Talanta</i> , 85(1), 183-196.
[ 66 ]	Cervera, M. I., Portolés, T., Pitarch, E., Beltrán, J., & Hernández, F. (2012). Application of gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for target and non-target analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. <i>Journal of Chromatography A</i> , 1244, 168-177.
[ 67 ]	Jiang, W., Duysen, E. G., & Lockridge, O. (2012). Mice treated with a nontoxic dose of chlorpyrifos oxon have diethoxyphosphotyrosine labeled proteins in blood up to 4 days post exposure, detected by mass spectrometry. <i>Toxicology</i> , 295(1), 15-22.
[ 68 ]	Bruzzoniti, M. C., Sarzanini, C., & Mentasti, E. (2000). Preconcentration of contaminants in water analysis. <i>Journal of Chromatography A</i> , 902(1), 289-309.
[ 69 ]	Lambropoulou, D. A., Konstantinou, I. K., & Albanis, T. A. (2000). Determination of fungicides in natural waters using solid-phase microextraction and gas chromatography coupled with electron-capture and mass spectrometric detection. <i>Journal of Chromatography A</i> , 893(1), 143-156.
[ 70 ]	Beltran, J., Lopez, F. J., & Hernandez, F. (2000). Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis. <i>Journal of Chromatography A</i> , 885(1), 389-404.
[ 71 ]	Poole, C. F. (2007). Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. <i>Journal of Chromatography A</i> , 1158(1), 241-250.

[ 72 ]	Matisova, E., & Dömötöröová, M. (2003). Fast gas chromatography and its use in trace analysis. <i>Journal of Chromatography A</i> , 1000(1), 199-221.
[ 73 ]	Hatrík, Š., & Tekel, J. (1996). Extraction methodology and chromatography for the determination of residual pesticides in water. <i>Journal of chromatography a</i> , 733(1), 217-233.
[ 74 ]	Slobodnik, J., Van Baar, B. L. M., & Brinkman, U. A. (1995). Column liquid chromatography-mass spectrometry: selected techniques in environmental applications for polar pesticides and related compounds. <i>Journal of chromatography A</i> , 703(1), 81-121.
[ 75 ]	Geerdink, R. B., Niessen, W. M. A., & Brinkman, U. A. (2002). Trace-level determination of pesticides in water by means of liquid and gas chromatography. <i>Journal of Chromatography A</i> , 970(1), 65-93.
[ 76 ]	Pareja, L., Fernández-Alba, A. R., Cesio, V., & Heinzen, H. (2011). Analytical methods for pesticide residues in rice. <i>TrAC Trends in Analytical Chemistry</i> , 30(2), 270-291.
[ 77 ]	Hennion, M. C. (1999). Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. <i>Journal of Chromatography A</i> , 856(1), 3-54.
[ 78 ]	Martínez Vidal, J. L., Plaza-Bolanos, P., Romero-González, R., & Garrido Frenich, A. (2009). Determination of pesticide transformation products: a review of extraction and detection methods. <i>Journal of Chromatography A</i> , 1216(40), 6767-6788.
[ 79 ]	Ledoux, D. (2011). <i>Pest control simplified for everyone: Kill, repel, or mitigate pests with or without pesticides</i> . Universal-Publishers.
[ 80 ]	Krause, R. T. (1983). Determination of fluorescent pesticides and metabolites by reversed-phase high-performance liquid chromatography. <i>Journal of Chromatography A</i> , 255, 497-510.
[ 81 ]	Coly, A., & Aaron, J. J. (1994). Fluorimetric determination of aromatic pesticides in technical formulations. Effects of solvent and of ultraviolet photolysis. <i>Talanta</i> , 41(9), 1475-1480.
[ 82 ]	Sánchez, F. G., & Gallardo, A. A. (1992). Spectrofluorimetric determination of the insecticide azinphos-methyl in cultivated soils following generation of a fluorophore by hydrolysis. <i>Analyst</i> , 117(2), 195-198.
[ 83 ]	Díaz, A. N., Sánchez, F. G., & del Río, V. B. (1995). Kinetic enzymatic determination of chlorpyrifos in apples. <i>Analytical letters</i> , 28(6), 1071-1082.
[ 84 ]	Sassolas, A., Blum, L. J., & Leca-Bouvier, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. <i>Biotechnology advances</i> , 30(3), 489-511.
[ 85 ]	Campàs, M., Prieto-Simón, B., & Marty, J. L. (2009, February). A review of the use of genetically engineered enzymes in electrochemical biosensors. In <i>Seminars in cell &amp; developmental biology</i> (Vol. 20, No. 1, pp. 3-9). Academic Press.
[ 86 ]	Wang J, Musameh M. Carbon-nanotubes doped polypyrrole glucose biosensor. <i>Anal Chim Acta</i> 2005;539:209–13.
[ 87 ]	Wang J. Nanomaterial-based amplified transduction of biomolecular interactions. <i>Small</i> 2005a;1:1036–43.2009a;77:1454–9.
[ 88 ]	Luo X, Morrin A, Killard A, Smyth M. Application of nanoparticles in electrochemical sensors and

