



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
BAJA CALIFORNIA**

INSTITUTO DE INGENIERÍA

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E
INGENIERÍA**

**“DESARROLLO DE SENSORES Y BIOSENSORES
ELECTROQUÍMICOS PARA LA VIGILANCIA
MEDIOAMBIENTAL”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO
DE DOCTOR EN CIENCIAS**

Presentada por

MARY TRINY BELEÑO CABARCAS

Directora: Dra. Margarita Stoytcheva

Co-director: Dr. Roumen Zlatev

Mexicali, Baja California

Agosto 2019



INDICE

ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	X
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABLAS	XVI
1.INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	18
1.1 Planteamiento del problema y justificación	19
1.2 Objetivos de la investigación.....	22
1.2.1 Objetivo general	22
1.2.2 Objetivos específicos.....	22
1.3 Hipótesis	23
2. MARCO TEÓRICO	24
2.1 Plaguicidas organofosforados.....	25
2.1.1 Propiedades físico-químicas	26
2.1.2 Clasificación	28
2.1.3 Gases y agentes nerviosos	29
2.1.4 Toxicidad de los organofosforados	30
2.2 Biosensores.....	34
2.2.1 Conceptos Fundamentales	34
2.2.2 Clasificación de los biosensores	36
2.2.2.1 Clasificación basada en la naturaleza del proceso biológico.....	37
2.2.2.2 Clasificación basada en el bioreceptor	38
	III

2.2.2.3 Clasificación basada en el fundamento del transductor.....	46
2.2.3 Electrodo funcionalizado con nanomateriales.....	51
2.2.3.1 Nanotubos de carbono	55
2.2.3.2 Nanopartículas cerámicas	57
2.2.4 Compositos de quitosano y nanomateriales	58
2.3 Antecedentes de los métodos de determinación de pesticidas organofosforados	63
2.3.1 Métodos convencionales.....	63
2.3.2 Determinación con biosensores electroquímicos	64
2.3.2.1 Biosensores basados en la inhibición	67
2.3.2.2 Biosensores basados en la hidrólisis.....	71
3. MATERIALES Y METODOS	81
3.1 Instrumentos.....	85
3.2 Reactivos	85
3.3 Procedimiento experimental	87
3.3.1 Preparación de biosensores nanoestructurados con nanotubos de carbono de pared múltiple y nanopartículas de óxido de circonio.....	89
3.3.2 Preparación de biosensores nanoestructurados con nanotubos de carbono de pared múltiple y nanopartículas de hidroxiapatita.....	93
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	96
4.1 Biosensores nanoestructurados con nanotubos de carbono de pared múltiple y nanopartículas de óxido de circonio para la determinación de paraoxón.....	97
4.1.1 Optimización de las películas biocompuestas	97
4.1.1.1 Tiempo de electrodeposición y carga enzimática.....	97
4.1.1.2 Determinación de la permeabilidad del recubrimiento electroquímico.....	98

4.1.1.3 Cantidad optima de Nanomateriales.....	100
4.1.1.4 Caracterización electroquímica de los electrodos modificados con nanomateriales	102
4.1.1.5. Caracterización superficial de los electrodos mediante SEM	109
4.1.1.6. Espectros Infrarrojo de electrodos modificados	111
4.1.2 Caracterización analítica de los biosensores para la determinación de paraoxón	115
4.1.2.1 Curva de calibración, rango lineal y sensibilidad.....	116
4.1.2.2 Reproducibilidad en la fabricación del biosensor.....	118
4.1.2.3 Interferencias	118
4.1.2.4 Estabilidad de almacenamiento	119
4.1.2.5 Aplicación a matrices reales	120
4.2 Biosensores nanoestructurados con nanotubos de carbono de pared multiple y nanoparticulas de hidroxiapatita para la determinación paraoxón	121
4.2.1. Optimización de las condiciones experimentales de ensamblaje del electrodo	121
4.2.1.1 Cantidad optima de Nanomaterial	121
4.2.2 Caracterización electroquímica de los electrodos modificados.....	124
4.2.3 Caracterización superficial de los electrodos mediante SEM	127
4.2.4 Espectros de FTIR de electrodos modificados	128
4.2.5 Caracterización analítica del sensor CS/MWCNTs-HA/OPH para la determinación de Paraoxón	130
4.2.5.1 Curva de calibración y rango lineal.....	130
4.2.5.2 Reproducibilidad en la fabricación del biosensor.....	132
4.2.5.3 Interferencias	133
4.2.5.4 Estabilidad de almacenamiento	133
4.2.5.5 Porcentaje de recuperación.....	134

5. CONCLUSIONES GENERALES	136
6. REFERENCIAS	139
ANEXO A.....	154
PUBLICACIONES.....	154
OTROS PRODUCTOS	154

ABREVIATURAS

AChE: Enzima acetilcolinesterasa

Ag, AgCl/KCl_{sat}: electrodo de referencia plata cloruro de plata

BSA: Albumina de suero bovino

CNTs: Nanotubos de carbono

CS: Quitosano

EIS: Espectroscopía de Impedancia electroquímica

Epa: Potencial de pico anódico

FTIR: Infrarrojos por transformada de Fourier

GA: Glutaraldehído

GCE: Electrodo de carbón vítreo

HANPs: Nanopartículas de hidroxapatita

Ipa: Corriente de pico anódico

Kh: Constante de velocidad catalítica

MWCNTs: Nanotubos de carbono de pared múltiple funcionalizados con grupos –COOH

OMS: Organización mundial de la salud

OPH: Enzima organofosforado hidrolasa

OPs: Pesticidas organofosforados

PBS: Buffer de fosfato

***p*-NP:** *para*-nitrofenol

PVA: Alcohol polivinílico

Rct: Resistencia de transferencia de carga

SEM: Microscopia electrónica de barrido

SWCNTs: Nanotubos de carbono de pared simple

ZrO₂NPs: Nanopartículas de óxido de Zirconio

RESUMEN

La alta toxicidad aguda de los pesticidas organofosforados (OPs) impone el desarrollo de métodos analíticos simples, rápidos, sensibles y de precio razonable para su determinación *in situ*. Las técnicas basadas en biosensores electroquímicos para la determinación de los OPs cumplen con estos requisitos. El objetivo de este trabajo fue desarrollar nuevos biosensores amperométricos con mejores rendimientos analíticos para la determinación directa de OPs aplicando nuevos bionanocompuestos a base de quitosano para la modificación del electrodo de carbono vítreo (ECG). Las plataformas bionanocompuestas han sido en los últimos años una alternativa en el desarrollo de biosensores amperométricos debido especialmente, a su capacidad de integrar varios materiales de diferente naturaleza, y formar un nuevo material con propiedades físicas, mecánicas y eléctricas muy distintas a los materiales originales que lo constituyen. Los biosensores desarrollados con estos materiales presentan diferentes ventajas analíticas respecto a los conductores puros, que les proporciona un alto valor añadido como por ejemplo versatilidad, durabilidad, facilidad de regeneración superficial y de integración, funcionalidad como reservorio de material biológico, etc. La plataforma de detección de bionanocompuestos se construyó en un solo paso mediante la electrodeposición catódica de quitosano (CS) sobre la superficie de un electrodo GCE con nanotubos de carbono de pared múltiple funcionalizados con grupos $-COOH$ (MWCNTs), nanopartículas de ZrO_2 (ZrO_2 NPs) y la enzima organofosforada hidrolasa (OPH) atrapados en la matriz polimérica de quitosano.