	biosensors. <i>Electroanal</i> 2006;18:319–26.
[ 89 ]	Pingarron J, Yanez-Sedeno P, Gonzalez-Cortes A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. <i>Electrochim Acta</i> 2008;53:5848–66
[ 90 ]	Liu, D., Chen, W., Wei, J., Li, X., Wang, Z., & Jiang, X. (2012). A highly sensitive, dual-readout assay based on gold nanoparticles for organophosphorus and carbamate pesticides. <i>Analytical chemistry</i> , 84(9), 4185-4191.
[ 91 ]	Krajewska B. Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. <i>Enzyme Microb Technol</i> 2004;35:126–39.
[ 92 ]	Wang G, Xu J-J, Ye L-H, Zhu J-J, Chen H-Y. Highly sensitive sensors based on the immobilization of tyrosinase in chitosan. <i>Bioelectrochemistry</i> 2002;57:33–8.
[ 93 ]	Choi MFM. Progress in enzyme-based biosensors using optical transducers. <i>Microchim Acta</i> 2004a;148:107–32.
[ 94 ]	Singh, B. K., & Walker, A. (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. <i>FEMS microbiology reviews</i> , 30(3), 428-471.
[ 95 ]	Mascini, M., & Palchetti, I. (2014). Biosensors, Electrochemical. <i>Encyclopedia of Applied Electrochemistry</i> , 136-140.
[ 96 ]	La Rosa, C., Pariente, F., Hernandez, L., & Lorenzo, E. (1994). Determination of organophosphorus and carbamic pesticides with an acetylcholinesterase amperometric biosensor using 4-aminophenyl acetate as substrate. <i>Analytica chimica acta</i> , 295(3), 273-282.
[ 97 ]	Martorell, D., Céspedes, F., Martínez-Fabregas, E., & Alegret, S. (1994). Amperometric determination of pesticides using a biosensor based on a polishable graphite-epoxy biocomposite. <i>Analytica chimica acta</i> , 290(3), 343-348.
[ 98 ]	Mionetto, N., Marty, J. L., & Karube, I. (1994). Acetylcholinesterase in organic solvents for the detection of pesticides: biosensor application. <i>Biosensors and Bioelectronics</i> , 9(6), 463-470.
[ 99 ]	Trojanowicz, M., & Hitchman, M. L. (1996). Determination of pesticides using electrochemical biosensors. <i>TrAC Trends in Analytical Chemistry</i> , 15(1), 38-45.
[ 100 ]	Kumaran, S., & Morita, M. (1995). Application of a cholinesterase biosensor to screen for organophosphorus pesticides extracted from soil. <i>Talanta</i> , 42(4), 649-655.
[ 101 ]	Dzyadevich, S. V., Soldatkin, A. P., Shul'ga, A. A., Strikha, V. I., & El'Skaya, A. V. (1994). Conductometric biosensor for determination of organophosphorus pesticides. <i>Journal of analytical chemistry</i> , 49(8), 789-792.
[ 102 ]	Ghindilis, A.; Morzunova, H.; Barmin, A. & Kurochkin, I. (1996). Potentiometric biosensors for cholinesterase inhibitor analysis based on mediatorless bioelectrocatalysis. <i>Biosens. Bioelectr.</i> , 11, 9, 873-880, ISSN: 0956-5663
[ 103 ]	Marty, J. L., Mionetto, N., Lacorte, S., & Barceló, D. (1995). Validation of an enzymatic biosensor with various liquid chromatographic techniques for determining organophosphorus pesticides and carbaryl in freeze-dried waters. <i>Analytica chimica acta</i> , 311(3), 265-271.

[104]	Evtugyn, G.; Budnikov, H.; Galyametdinov, Yu. & Suntsov E. (1996). Amperometric determination of thiocholine esters in the presence of butyrylcholinesterase. <i>Zh. Anal. Khim.</i> , 51, 4, 391-393, ISSN: 0044-4502
[105]	Hart, J. & Hartley, I. (1994). Voltammetric and amperometric studies of thiocholine at a screen-printed carbon electrode chemically modified with cobalt phthalocyanine: studies towards a pesticide sensor. <i>Analyst</i> , 119, 2, 259-265, ISSN: 0003-2654
[106]	Ricci, F.; Arduini, F.; Amine, A.; Moscone, D. & Paleschi, G. (2004). Characterisation of Prussian blue modified screen-printed electrodes for thiol detection. <i>J. Electroanal. Chem.</i> , 563, 2, (March, 2004) 229-237, ISSN: 0022-0728
[107]	Kulys, J. & D'Costa, E. J. (1991). Printed amperometric sensor based on TCNQ and cholinesterase. <i>Biosens. Bioelectron.</i> , 6, 2, 109-115, ISSN: 0956-5663
[108]	Martorell, D., Céspedes, F., Martínez-Fàbregas, E., & Alegret, S. (1997). Determination of organophosphorus and carbamate pesticides using a biosensor based on a polishable, 7, 7, 8, 8-tetracyanoquino-dimethane-modified, graphite—epoxy biocomposite. <i>Analytica Chimica Acta</i> , 337(3), 305-313.
[109]	Ovalle, M., Stoytcheva, M., Zlatev, R., & Valdez, B. (2009). Electrochemical study of rat brain acetylcholinesterase inhibition by chlorofos: Kinetic aspects and analytical applications. <i>Electrochimica acta</i> , 55(2), 516-520.
[110]	Kulys, J. (1989). Amperometric enzyme electrodes in analytical chemistry, <i>Frez. J. Anal. Chem.</i> , 335, 1, (January 1989) 86-91, ISSN: 0937-0633; EISSN: 1432-1130
[111]	Cheng, T. C., & DeFrank, J. J. (2000). <i>U.S. Patent No. 6,080,566</i> . Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
[112]	Coleman, R. J. (1994). <i>Hazardous materials dictionary</i> . CRC Press.
[113]	Danzer, T. & Schwedt, G. (1996). Chemometric methods for the development of a biosensor system and the evaluation of inhibition studies with solutions and mixtures of pesticides and heavy metals. Part I. Development of an enzyme electrodes system for pesticides and heavy metal screening using selected chemometric methods. <i>Anal. Chim. Acta</i> , 318, 3, (January, 1996) 275-286, ISSN: 0003-2670
[114]	Mazzei, F.; Botré, F. & Botré, C. (1996). Acid phosphatase/glucose oxidase-based biosensors for the determination of pesticides. <i>Anal. Chim. Acta</i> , 336, 1-3, (December, 1996) 67-75, ISSN: 0003-2670
[115]	Gunaratna, C. & Wilson, G. (1990). Optimization of multienzyme flow reactors for determination of acetylcholine, <i>Anal. Chem.</i> , 62, 4, (February, 1990) 402-407, ISSN: 0003-2700, EISSN: 1520-6882
[116]	Anzai, J. (2006). Use of biosensors for detecting organophosphorus agents. <i>Yakugaku Zasshi</i> , 126, 12, (December, 2006) 1301-1308, ISSN: 0031-6903, EISSN: 1347-5231
[117]	Chough, S. H.; Mulchandani, A.; Mulchandani, P.; Chen, W.; Wang, J. & Rogers, K. R. (2002). Organophosphorus hydrolase-based amperometric sensor: modulation of sensitivity and substrate selectivity. <i>Electroanalysis</i> , 14, 4, (February, 2002) 273-276, ISSN: 1040-0397, EISSN: 1521-