En primer lugar se optimizaron las películas bionanocompuestas de quitosano en función del tiempo de electrodeposición y la composición de los MWCNTs y ZrO_2 NPs. Se utilizaron diferentes técnicas de caracterización que permiten obtener información de las propiedades eléctricas, electroquímicas y morfológicas del material. Se han construido biosensores de diferentes composiciones y se han caracterizado usando técnicas de voltametría cíclica, cronoamperometría, amperometría, espectroscopía de impedancia electroquímica, microscopia electrónica de barrido y espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier. La utilización de estas técnicas ha permitido estudiar, el efecto que la incorporación de los nanomateriales, en el material compuesto, tiene sobre la distribución de las partículas conductoras que forman la película bionanocompuesta. La eficacia de estas técnicas ha

quedado demostrada en la optimización del biosensor CS/MWCNTs-ZrO₂:OPH, donde la eficacia de la respuesta analítica ha sido superior al biosensor CS:OPH, que no ha sido modificado con nanomateriales. Los nuevos criterios de optimización, han sido aplicados también a biosensores con bionanocompuestos de quitosano con nanopartículas de hidroxiapatita (HA), MWCNTs y OPH.

Los electrodos GCE modificados con los bionanocompuestos CS/MWCNTs-ZrO₂:OPH y CS/MWCNTs-HA:OPH mostraron mayor estabilidad, mayor área activa, respuesta electroquímica más sensible y mejores rendimientos analíticos en la determinación directa de paraoxón, en comparación con los electrodos modificados con CS:OPH, CS/ZrO₂:OPH, CS/MWCNTs/OPH, y CS/HA:OPH. Estas ventajas están asociadas a la composición, estructura y acción sinérgica de los materiales seleccionados.

Los biosensores CS/MWCNTs-ZrO₂:OPH/GCE y CS/MWCNTs-HA:OPH/GCE se aplicaron para la determinación de paraoxón en muestras de riego enriquecidas, recolectada de los canales del valle de Mexicali (Baja California, México). Las altas recuperaciones de paraoxón mostraron resultados satisfactorios con un promedio en el rango de 99.2% y 101.2% para CS/MWCNTs-ZrO₂:OPH/GCE y CS/MWCNTs-HA:OPH/GCE, lo que confirma la alta precisión de los sensores y demuestran también una ausencia de efectos de la matriz cuando se utiliza de agua de riego.

ABSTRACT

The high acute toxicity of organophosphorus pesticides (OPs) requires the development of simple, rapid, sensitive, and reasonably priced analytical methods for in situ determination. The techniques based on electrochemical biosensors for the determination of organophosphorus pesticides meet these requirements. The objective of this work was the development of amperometric biosensors with better analytical performances for the direct determination of organophosphorus pesticides, applying a novel chitosan-based bionanocomposite for glassy carbon electrode (GCE) modification.

The bionanocomposite platforms have been in recent years an alternative in the development of amperometric biosensors due mainly, as its ability to integrate several materials of different nature and form a new material with physical, mechanical and electrical properties, very different from the original materials that they constitute it. The biosensors developed with these materials present various analytical advantages concerning pure conductors, which provides them with a high added value such as versatility, durability, easy surface regeneration and integration regeneration, functionality as a reservoir of biological material, etc.

The bionanocomposite detection platform was constructed in a single step by chitosan (CS) electrodeposition on the surface of a glassy carbon electrode with multiple-walled carbon nanotubes functionalized with -COOH groups (MWCNTs), ZrO₂ nanoparticles (ZrO₂NPs) and the organophosphate hydrolase enzyme (OPH) trapped in the polymer matrix of chitosan.

First, bionanocomposite chitosan films were optimized as a function of the electrodeposition time and the composition of the MWCNTs and ZrO₂NPs. Different characterization techniques were used to obtain information on the electrical, electrochemical, and morphological properties of the material. Biosensors of various compositions have been constructed and characterized using techniques of cyclic voltammetry, chronoamperometry, amperometry, electrochemical impedance, scanning electron microscopy, and infrared spectroscopy by Fourier transform. The use of these techniques has allowed studying the effect that the incorporation of nanomaterials, in the

composite material, has on the distribution of the conductive particles that form the bionanocomposite film. The effectiveness of these techniques has been demonstrated in the optimization of the CS/MWCNTs-ZrO₂: OPH biosensor, where the efficiency of the analytical response has been superior to the CS biosensor: OPH, which has not been modified with nanomaterials. The new optimization criteria have also been applied to biosensors with chitosan bionanocomposite with hydroxyapatite nanoparticles (HA), MWCNTs, and OPH.

The GCE electrodes modified with the bionanocompounds CS/MWCNTs-ZrO₂:OPH and CS/ MWCNTs-HA:OPH showed greater stability, greater active area, more sensitive electrochemical response and better analytical performances in the direct determination of paraoxon. In comparison with electrodes modified with CS:OPH, CS/ZrO₂:OPH, CS/MWCNTs/OPH, and CS/HA:OPH. These advantages are associated with the composition, structure, and synergistic action of the selected materials.

The biosensors CS/MWCNTs-ZrO₂:OPH/GCE and CS/MWCNTs-HA:OPH/GCE were applied for the determination of paraoxon in enriched irrigation samples, collected from the channels of the Mexicali Valley (Baja California, Mexico). The high recoveries of paraoxon showed satisfactory results with an average in the range of 99.2% and 101.2% for CS/MWCNTs-ZrO₂: OPH/GCE and CS/MWCNTs-HA:OPH/GCE, which confirms the high precision of the sensors and also demonstrate the absence of matrix effects when using irrigation water.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química general de los plaguicidas organofosforados.	27
Figura 2. Estructuras de algunos pesticidas organofosforados.	29
Figura 3. Estructuras químicas de los agentes nerviosos organofosforados	30
Figura 4. Mecanismo de acción de los OPs	31
Figura 5. Números anuales de artículos de investigación publicados sobre biosensores	34
Figura 6. Estructura de un biosensor	35
Figura 7. Los diferentes tipos de bioreceptores inmovilizados en las superficies de los biosensores	39
Figura 8. Tendencias de los números anuales de artículos publicados sobre biosensores basados en bioreceptores	40
Figura 9. Representación esquemática de una reacción enzimática catalizada	41
Figura 10. Clases y subclases de biosensores, en relación con el tipo de transductor. Las tres categorías de transductores se pueden dividir en varias subclases	46
Figura 11. Los diferentes tipos de transductores ópticos. Se pueden dividir en un gran número de subclases basadas en diferentes principios ópticos. a) TR-FIA: Fluoroinmunoensayo de resolución temporal; b) FCIA: inmunoensayo citométrico de flujo; c) SPR: resonancia de plasmón superficial; d) SPRi: imágenes de resonancia de plasmón superficial; e) DOT: tecnología de óptica difractiva	47
Figura 12. Ilustración de biosensores enzimáticos amperométricos de primera, segunda y tercera generación	51
Figura 13. Nanomateriales comúnmente empleados en la tecnología de biosensores.	52
Figura 14. Esquema básico de un biosensor nanoestructurado	53
Figura 15. (a) Esquemas de SWCNTs que se componen de una sola capa de grafito rizado. (b) Esquemas de MWCNTs	55
Figura 16. Estructura de quitosano y sus propiedades características.	60
Figura 17. Electrodeposición catódica del quitosano. La deposición conjunta permite que varios componentes biológicos y no biológicos sean ensamblados y atrapados en la película de quitosano electrodepositada	62
Figura 18. Evolución del número anual de artículos sobre los diferentes tipos de biosensores desde 2000 hasta 2015	66