	4109
[118]	Lei, C., Valenta, M., Sapiralli, K. P. & Ackerman, E. J. (2007). Biosensing paraoxon in simulated environmental samples by immobilized organophosphorus hydrolase in functionalized mesoporous silica. <i>J. Environ. Qual.</i> , 36, 1, (January-February, 2007) 233-238, ISSN: 0047-2425, EISSN: 1537-2537
[119]	Mulchandani, A.; Chen, W.; Mulchandani, P.; Wang, J. & Rogers, K. R. (2001a). Biosensors for direct determination of organophosphate pesticides. <i>Biosens. Bioelectron.</i> , 16, 4-5, (June, 2001) 225-230, ISSN: 0956-5663
[120]	Mulchandani, P.; Chen, W. & Mulchandani, A. (2001b). Flow injection amperometric enzyme biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents. <i>Environ. Sci. Technol.</i> , 35, 12, (June, 2001) 2562-2565, ISSN: 0013-936X, EISSN: 1520-5851
[121]	Prieto-Simón, B.; Campàs, M.; Andreescu, S. & Marty, J.-L. (2006). Trends in flow-based biosensing systems for pesticide assessment. <i>Sensors</i> , 6, 10, (October, 2006) 1161-1186, ISSN: 1424-8220
[122]	Rodríguez-Mozaz, S.; Marco, M.-P.; Lopez de Alda M. J. & Barceló, D. (2004). Biosensors for environmental applications: future development trends. <i>Pure Appl. Chem.</i> , 76, 4, 723-752, ISSN: 0033-4545, EISSN: 1365-3075
[123]	Wang, J.; Krause, R.; Block, K.; Musameh, M.; Mulchandani, A. & Schöning, M. J. (2003). Flow injection amperometric detection of OP nerve agents based on an organophosphorus-hydrolase biosensor detector. <i>Biosens. Bioelectron.</i> , 18, 2-3, (March, 2003) 255-260, ISSN: 0956-5663
[124]	Dumas, D. P.; Durst, H. D.; Landis, W. G.; Raushel, F. M. & Wild, J. R. (1990). Inactivation of organophosphorus nerve agents by the phosphotriesterase from <i>Pseudomonas diminuta</i> . <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 227, 1, (February, 1990) 155-159, ISSN: 0003-9861
[125]	Munnecke, D. M. (1980). Enzymatic detoxification of waste organophosphate pesticides. <i>J. Agric. Food Chem.</i> , 28, 1, (January, 1980) 105-111, ISSN: 0021-8561, EISSN: 1520-5118
[126]	Sacks, V.; Eshkenazi, I.; Neufeld, T.; Dosoretz, C. & Rishpon, J. (2000). Immobilized parathion hydrolase: An amperometric sensor for parathion. <i>Anal. Chem.</i> , 72, 9, (May, 2000) 2055-2058, ISSN: 0003-2700, EISSN: 1520-6882
[127]	Mulchandani, P.; Chen, W. & Mulchandani, A. (2006). Microbial biosensor for direct determination of nitrophenyl-substituted organophosphate nerve agents using genetically engineered <i>Moraxella</i> sp. <i>Anal. Chim. Acta</i> , 568, 1-2, (May, 2006) 217-221, ISSN: 0003-2670
[128]	Mulbry, W. W., & Karns, J. S. (1989). Purification and characterization of three parathion hydrolases from gram-negative bacterial strains. <i>Applied and environmental microbiology</i> , 55(2), 289-293.
[129]	Serdar, C. M., & Murdock, D. C. (1989). Plasmid encoded parathion hydrolase activity. <i>Enzymes hydrolysing organophosphorus compounds</i> , 143.

[130]	Dumas, D. P., Caldwell, S. R., Wild, J. R., & Raushel, F. M. (1989). Purification and properties of the phosphotriesterase from <i>Pseudomonas diminuta</i> . <i>Journal of Biological Chemistry</i> , 264(33), 19659-19665.
[131]	Kwon, D. H., Clark, J. M., & Lee, S. H. (2010). Extensive gene duplication of acetylcholinesterase associated with organophosphate resistance in the two-spotted spider mite. <i>Insect molecular biology</i> , 19(2), 195-204.
[132]	Schofield, D. A., & DiNovo, A. A. (2010). Generation of a mutagenized organophosphorus hydrolase for the biodegradation of the organophosphate pesticides malathion and demeton-S. <i>Journal of applied microbiology</i> , 109(2), 548-557.
[133]	Chu, X. Y., Wu, N. F., Deng, M. J., Tian, J., Yao, B., & Fan, Y. L. (2006). Expression of organophosphorus hydrolase OPHC2 in <i>Pichia pastoris</i> : Purification and characterization. <i>Protein expression and purification</i> , 49(1), 9-14.
[134]	Theriot, C. M., & Grunden, A. M. (2011). Hydrolysis of organophosphorus compounds by microbial enzymes. <i>Applied microbiology and biotechnology</i> , 89(1), 35-43.
[135]	Kolakowski, J. E., Defrank, J. J., Harvey, S. P., Szafraniec, L. L., Beaudry, W. T., Lai, K., & Wild, J. R. (1997). Enzymatic hydrolysis of the chemical warfare agent VX and its neurotoxic analogues by organophosphorus hydrolase. <i>Biocatalysis and Biotransformation</i> , 15(4), 297-312.
[136]	Brandeis, R., Raveh, L., Grunwald, J., Cohen, E., & Ashani, Y. (1993). Prevention of soman-induced cognitive deficits by pretreatment with human butyrylcholinesterase in rats. <i>Pharmacology Biochemistry and Behavior</i> , 46(4), 889-896.
[137]	V. A. Pedrosa, S. Paliwal, S. Balasubramanian, D. Nepal, V. Davis, J. Wild, E. Ramanculov and A. Simonian, "Enhanced Stability of Enzyme Organophosphate Hydrolase Interfaced on the Carbon Nanotubes," <i>Colloids and Surfaces B Biointerfaces</i> , Vol. 77, No. 1, 2010, pp. 69-74.
[138]	J. H. Lee, J. Y. Park, K. Min, H. J. Cha, S. S. Choi and Y. J. Yoo, "A Novel Organophosphorus Hydrolase-Based Biosensor Using Mesoporous Carbons and Carbon Black for The Detection Of Organophosphate Nerve Agents," <i>Biosensors and Bioelectronics</i> , Vol. 25, No. 7, 2010, pp. 1566-1570.
[139]	R. P. Deo, J. Wang, I. Block, A. Mulchandani, K. A. Joshi, M. Trojanowicz, F. Scholz, W. Chen and Y. H. Lin, "Determination of Organophosphate Pesticides at a Carbon Nanotube/Organophosphorus Hydrolase Electrochemical Biosensor," <i>Analytica Chimica Acta</i> , Vol. 530, No. 2, 2005, pp. 185-189.
[140]	T. Laothanachareon, V. Champreda, P. Sritongkham, M. Somasundrum and W. Surareungchai, "Cross-Linked Enzyme Crystals of Organophosphate Hydrolase for Electrochemical Detection of Organophosphorus Compounds," <i>World Journal of Microbiology and Biotechnology</i> , Vol. 24, No. 12, 2008, pp. 3049-3055.
[141]	V. Sacks, I. Eshkenazi, T. Neufeld, C. Dosoretz and J. Rishpon, "Immobilized Parathion Hydrolase: An Amperometric Sensor for Parathion," <i>Analytical Chemistry</i> , Vol. 72, No. 9, 2000, pp. 2055-2058.

[142]	D. Du, W. Chen, W. Zhang, D. Liu, H. Li and Y. Lin, "Covalent Coupling of Organophosphorus Hydrolase Loaded Quantum Dots to Carbon Nanotube. Au Nano- composite for Enhanced Detection of Methyl Parathion," <i>Biosensors and Bioelectronics</i> , Vol. 25, No. 6, 2010, pp. 1370-1375
[143]	S. H. Chough, A. Mulchandani, P. mulchandani, W. Chen, J. Wang and K. R. Rogers, "Organophosphorus Hy-drolase-Based Amperometric Sensor: Modulation of Sen-sitivity and Substrate Selectivity," <i>Electroanalysis</i> , Vol. 14, No. 4, pp. 273-276.
[144]	Serdar, C. M., Gibson, D. T., Munnecke, D. M., & Lancaster, J. H. (1982). Plasmid involvement in parathion hydrolysis by <i>Pseudomonas diminuta</i> . <i>Applied and environmental microbiology</i> , 44(1), 246-249.
[145]	Karns, J. S., Muldoon, M. T., Mulbry, W. W., Derbyshire, M. K., & Kearney, P. C. (1987). Use of microorganisms and microbial systems in the degradation of pesticides. In ACS symposium series (No. 334, pp. 156-170). Oxford University Press.
[146]	McDANIEL, C. S., Harper, L. L., & Wild, J. R. (1988). Cloning and sequencing of a plasmid-borne gene (opd) encoding a phosphotriesterase. <i>Journal of bacteriology</i> , 170(5), 2306-2311.
[147]	Tang, X., Liang, B., Yi, T., Manco, G., & Liu, A. (2014). Cell surface display of organophosphorus hydrolase for sensitive spectrophotometric detection of <i>p</i> -nitrophenol substituted organophosphates. <i>Enzyme and microbial technology</i> , 55, 107-112.
[148]	Richins, R. D., Kaneva, I., Mulchandani, A., & Chen, W. (1997). Biodegradation of organophosphorus pesticides by surface-expressed organophosphorus hydrolase. <i>Nature biotechnology</i> , 15(10), 984-987.
[149]	Shimazu, M., Mulchandani, A., & Chen, W. (2001). Cell surface display of organophosphorus hydrolase using ice nucleation protein. <i>Biotechnology progress</i> , 17(1), 76-80.
[150]	Srinivasan, S., Barnard, G. C., & Gerngross, T. U. (2003). Production of recombinant proteins using multiple-copy gene integration in high-cell-density fermentations of <i>Ralstonia eutropha</i> . <i>Biotechnology and bioengineering</i> , 84(1), 114-120.
[151]	Wu, N., Deng, M., Shi, X., Liang, G., Yao, B., & Fan, Y. (2004). Isolation, purification and characterization of a new organophosphorus hydrolase OPHC2. <i>Chinese Science Bulletin</i> , 49(3), 268-272.
[152]	Chu, X. Y., Wu, N. F., Deng, M. J., Tian, J., Yao, B., & Fan, Y. L. (2006). Expression of organophosphorus hydrolase OPHC2 in <i>Pichia pastoris</i> : Purification and characterization. <i>Protein expression and purification</i> , 49(1), 9-14.
[153]	Hawwa, R., Larsen, S. D., Ratia, K., & Mesecar, A. D. (2009). Structure-Based and Random Mutagenesis Approaches Increase the Organophosphate-Degrading Activity of a Phosphotriesterase Homologue from <i>Deinococcus radiodurans</i> . <i>Journal of molecular biology</i> , 393(1), 36-57.
[154]	Yang, J., Yang, C., Jiang, H., & Qiao, C. (2008). Overexpression of methyl parathion hydrolase and its application in detoxification of organophosphates. <i>Biodegradation</i> , 19(6), 831-839.
[155]	Yu, H., Yan, X., Shen, W., Hong, Q., Zhang, J., Shen, Y., & Li, S. (2009). Expression of methyl