Figura 19. Esquema de la Cuantificación de OPs por electrodo enzimático. _____	73
Figura 20. Celda electroquímica _____	82
Figura 21. Montaje para electrodeposición _____	82
Figura 22. Espectrofotómetro UV-Visible Evolution 60S Thermo Scientific. _____	83
Figura 23. Dispersor ultrasónico UP200S _____	83
Figura 24. Microscopio electrónico de exploración JEOL JSM-6010PLUS/LV. _____	84
Figura 25. Espectrofotómetro Perkin-Elmer Spectrum One. _____	84
Figura 26. Gránulos de DEFENZ 130BG _____	86
Figura 27. Composición del gránulo de DEFENZ 130BG. _____	86
Figura 28. Ilustración esquemática de la modificación de los electrodos mediante electrodeposición de CS con diversos nanomateriales. _____	92
Figura 29. Esquema de modificación del electrodo por electrodeposición. _____	93
Figura 30. A) Comportamiento de la actividad de OPH en función del tiempo de electrodeposición de CS a 2.5, 5.0, 7.5 y 10 min. (B) ilustración del incremento del grosor de la película con CS:OPH con el tiempo de electrodeposición. ____	98
Figura 31. A) Voltamogramas cíclicos de p -NP 1 mmol L^{-1} con el GCE y con el GCE modificado con CS:BSA, aplicando un tiempo de electrodeposición de CS de 2.5, 5.0, 7.5 y 10 min. (B) Comportamiento de la permeabilidad de película CS:BSA en función del tiempo de electrodeposición. _____	99
Figura 32. A) Voltamogramas cíclicos de 0.1 mmol L^{-1} p -NP de GCE por electrodeposición de 5 min de CS/ZrO ₂ :BSA con 0.1, 0.25, 0.5 y 1 mg mL^{-1} de ZrO ₂ . B) Comportamiento de las corrientes de pico anódico para las nanopartículas de ZrO ₂ . _____	100
Figura 33. A) Voltamogramas cíclicos de 0.1 mmol L^{-1} p -NP de GCE modificado por electrodeposición de 5 min de CS/MWCNTs:BSA con 0.1, 0.25, 0.5 y 1 mg mL^{-1} de MWCNTs. B) Comportamiento de las corrientes de pico anódico para las nanopartículas de MWCNTs. _____	101
Figura 34. Voltamogramas cíclicos de 0.1 mmol L^{-1} p -NP con ECG y ECG modificado con: CS/BSA, CS-0.5 mg ZrO ₂ /BSA, CS-0.25 mg MWCNTs/BSA y CS-0.50 mg ZrO ₂ -0.25 mg MWCNTs/BSA. _____	103

- Figura 35. (A) Cronoamperogramas obtenidos con el GCE modificado con CS/MWCNTs-ZrO₂:BSA. Potencial de 400 mV. Concentración de p-NP: (a) 0 mmol L⁻¹; (b) 0.05 mmol L⁻¹; (c) 0.1 mmol L⁻¹. (B) Graficas de Cottrell y (C) gráficas I_c/I_L vs. t^{1/2} derivadas de los cronoamperogramas. _____ 106
- Figura 36. Diagramas de Nyquist de sensores: CS:OPH/GCE, CS/ZrO₂:OPH/GCE, CS/MWCNTs:OPH/GCE y CS/MWCNTs-ZrO₂:OPH/GCE, medidas realizadas en medio Fe(CN)₆^{4-/3-} (1:1) 1.0 mmol L⁻¹ en PBS (0.1 mol L⁻¹). _____ 108
- Figura 37. Imágenes SEM de las (I) CS:OPH/GCE, (II) CS/ZrO₂:OPH/GCE, (III) CS/MWCNTs:OPH/GCE y (IV) CS/MWCNTs-ZrO₂:OPH/GCE con un aumento de 1000X, voltaje de aceleración de 20.0 kV y resolución de 10 μm. _____ 110
- Figura 38. Espectros de FTIR de OPH, CS y mezcla CS/OPH. _____ 112
- Figura 39. Espectros de FTIR de ZrO₂ y mezcla CS-ZrO₂/OPH _____ 113
- Figura 40. Espectros de FTIR de MWCNTs-COOH y mezcla CS-MWCNTs-COOH/OPH. 114
- Figura 41. Espectro de FTIR de mezcla CS-MWCNTs-ZrO₂-COOH/OPH _____ 115
- Figura 42. Respuestas amperométricas de los biosensores de nanocompuestos de quitosano a concentraciones crecientes de paraoxón (A) y las correspondientes gráficas de calibración (B). 0.1 mol L⁻¹ PBS, pH 8.5; 25 °C. _____ 116
- Figura 43. Estabilidad de almacenamiento de los sensores CS:OPH y CS/ZrO₂-MWCNTs:OPH. _____ 120
- Figura 44. Voltamogramas cíclicos de 0.1 mmol L⁻¹ p-NP de GCE modificado por electrodeposición de 5 min, CS/HA:BSA (1.0, 2.5, 5.0, y 10 mg mL⁻¹ de hidroxiapatita). B) Comportamiento de las corrientes de pico anódico para las HANPs. _____ 122
- Figura 45. (A) Respuestas amperométricas de los biosensores frente a paraoxón (a) CS/MWCNTs(0.25 mgmL⁻¹)-HA(1.0 mgmL⁻¹):OPH (b) CS/MWCNTs(0.25 mgmL⁻¹)-HA(5.0 mgmL⁻¹):OPH. (B) Variación de la sensibilidad de la determinación amperométrica de paraoxón en función de la composición de la mezcla de quitosano. _____ 123
- Figura 46. (A) voltamogramas cíclicos de los GCE modificados frente a la oxidación del p-NP. (B) Valor de la corriente de pico de oxidación de p-NP con los electrodos

modificados: (a) CS/BSA, (b) CS/HA:BSA (c) CS/MWCNTs:BSA (d) CS/MWCNTs-HA:BSA.	124
Figura 47. (A) Cronoamperogramas obtenidos con CS/MWCNT-HA:BSA; Concentración de p-NP: (a) 0 mmol L ⁻¹ ; (b) 0.05 mmol L ⁻¹ ; (c) 0.1 mmol L ⁻¹ . (B) Gráficos de Cottrell derivados de los cronoamperogramas. (C) Gráficos I _C / I _L vs. t _{1/2} derivados de los cronoamperogramas.	126
Figura 48. Imágenes SEM de las películas electrodepositadas de CS:OPH, CS/HA:OPH, CS/MWCNT:OPH y CS/MWCNT-HA:OPH.	128
Figura 49. Espectros de FTIR de HAPNs y mezcla CS/HA:OPH.	129
Figura 50. Espectros de FTIR de la mezcla CS/MWCNTs-HA:OPH.	130
Figura 51. (A) Respuestas amperométricas del electrodo modificado con CS-MWCNT-HA/OPH a concentraciones crecientes de paraoxón (20 μmol L ⁻¹) (B) la gráfica de calibración correspondiente.	131
Figura 52. Estabilidad del biosensor de CS/MWCNTs-HA:OPH	134