	parathion hydrolase in <i>Pichia pastoris</i> . <i>Current microbiology</i> , 59(6), 573-578.
[156]	Xia, Y., Ji, S., Park, J. S., Park, I., Khoi, P. N., Lee, J., & Jung, Y. D. (2013). Inactivation and conformational changes in methyl parathion hydrolase in 2, 2, 2-trifluoroethanol solutions: Inactivation kinetics and molecular dynamics simulation. <i>Process Biochemistry</i> , 48(4), 625-632.
[157]	D'souza, S. F. (2001). Microbial biosensors. <i>Biosensors and Bioelectronics</i> , 16(6), 337-353.
[158]	Mulchandani, A., Mulchandani, P., Kaneva, I., & Chen, W. (1998). Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents using recombinant <i>Escherichia coli</i> with surface-expressed organophosphorus hydrolase. 1. Potentiometric microbial electrode. <i>Analytical chemistry</i> , 70(19), 4140-4145.
[159]	Mulchandani, A., Chen, W., Mulchandani, P., Wang, J., & Rogers, K. R. (2001). Biosensors for direct determination of organophosphate pesticides. <i>Biosensors and bioelectronics</i> , 16(4), 225-230.
[160]	Shimazu, M., Nguyen, A., Mulchandani, A., & Chen, W. (2003). Cell Surface Display of Organophosphorus Hydrolase in <i>Pseudomonasputida</i> Using an Ice-Nucleation Protein Anchor. <i>Biotechnology progress</i> , 19(5), 1612-1614.
[161]	Mulchandani, P., Hangarter, C. M., Lei, Y., Chen, W., & Mulchandani, A. (2005). Amperometric microbial biosensor for <i>p</i> -nitrophenol using <i>Moraxella</i> sp.-modified carbon paste electrode. <i>Biosensors and Bioelectronics</i> , 21(3), 523-527.
[162]	Lei, Y., Chen, W., & Mulchandani, A. (2006). Microbial biosensors. <i>Analytica Chimica Acta</i> , 568(1), 200-210.
[163]	Lei, Y., Mulchandani, P., Chen, W., Wang, J., & Mulchandani, A. (2004). Whole cell-enzyme hybrid amperometric biosensor for direct determination of organophosphorous nerve agents with <i>p</i> -nitrophenyl substituent. <i>Biotechnology and bioengineering</i> , 85(7), 706-713.
[164]	Stoytcheva, M., Zlatev, R., Velkova, Z., Valdez, B., Ovalle, M., & Petkov, L. (2009). Hybrid electrochemical biosensor for organophosphorus pesticides quantification. <i>Electrochimica Acta</i> , 54(6), 1721-1727.
[165]	Kroto, H. W., Heath, J. R., O'Brien, S. C., Curl, R. F., & Smalley, R. E. (1985). C <sub>60</sub> : buckminsterfullerene. <i>Nature</i> , 318(6042), 162-163.
[166]	Dorset, D. L., & Fryer, J. R. (2001). Quantitative electron crystallographic determinations of higher fullerenes in the hexagonal close packed polymorph. <i>The Journal of Physical Chemistry B</i> , 105(12), 2356-2359.
[167]	Nisha, A., Rajeswari, M. K., & Dhamodharan, R. (2000). Intercalative redox polymerization and characterization of poly (n-vinyl-2-pyrrolidinone) in the gallery of vermiculite: A novel inorganic-organic hybrid material. <i>Journal of Applied Polymer Science</i> , 76(12), 1825-1830.
[168]	Ravelo-Pérez, L. M., Hernández-Borges, J., & Rodríguez-Delgado, M. Á. (2008). Multi-walled carbon nanotubes as efficient solid-phase extraction materials of organophosphorus pesticides from apple, grape, orange and pineapple fruit juices. <i>Journal of Chromatography A</i> , 1211(1), 33-42.