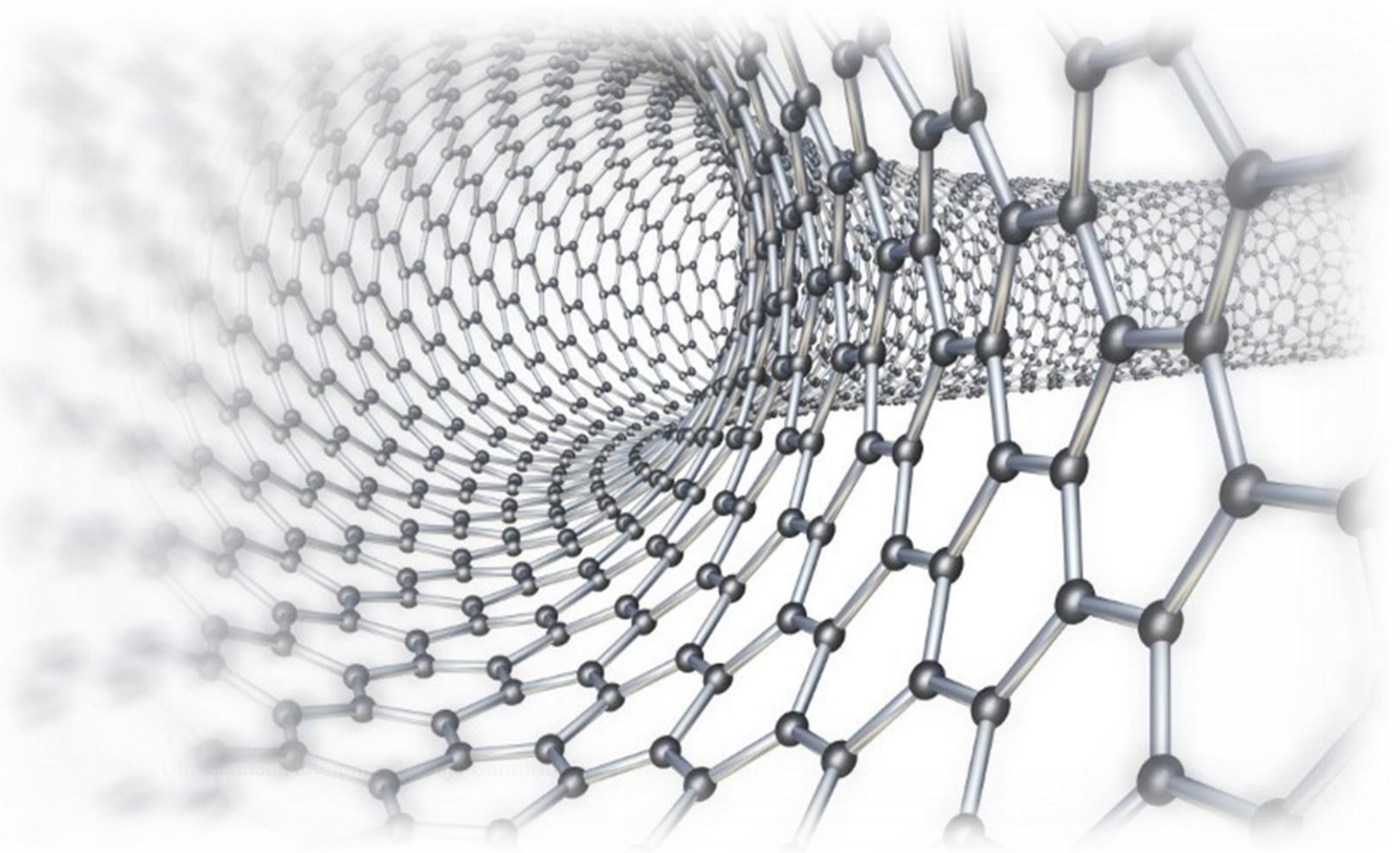
LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Las diferentes técnicas de inmovilización de bioreceptores en superficies _____	45
Tabla 2. Rendimientos analíticos de algunos métodos cromatográficos del análisis de plaguicidas OPs _____	63
Tabla 3. Comparación de técnicas analíticas convencionales y biosensores _____	65
Tabla 4. Biosensores electroquímicos de AChE con nanomateriales _____	69
Tabla 5. Biosensores electroquímicos basados en OPH para la determinación de OPs. ___	74
Tabla 6. Valores promedios de corriente de pico anódico (I_{pa}) de <i>p</i> -NP con GCE y con los electrodos modificados: CS/BSA, CS/ZrO ₂ :BSA, CS/MWCNTs:BSA y CS/ZrO ₂ -MWCNTs:BSA. _____	104
Tabla 7. Valores promedios del área electroquímicamente y <i>kh</i> de la oxidación de <i>p</i> -NP para el GCE modificado y sin modificación. _____	107
Tabla 8. Comparación de la resistencia a la transferencia de carga de los diferentes electrodos modificados. _____	109
Tabla 9. Características de calibración de los biosensores frente a la determinación de paraoxón _____	116
Tabla 10. Rendimientos analíticos de los sensores basados en OPH para la determinación de paraoxón. _____	117
Tabla 11. Valores promedios del área electroquímicamente activa y <i>kh</i> de la oxidación de <i>p</i> -NP para los electrodos de carbón vítreo modificados. _____	126
Tabla 12. Rendimientos analíticos de los sensores basados en OPH para la determinación de paraoxón. _____	132
Tabla 13. La recuperación de la paraoxón en agua de grifo. _____	134



1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



1.1 Planteamiento del problema y justificación

Los pesticidas se utilizan ampliamente en la agricultura para prevenir, controlar o eliminar plagas, malezas, insectos y hongos, y aumentar el rendimiento de los productos agrícolas. El uso de pesticidas puede asegurar aproximadamente un tercio de los productos agrícolas en todo el mundo. Sin embargo, el uso excesivo de pesticidas puede causar la contaminación del agua subterránea y su acumulación en los alimentos, lo que resulta en graves impactos en especies no objetivo, como los seres humanos y los animales.

La exposición humana a pesticidas puede provocar efectos nocivos en la salud como la neurotoxicidad, genotoxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad. Estos compuestos imitan a las hormonas y causan la muerte en casos graves. Los pesticidas organofosforados inhiben de forma irreversible la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) en el cuerpo humano y en los animales, lo que provoca una interferencia con la acción de los órganos vitales y, en ocasiones, parálisis respiratoria y muerte.