[169]	Du, X., Skachko, I., Barker, A., & Andrei, E. Y. (2008). Approaching ballistic transport in suspended graphene. <i>Nature nanotechnology</i> , 3(8), 491-495.
[170]	Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D. Y., Brunet, L., Liga, M. V., Li, D., & Alvarez, P. J. (2008). Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. <i>Water research</i> , 42(18), 4591-4602.
[171]	Asensio-Ramos, M., Hernández-Borges, J., Borges-Miquel, T. M., & Rodríguez-Delgado, M. A. (2009). Evaluation of multi-walled carbon nanotubes as solid-phase extraction adsorbents of pesticides from agricultural, ornamental and forestal soils. <i>Analytica chimica acta</i> , 647(2), 167-176.
[172]	López-Feria, S., Cárdenas, S., & Valcárcel, M. (2009). One step carbon nanotubes-based solid-phase extraction for the gas chromatographic-mass spectrometric multiclass pesticide control in virgin olive oils. <i>Journal of Chromatography A</i> , 1216(43), 7346-7350.
[173]	Liu, G., Wu, H., Dohnalkova, A., & Lin, Y. (2007). Apoferritin-templated synthesis of encoded metallic phosphate nanoparticle tags. <i>Analytical chemistry</i> , 79(15), 5614-5619.
[174]	Wang, X., Ding, B., Yu, J., & Wang, M. (2011). Engineering biomimetic superhydrophobic surfaces of electrospun nanomaterials. <i>Nano today</i> , 6(5), 510-530.
[175]	Xu, Z. L., Sun, W. J., Yang, J. Y., Jiang, Y. M., Campbell, K., Shen, Y. D., ... & Sun, Y. M. (2012). Development of a solid-phase extraction coupling chemiluminescent enzyme immunoassay for determination of organophosphorus pesticides in environmental water samples. <i>Journal of agricultural and food chemistry</i> , 60(9), 2069-2075.
[176]	Chudasama, K. S., & Thaker, V. S. (2012). Screening of potential antimicrobial compounds against <i>Xanthomonas campestris</i> from 100 essential oils of aromatic plants used in India: an ecofriendly approach. <i>Archives of Phytopathology and Plant Protection</i> , 45(7), 783-795.
[177]	Khaydarov, R., Khaydarov, R., Gapurova, O., & Estrin, Y. (2010). A novel method of continuous fabrication of aqueous dispersions of silver nanoparticles. <i>International Journal of Nanoparticles</i> , 3(1), 77-91.
[178]	Canizares, P., Sáez, C., Lobato, J., & Rodrigo, M. A. (2004). Electrochemical treatment of 4-nitrophenol-containing aqueous wastes using boron-doped diamond anodes. <i>Industrial &amp; engineering chemistry research</i> , 43(9), 1944-1951.
[179]	Fan, S., Xiao, F., Liu, L., Zhao, F., & Zeng, B. (2008). Sensitive voltammetric response of methylparathion on single-walled carbon nanotube paste coated electrodes using ionic liquid as binder. <i>Sensors and Actuators B: Chemical</i> , 132(1), 34-39.
[180]	Pontié, M., Sikpo, L., Thouand, G., Lahan, R., Tapsoba, I., Mallet, R., & Feng, T. (2011). Direct Electroanalysis of p-Nitrophenol (PNP) in Estuarine and Surface Waters by a High Sensitive Type C/p-NiTSPc Coating Carbon Fiber Microelectrode (CFME). <i>Electroanalysis</i> , 23(2), 433-441.
[181]	Fujishima, A., Terashima, C., Honda, K., Sarada, B. V., & Rao, T. N. (2002). Recent progress in electro-analytical applications of diamond electrodes. <i>New Diamond and Frontier Carbon Technology</i> , 12(2), 73-81.

[182]	Muzzarelli, R., Baldassarre, V., Conti, F., Ferrara, P., Biagini, G., Gazzanelli, G., & Vasi, V. (1988). Biological activity of chitosan: ultrastructural study. <i>Biomaterials</i> , 9(3), 247-252.
[183]	Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., ... & Heras, Á. (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. <i>Current Chemical Biology</i> , 3(2), 203-230.
[184]	Chávez, E. L., Oviedo-Roa, R., Contreras-Pérez, G., Martínez-Magadán, J. M., & Castillo-Alvarado, F. L. (2010). Theoretical studies of ionic conductivity of crosslinked chitosan membranes. <i>International Journal of Hydrogen Energy</i> , 35(21), 12141-12146.
[185]	Secretaría de Salud, NOM-127-SSA1-1994. 1994.
[186]	Liu, Z., Yang, C., Jiang, H., Mulchandani, A., Chen, W., & Qiao, C. (2009). Simultaneous degradation of organophosphates and 4-substituted phenols by <i>Stenotrophomonas</i> species LZ-1 with surface-displayed organophosphorus hydrolase. <i>Journal of agricultural and food chemistry</i> , 57(14), 6171-6177.
[187]	Li, Y., Aubert, S. D., & Raushel, F. M. (2003). Operational control of stereoselectivity during the enzymatic hydrolysis of racemic organophosphorus compounds. <i>Journal of the American Chemical Society</i> , 125(25), 7526-7527.
[188]	Briseno-Roa, L., Hill, J., Notman, S., Sellers, D., Smith, A. P., Timperley, C. M., ... & Griffiths, A. D. (2006). Analogues with fluorescent leaving groups for screening and selection of enzymes that efficiently hydrolyze organophosphorus nerve agents. <i>Journal of medicinal chemistry</i> , 49(1), 246-255.
[189]	Larson, S. J., Capel, P. D., & Majewski, M. S. (1997). Pesticides in surface water. <i>Ann Arbor Press: Chelsea, MI</i> .
[190]	Majewski, M. S., & Capel, P. D. (1995). Pesticides in the atmosphere. Chelsea, Michigan. <i>Ann Arbor Press, Inc.</i>
[191]	Fukuto, R. (1990). Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. <i>Environmental Health Perspectives</i> , 87, (July 1990) 245-254, ISSN: 00916765, EISSN 15529924
[192]	Pandolfo, A. G., & Hollenkamp, A. F. (2006). Carbon properties and their role in supercapacitors. <i>Journal of power sources</i> , 157(1), 11-27.
[193]	McCreery, R. L. (2008). Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry. <i>Chem. Rev.</i> , 108(7), 2646-2687.
[194]	Fujishima, A., Rao, T. N., & Tryk, D. A. (2000). Titanium dioxide photocatalysis. <i>Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews</i> , 1(1), 1-21.
[195]	Edmundson, R. S. (1988). <i>Dictionary of Organophosphorus Compounds</i> Chapman and Hall.
[196]	Hayes, W. J., & Laws, E. R. (1991). Handbook of pesticide toxicology. In <i>Handbook of pesticide toxicology</i> . Academic Press.
[197]	Worthing, C. R., & Hance, R. J. (1991). In <i>The pesticide manual—A world compendium</i> . 1991. <i>The British Crop Protection Council: Surrey, England</i> .
[198]	Quin, L. D. (2000). <i>A guide to organophosphorus chemistry</i> . John Wiley & Sons.