En los últimos años, la contaminación por plaguicidas se ha convertido en una de las principales preocupaciones y uno de los desafíos más alarmantes. Consecuentemente, los gobiernos de muchos países han establecido una serie de políticas para regular el uso de pesticidas, y han implementado niveles máximos de residuos en el agua, alimentos y los productos agrícolas. Sin embargo, la mayoría de los pesticidas podrían estar presentes en los límites propuestos, y sus efectos de acumulación en órganos vitales y la exposición continua pueden aumentar los riesgos para la salud humana. Por lo tanto, el desarrollo de métodos y técnicas para la detección de residuos de pesticidas es un tema importante para garantizar la seguridad de los alimentos.

Las herramientas clásicas para el análisis de pesticidas organofosforados incluyen la cromatografía de gases, cromatografía líquida de alto rendimiento, espectrometría de masas y electroforesis. Si bien estas técnicas de análisis poseen una alta sensibilidad y reproducibilidad, aún tienen muchos inconvenientes. Requieren instrumentos sofisticados y costosos, requieren de personal altamente capacitado y demandan largos tiempos de extracción, preconcentración y limpieza de la muestra. Además, una de las principales

desventajas de estos métodos es la limitación de la detección en el sitio y en tiempo real, lo que hace que sea imposible de usar en casos de emergencia.

Uno de los principales retos de la Química Analítica en la actualidad es el establecimiento de nuevos métodos de análisis rápidos, sensibles y fiables, que no impliquen tratamiento de las muestras ni el uso de instrumentos complejos, y que puedan ser implementados fuera de los laboratorios. Esta problemática puede ser afrontada mediante el diseño de novedosos sensores y biosensores amperométricos, donde se combine el uso de bioreceptores altamente específicos con la gran sensibilidad, simplicidad y capacidad de miniaturización presentada por los transductores electroquímicos.

Estos nuevos biosensores deberán ser altamente sensibles y reproducibles, específicos al análisis de interés, de fácil manejo, capaces de proporcionar señales analíticas estables para concentraciones muy bajas de los análisis en muestras complejas, y todo ello sin sufrir el efecto adverso de interferencias.

De acuerdo con el estado del arte los biosensores amperométricos más utilizados para la determinación y monitoreo de organofosforados en muestras ambientales son los basados en la inmovilización de las enzimas AChE y OPH sobre electrodos de carbono. Los primeros se basan en la inhibición de la actividad de la AChE por los OPs, mientras que los segundos implican la hidrólisis de los OPs catalizada por la OPH.

Los sensores basados en OPH presentan varias ventajas sobre los basados en AChE, como el mecanismo de detección directa, especificidad hacia los sustratos OPs sustituidos con nitrofenilo, y respuesta reversible del sensor. El principal inconveniente de los sensores de OPH es su baja sensibilidad y límites de detección más altos en comparación con los basados en AChE.

Por lo tanto, los estudios actuales se enfocan en el aumento de la sensibilidad de los sensores electroquímicos basados en OPH, mediante el diseño de nuevas plataformas biosensoras, altamente sensibles y reproducibles, con bajos límites de detección e interferencias, de fácil manejo, robustas y miniaturizadas.

Afrontar esta problemática impone adoptar estrategias originales y multidisciplinarias, centradas en el desarrollo de nuevos nanomateriales para la preparación de electrodos con óptima arquitectura e idóneas características estructurales y electroconductoras, así como en el establecimiento de nuevos procedimientos para la inmovilización eficiente y selectiva de las biomoléculas sobre la superficie de dichos electrodos.

Las interfaces así generadas, deben ser capaces proporcionar un microambiente favorable para que se mantenga la actividad de la OPH y permitir la rápida transferencia electrónica. Una de las estrategias más acertadas para lograr este fin, basada en la ingeniería de nanomateriales, es el diseño racional de nuevos electrodos nanoestructurados con mejores propiedades.

En los últimos años se han venido desarrollando diferentes mezclas de polímeros con nanomateriales como plataformas electrónicas que posibilitan el diseño de biosensores con excelentes propiedades, tales como biocompatibilidad, buena reversibilidad, estabilidad, transferencia electrónica y una elevada superficie de reacción que permite el incremento en la sensibilidad de las determinaciones, debido a una mayor eficacia en las interacciones entre muestras y reactivos.

En este contexto, la electrodeposición de quitosano podría considerarse una estrategia muy atractiva para la modificación de electrodos y la biofuncionalización. El quitosano es una matriz apropiada para la inmovilización de enzimas debido a la presencia de numerosos grupos funcionales; también es adecuado para la dispersión de nanotubos de carbono (CNTs) y nanopartículas. Por lo tanto, el quitosano y los nanocompuestos de quitosano se utilizan ampliamente como plataformas electroquímicas de biosensores.

Teniendo en cuenta lo anterior este trabajo de tesis busco funcionalizar electrodos de grafito mediante la electrodeposición de quitosano con CNTs y nanopartículas biocerámicas (óxido de circonio e hidroxapatita), para desarrollar biosensores basados en OPH con mejor respuesta electroanalítica y buen desempeño amperométrico para la determinación directa y sensible de OPs en muestras ambientales.

1.2 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.2.1 Objetivo general

Diseñar, caracterizar y aplicar nuevos biosensores electroquímicos con características analíticas mejoradas para la determinación directa de plaguicidas organofosforados, aplicando electrodos enzimáticos funcionalizados con bionanocompuestos contenidos en quitosano.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Desarrollar nuevos biosensores electroquímicos mediante la modificación de la superficie de un electrodo de carbón vítreo con bionanocompuestos de quitosano, con la enzima OPH, nanotubos de carbono de paredes múltiples, nanopartículas de ZrO_2 y nanopartículas de hidroxiapatita.
2. Preparar y caracterizar los electrodos enzimáticos con los bionanocompuestos de quitosano.
3. Optimizar todas las variables implicadas en la preparación y funcionamiento de los nuevos biosensores enzimáticos.
4. Caracterizar de manera electroquímica y morfológica la superficie electródica modificada, empleando distintas técnicas y métodos.
1. Evaluar las características analíticas de los biosensores desarrollados, de acuerdo a las recomendaciones de la IUPAC. Estas características se han comparado en todos los casos, con las existentes en la bibliografía.
2. Aplicar la determinación de analitos en muestras sintéticas y reales.

El plan de trabajo propuesto para la consecución de los objetivos planteados se puede resumir en las siguientes etapas:

1. Preparación de los bionanocompuestos de quitosano.

-
2. Optimización del tiempo de electrodeposición del bionanocompuestos de quitosano y la carga enzimática.
 3. Determinar de la permeabilidad de las películas bionanocompuestas.
 4. Determinar de las cantidades óptimas de cada nanomaterial.
 5. Caracterización electroquímica y morfológica de las superficies electródicas nanoestructuradas y funcionalizadas con enzimas de interés analítico.
 6. Determinar las características analíticas, estabilidad, selectividad y reproducibilidad de los biosensores, y su aplicación a la determinación de analitos en muestras reales.

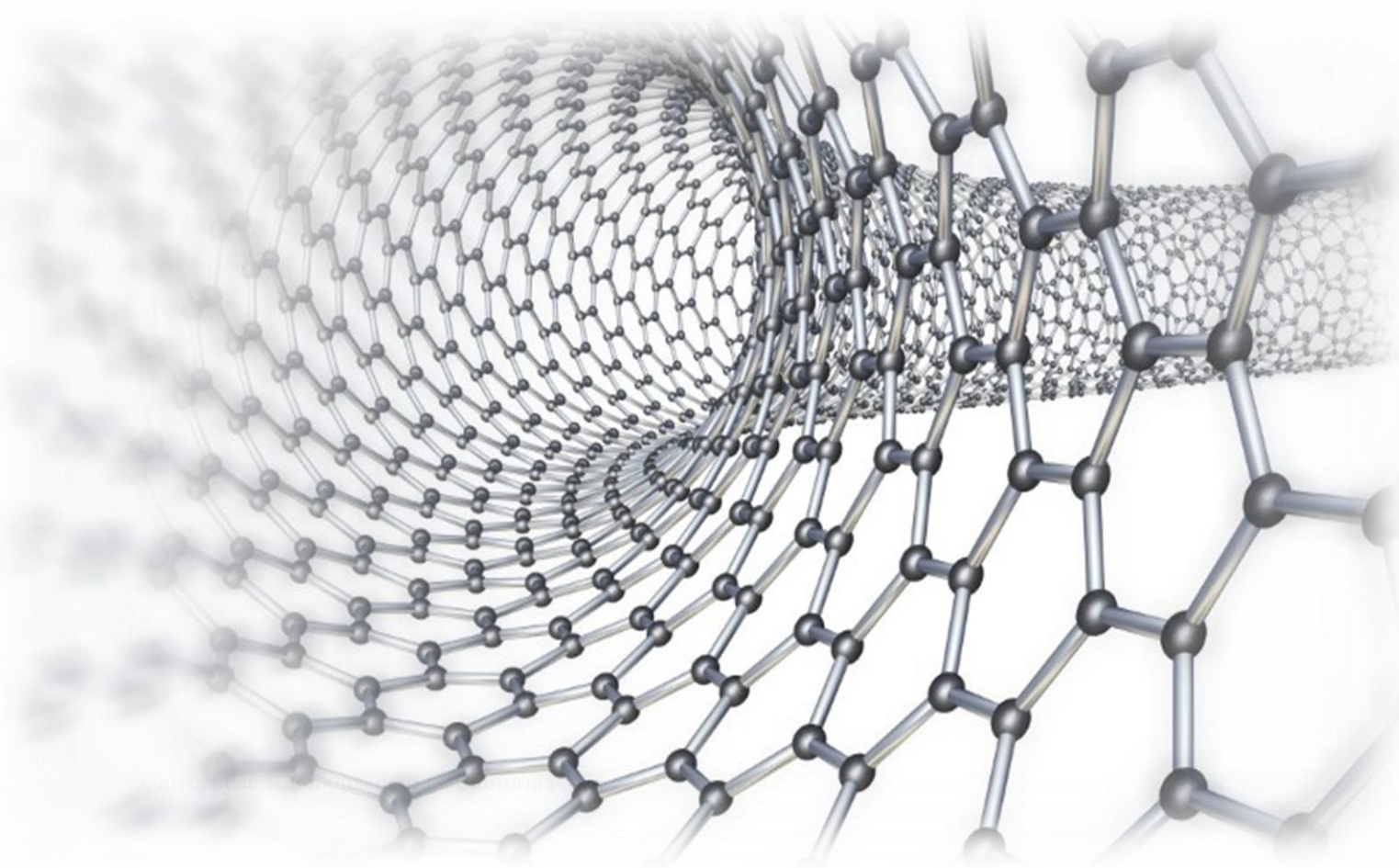
1.3 Hipótesis

Se espera que la modificación de la superficie del electrodo con los bionanocompuestos de quitosano y nanopartículas de ZrO_2 y HA, mejore la sensibilidad de las determinaciones de OPs y permita alcanzar bajos límites de detección.

- Se espera que los bionanocompuestos de quitosano proporcionen un microambiente favorable para la enzima OPH y permita obtener resultados reproducibles.
- Además, se espera también que la acción sinérgica de los MWCNTs, las nanopartículas de ZrO_2 y de HA conduzcan a la mejora en los rendimientos analíticos del biosensor y eviten el ensuciamiento y pasivación de la superficie del electrodo causada por polímeros productos de reacciones de oxidación.

2

MARCO TEÓRICO



2.1 PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS

De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), los plaguicidas, también conocidos como pesticidas son sustancias o mezclas de sustancias destinadas a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos [1]. El término también incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o inhibidores de la germinación, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte [2].

En la definición de plaga se incluyen insectos, hierbas, pájaros, mamíferos, moluscos, peces, nematodos, o microbios que compiten con los humanos para conseguir alimento, destruyen la propiedad, propagan enfermedades o son vectores de estas, o causan molestias [2].

Bajo la definición de plaguicida, anteriormente indicada, se engloban numerosos productos. Por ejemplo los fungicidas (para combatir hongos), herbicidas (malas hierbas), nematocidas (gusanos), molusquicidas (caracoles y babosas), acaricidas (ácaros), insecticidas (insectos) y rodenticidas (roedores), como los más conocidos.

Los plaguicidas se suelen clasificar basándose diversos criterios como: *su toxicidad, su modo de acción, el tipo de aplicación y la familia química a la que pertenecen*. Actualmente debido a la gran cantidad de plaguicidas existentes y de las familias químicas implicadas no resulta fácil una adecuada clasificación química. Siguiendo las directrices de la OMS [1], los pesticidas se pueden clasificar en organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, derivados biperidílicos, clorofenoxiácidos, cloronitrofenoles y organomercuriales, compuestos orgánicos del estaño, tiocarbamatos, ditiocarbamatos y otros como bromuro de metilo, fosfatina, ácido cianhídrico (fumigantes), sulfato de talio, fluoracetato sódico, warfarina (rodenticidas) y arsenito sódico, criolita (insecticidas inorgánicos).

Los organofosforados se desarrollaron en Alemania durante la Segunda Guerra Mundial para sustituir a la nicotina en el control de áfidos. La primera molécula sintetizada, el tetraetilpirofosfato (TEPP), en 1854 por Moschniny De Clermont era muy efectiva como insecticida, pero poco apropiada para su uso agrícola por su rápida degradación en el medio ambiente [3,4]. Al continuar las investigaciones de productos más estables en 1944 Schrader sintetizó el compuesto llamado Paration Etlíco, este producto fue el primer órganofosforado que se introdujo en todo el mundo iniciándose su producción industrial, poco después se descubrió el ester metílico del Paration Etlíco que es menos tóxico a mamíferos a este producto se le denomina Paration Metílico, a partir de ligeras modificaciones en la estructura se pueden desarrollar insecticidas menos tóxicos por ejemplo Fention, Fenitrocion que fueron descubiertos en 1958 y 1959 respectivamente [5,6].

Estos productos químicos producen su toxicidad en virtud de la inhibición de la enzima AChE, que termina la acción del neurotransmisor acetilcolina en las sinapsis del tejido nervioso y en las uniones neuromusculares. Estos productos químicos se denominan "anticolinesterasas". Algunos de los OPs con fuerte poder inhibidor de la AChE también se utilizan como agentes nerviosos o gases nerviosos [7].