## ANEXOS

### ANEXO I. Listado pesticidas permitidos en México. [22]

Pesticida	DL50 Oral (mg/kg)	DL50 Dérmica (mg/kg) [r-rata, c-conejo]	IDA (mg/kg)	LMR (ppm)	IS (Días)	Uso	Autorizado en Codex
Acefate	1000	>10000 c	0.03	.5-10	7-21	Insecticida	No
Azantefos	1180	1600	0.01	*	*	Insecticida , acaricida	No
Azinfos metil	4	88 c	0.005	.3-5	1-60	Insecticida	Si
Butifos	150	97 c	0.004	*	*	Defoliante	No
Cadusafos	30	24 r	0.0003	*	*	Insecticida	Si
Clorfenvinfos	10	30 r	0.0005	*	*	Insecticida	No
Clorpirifos	96	>2000 r	0.01	.05-3	7-60	Insecticida	Si
Clorpirifos metil	>3000	>3700 r	0.01	6-10	*	Insecticida	Si
Coumafos	37	>2400	*	*	*	insecticida , acaricida	No
Diazinon	1250	>2020	0.002	.2-1	1-28	insecticida , acaricida	Si
Diclorvos	50	300 r	0.004	.05-1	*	Insecticida	Si
Dimetoato	235	>400 r	0.002	.1-2	1-60	Insecticida	Si
Disulfoton N. R.	2	3.6 c	0.0003	*	*	insecticida , acaricida	Si
Edifenfos	100	615 r	0.003	*	*	Defoliante	Si
Etion	21	838 c	0.002	.1-2	1-50	Insecticida	Si
Etoprofos	33	226 r	0.0003	*	*	Insecticida , Nematocida	Si
Fenamifos	8	178 c	*	*	*	Nematocida	Si
Fenitrotión	250	500 r	0.005	1-10	Sin Límite	Insecticida	Si
Fention	88	300 r	0.007	.1-5	14-30	Insecticida	Si
Fentoato	440	2100 c	0.003	*	*	Insecticida	Si
Fonofos	8	25 c	0.03	.1-.5	*	Insecticida	No
Forato	2	9.3 r	0.0005	.0.5-5	28-90	Insecticida	Si
Fosetil-al	5000	>2000	3	.1-20	Sin Límite	Fungicida	No
Fosfamidon	17	267 c	0.0005	.1-1	3-60	Insecticida	No
Fósforo de Al.	0.3	*	*	*	*	Fumigante	No
Fósforo de Mg.	0.3	*	*	0.1	*	Fumigante	No
Fosmet	113	>500 c	0.02	.1-40	7	Acaricida	Si
Foxim	>2000	>5000 r	0.001	.05	*	Insecticida	No
Glifosato	>5000	>5000	0.3	.2-200	*	Herbicida	Si

ANEXO I. (Cont.)

Pesticida	D <sub>L50</sub> Oral (mg/kg)	D <sub>L50</sub> Dérmica (mg/kg) [r-rata, c-conejo]	IDA (mg/kg)	LMR (ppm)	IS (Días)	Uso	Autorizado en Codex
Glufosinato de amonio	1620	4000	0.02	.05-2	*	Herbicida	Si
Isazofos	40	118 r	*	*	*	Insecticida, Nematocida	No
Isofenfos	1620	4000 r	0.02	.05-2	*	Insecticida	No
Malatión	5500	>2000	0.02	.2-135	Sin Límite	Insecticida	Si
Merfos	910	>4600 c	0.1	*	*	Defoliante	Si
Metamidofos	21	118 c	0.004	.05-2	7-50	Insecticida, acaricida	Si
Metidation	25	1546 r	0.001	.005-12	*	Insecticida, acaricida	Si
Mevinfos	3	4.2 r	0.0008	.2-1	1-20	Insecticida, acaricida	No
Monocrotofos	8	270 c	0.0006	.02-1	5-30	Insecticida, acaricida	No
Naled	91	360 c	.5-10	1-15	*	Insecticida	No
Ometoato	25	200 r	0.002	.05-2	7-60	Insecticida, acaricida	Si
Oxidemeton metil	50	844 c	0.0003	*	*	Insecticida, acaricida	Si
Paratión metil	6	67 r	0.0003	.1-1	Sin Límite	Insecticida	Si
Piperfos	65	>2150 r	0.0004	*	*	Herbicida	No
Pirazofos	151	2000 r	0.004	*	*	Fungicida	No
Pirimifos metil	2400	3500 c	0.03	1-10	Sin Límite	Insecticida	Si
Profenfos	358	277 r	0.01	*	*	Insecticida	Si
Quinalfos	71	>1750 r	*	*	*	Insecticida	No
Sulprofos	65	>1100 c	0.025	*	*	Insecticida	No
Tebupirimfos	1.8	9.4 c	*	*	*	Insecticida	No
Temefos	4204	2000 c	*	*	*	Insecticida, larvacida	No
Terbufos	1.3	.81 c	0.0002	*	*	Insecticida	Si
Tetraclorvinfos	>2000	>2500	0.04	*	*	Insecticida	No
Tolclofos metil	5000	>5000 r	0.07	.1	30	Fungicida	No
Triazofos	57	1100 r	0.001	*	*	Insecticida	Si
Triclorfon	250	>2500 c	0.01	.1-60	7-21	Insecticida, acaricida	No
Trimesium	750	>2000	0.3	.05-.1	*	Herbicida	No
Vamidotion	64	1160 c	0.008	*	1-60	Insecticida	No



## DEFENZ™ 130BG

### Taking on a Hazardous World

Every day, emergency response units take on a hazardous world. DEFENZ decontamination products provide rapid, effective, and safe decontamination of chemical warfare agents or other hazardous materials caused by terrorism, pesticide spills, and industrial accidents.

DEFENZ 130BG is a granulated enzymatic decontamination solution highly specific to VX, Russian-VX, and other organophosphate materials. Developed and tested by the US Army Edgewood Chemical Biological Center (ECBC), DEFENZ 130BG is environmentally safe, reliable, and effectively decontaminates many times its weight, making it the perfect choice over traditional chemical approaches.

DEFENZ 130BG contains both an industrial-grade enzyme and a buffering mixture in one small, convenient package. Simply add to your water supply enroute to the scene to neutralize your hazardous threat.

DEFENZ 130BG enjoys a host of logistical and environmental advantages over traditional decontamination approaches, including improved performance, on-site activity, reduced costs, smaller packaging, and the elimination of transport issues involved with residuals post neutralization of selected assembled chemical weapons.

**DEFENZ™** decon enzymes  
*The safest way to handle the toughest threat.*

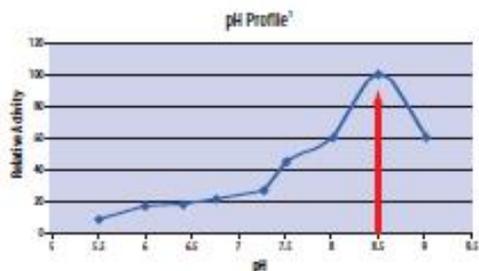
#### DEFENZ 130BG Feature Highlights

- Highly specific to VX, Russian-VX, and other organophosphate materials
- Non-toxic, non-corrosive, and environmentally friendly
- Easy to use – just add to water/foam supply enroute to the scene
- Detoxifies many times its weight, greatly reducing logistical burden
- Compatible with the most widely used fire foams available
- Water soluble, activating in the available water supply – hard, soft, or salt



## Typical Characteristics

<b>Activity:</b>	2% enzyme protein (wt/wt)
<b>Appearance:</b>	Light tan to off-white color; low dust granule
<b>Dissolution:</b>	100 g will dissolve in 1 L of room-temperature water within 3 minutes
<b>pH:</b>	7.8 - 8.8
<b>Temperature:</b>	10 - 40°C (50 - 104°F)
<b>Stability:</b>	12 months @ < 25°C (77°F)



## Activity

DEFENZ™ 130BG has demonstrated activity against synthetic substances that mimic the breakdown of VX, Russian-VX, and other organophosphate materials. It is estimated that 1 g of enzyme will decompose 1.7 kg of VX within 15 minutes of contact (see Table).<sup>1,2</sup> The enzyme will function best at its optimum pH of 8.5; thus, any formulation work should involve buffering the enzyme to this level.

Grams of Agent Hydrolyzed/10 min/Gram Enzyme <sup>1,2</sup>						
Enzyme	VX	Russian-VX	DFP	GB	GD	Paraoxon
DEFENZ 130BG	1.5	5.7	4,120	1,650	27	13,750

1. DeFrank, Landis, 1997.
2. Lal, et al. *J. Biol. Chem.* 1994;269:16759-16764.
3. Gritsenko, Kostog, et al. In: Siktar SK, Imno RI, eds. *Bio-degradation Technologies*, Vol. 2. Technomic Publ Co, Inc; 1998.

## Technical Service

Genencor International works with customers to enhance processes and solve problems. Please contact us for assistance.

### For more information:

#### USA & Canada

200 Meridian Centre Blvd.  
Rochester, NY 14618  
Phone: +1-800-847-5311  
Phone: +1-585-256-5200  
Fax: +1-585-256-5286

#### Europe, Africa, & Middle East

P.O. Box 218  
2300 AE Leiden  
The Netherlands  
Phone: +31-71-5686-168  
Fax: +31-71-5686-169

#### Latin America

Carlos Pellegrini  
1149 Pso 13  
(1009) Buenos Aires, Argentina  
Phone: +54-11-4129-2300  
Fax: +54-11-4326-4411

#### Asia Pacific

205-02 Winsland House  
3 Killiney Road  
Singapore 239519  
Phone: +65-6-838-7410  
Fax: +65-6-737-1218



© 2005 Genencor International, Inc.

Genencor®, Genencor International®, and Invenzo® are registered trademarks, and DEFENZ™ is a trademark of Genencor International, Inc. or its affiliates in the United States and/or other countries. USE AND/OR SALE OF THIS PRODUCT MAY BE COVERED BY ONE OR MORE OF US PATENTS NOS. 5,938,927; 6,388,546; 6,403,742; AND OTHER PATENTS PENDING.

The information contained in this product literature is, to the best of our knowledge, true and accurate and the product as sold is conformant with the specifications set forth herein as determined by the assay methods described. Due to factors beyond our control such as conditions of use, incidental wear or accidents, improper handling or storage, Genencor International hereby DISCLAIMS ANY EXPRESS OR IMPLIED WARRANTIES, INCLUDING THE IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. Genencor International shall not be liable for any incidental, consequential, or special damages resulting in any way from the foregoing performance, or use of this product literature or the product described herein.

Nothing contained herein shall be construed as a representation by Genencor International that the use or misuse of the product or processes described herein will not violate any rule or regulation or infringe upon patents or other intellectual property rights of third parties or that the recommendations and usage suggestions described constitute any authorization or endorsement to infringe any such rights.



[www.genencor.com](http://www.genencor.com)

September 2005



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
INSTITUTO DE INGENIERÍA