Actualmente, los organofosforados constituyen el grupo de plaguicidas más utilizados en la agricultura mundial, habiendo desplazado a los organoclorados. Este hecho se ha debido inicialmente a la alta toxicidad y capacidad de bioacumulación en la cadena trófica de estos últimos [8]. Aunque los compuestos organofosforados son en principio menos peligrosos que los organoclorados se hace necesario su estudio debido a la variabilidad química de este grupo y su uso masivo, junto con la evidencia de que existen organofosforados, como el fentión o el metilparatión, que son capaces de bioacumularse [9, 10].

2.1.2 Propiedades físico-químicas

Los pesticidas organofosforados son un gran número de compuestos sintéticos, incluyendo ésteres, aminas o tióderivados del ácido fosfórico, fosfónico, fosforotioico o fosfonotioico; generalmente liposolubles y semivolátiles [11, 12, 13]. Presentan alta reactividad química y se degradan con relativa facilidad, bien mediante reacciones de

hidrólisis, que dan lugar a productos inocuos para el medio ambiente, o por reacciones de oxidación, que conducen a metabolitos hidrolizables de mayor o menor toxicidad [14].

La liposolubilidad de estos compuestos facilita su absorción, porque atraviesan las barreras biológicas (piel, mucosas), también penetran el sistema nervioso central y algunos pueden almacenarse en los tejidos provocando toxicidad retardada debido su la liberación tardía. Su mediana presión de vapor permite que sean semivolátiles y que puedan ser absorbidos por vías respiratorias, sufren hidrólisis alcalina en la tierra y en líquidos biológicos, no siendo persistentes en el ambiente [12, 15]. La mayoría de los compuestos organofosforados presentan las siguientes estructuras químicas:

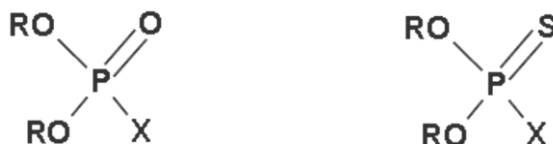


Figura 1. Estructura química general de los plaguicidas organofosforados.

Estos compuestos se caracterizan por un átomo de fósforo pentavalente unido por un enlace simple a tres sustituyentes orgánicos (frecuentemente a través de un oxígeno) y por un enlace covalente coordinado (doble enlace) a un oxígeno o un azufre (Figura 1). Uno de los sustituyentes (X, puede ser alifático, homocíclico o heterocíclico) se denomina “grupo saliente” debido a que está unido a través del enlace menos estable de los tres enlaces simples, y es el sustituyente que se elimina cuando el compuesto fosforila la enzima blanco o cuando el compuesto es hidrolizado o se escinde oxidativamente [15].

Todas estas propiedades antes mencionadas están ligadas al átomo que se une al fósforo por el doble enlace. Cuando el átomo unido al fosforo es el oxígeno estos compuestos se denominan OXONES, y son potentes inhibidores de la enzima colinesterasa, su vida media es más corta, debido a que se favorece la hidrólisis del compuesto, especialmente bajo condiciones alcalinas. Para hacerlos más resistentes a la hidrólisis, se ha sustituido al oxígeno por un átomo de azufre [16]. Estos compuestos son llamados TIONES, y son pobres inhibidores de la colinesterasa (Figura 1). Pero tienen la característica de atravesar la membrana celular más rápidamente que los oxones, poseen vida media más prolongada y son altamente tóxicos [17]. A pesar de las diferencias en las estructuras químicas, todos los

OPs comparten una cosa en común: todos ellos tienen un átomo de fósforo pentavalente y un enlace fosforilo (P=O) o tiofosforilo (P=S) [18].

2.1.3 Clasificación

Basándose en la reactividad de estos compuestos con los órganos diana en el organismo, podemos clasificar a los plaguicidas organofosforados en dos grandes grupos [19]:

- **Inhibidores directos:** éstos tienen un átomo de oxígeno unido a un átomo de fósforo mediante un enlace covalente. Son altamente reactivos y no necesitan ningún tipo de activación para inhibir la actividad de la AChE. Es el caso, por ejemplo, del diclorvos.
- **Inhibidores indirectos:** poseen un átomo de azufre unido al átomo de fósforo mediante un enlace covalente coordinado (fosfortioatos, fosfonotioatos y fosforoditioatos). Necesitan la activación metabólica mediante el citocromo P-450 para ejercer su acción. Ejemplos de organofosforados que sufren dicha transformación son: azinfosmetil, dimetoato y paratión. Estos compuestos se desulfuran oxidativamente a azinfosmetil-oxón, ometoato y paraoxón, respectivamente, que son los metabolitos activos que se unen a la AChE.

Los OPs por lo general, poseen un coeficiente de partición octanol/agua muy alto además de una presión de vapor muy baja. Son fácilmente hidrolizables, presentan una baja volatilidad, salvo el diclorvos [20]. No son bioacumulables y presentan bajo potencial de carcinogenicidad; sin embargo, algunos de estos plaguicidas exhiben una toxicidad aguda mayor, 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 en suelo de 90 días, en contraste con el Malatión y Paratión que tienen una vida media de una semana, aunque es importante notar que este último pesticida puede bioacumularse como su metabolito, es decir; en forma de Paraoxón, siendo este aún más persistente [21]. En la Figura 2, se muestran las estructuras químicas de algunos de los pesticidas OPs de uso común.

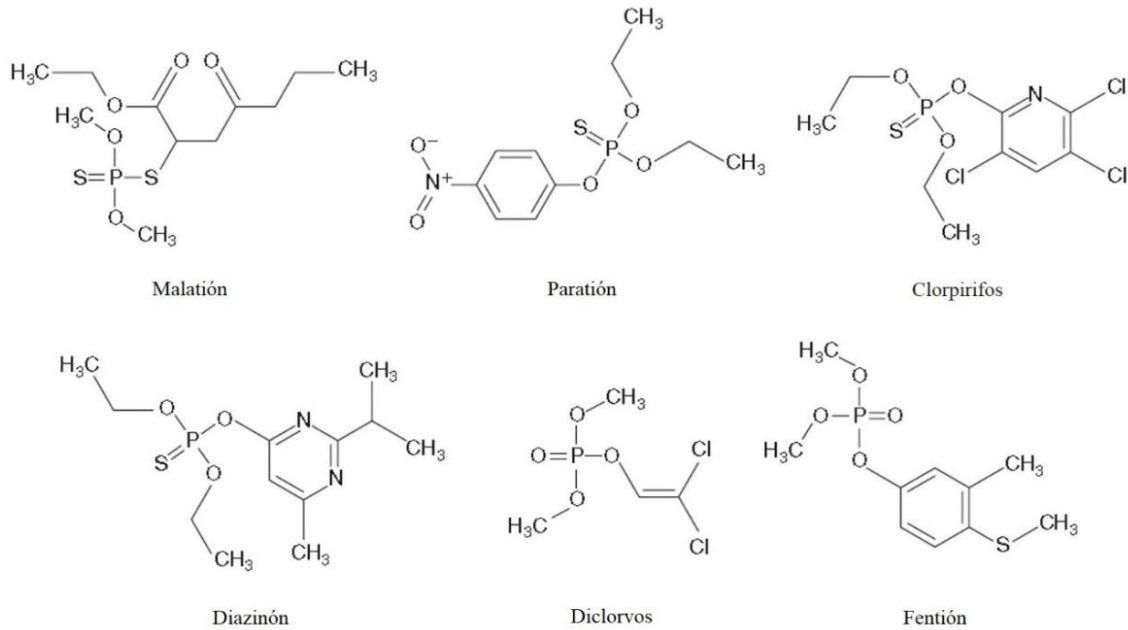


Figura 2. Estructuras de algunos pesticidas organofosforados [7].

2.1.4 Gases y agentes nerviosos

Los agentes nerviosos organofosforados incluyen tabún, sarín, somán, ciclosarina, VX y VR. Estos compuestos son altamente tóxicos y representan amenazas continuas para la vida de los seres humanos, así como los animales, ya que pueden ser utilizados como armas químicas de destrucción masiva. Hasta el momento, estos agentes han sido utilizados por dictadores y terroristas. Estos compuestos producen toxicidad al inhibir directamente la AChE y son mucho más potentes que los pesticidas organofosforado, ya que causan letalidad a los animales incluso en dosis menores a miligramos. Sus estructuras químicas se muestran en la Figura 3 [7].

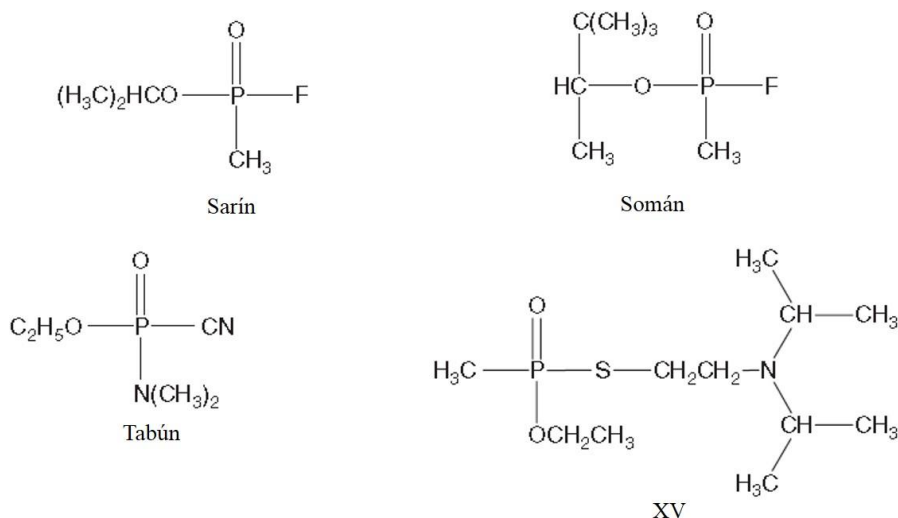


Figura 3. Estructuras químicas de los agentes nerviosos organofosforados [7].

2.1.5 Toxicidad de los organofosforados

Los OPs penetran en el cuerpo principalmente por inhalación, ingestión, inyección o cutáneo. Luego de su absorción, una vez que ingresan en el organismo los OPs se distribuyen ampliamente por el organismo del animal a través de la sangre [22], poseen una vida media corta y son metabolizados por una serie de enzimas (esterasas, transferasas, etc.) fundamentalmente en el hígado, sufriendo una serie de transformaciones químicas, las cuales tienden a aumentar su hidrosolubilidad facilitando su excreción, la cual lleva a cabo a nivel renal [23].

Los organofosforados son insecticidas anti-esterasa y causan sobreestimulación en las terminales nerviosas colinérgicas. Los efectos tóxicos de los pesticidas organofosforados, pueden inhibir la actividad de la enzima AChE competitiva e irreversiblemente. Este proceso ocurre tanto en los insectos como en los seres humanos [24]. La acetilcolinesterasa cataliza la degradación del neurotransmisor acetilcolina en la sinapsis (panel amarillo en la Figura 4). Su mecanismo de acción se basa en la fosforilación de la AChE en las terminaciones nerviosas, provocando así la inhibición de la misma. 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, (panel rojo en la Figura 4) [25, 26].

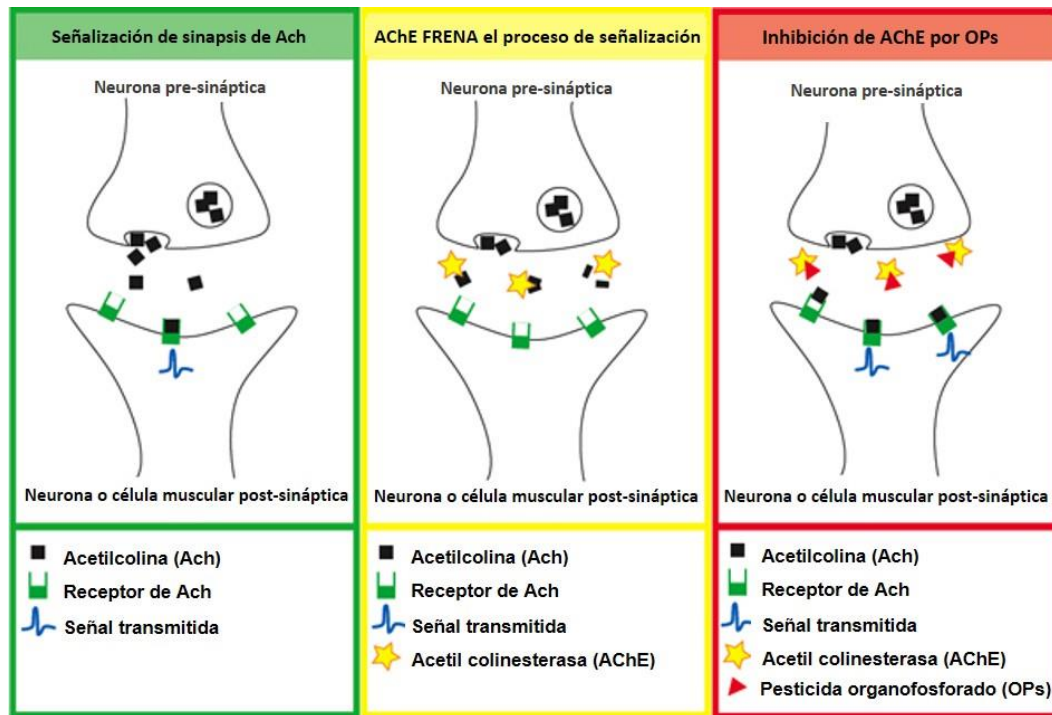


Figura 4. Mecanismo de acción de los OPs [25].

La acumulación resultante de acetilcolina en el nervio interrumpe la sinapsis neuronal, dando como resultado un síndrome colinérgico agudo mediante neurotransmisión continua. Como consecuencia, pueden surgir serias afectaciones en órganos vitales como contracciones bronquiales, un aumento en la salivación, la contracción de los músculos blandos (ejecutores de las funciones involuntarias), retorcimientos y calambres en los músculos esqueléticos, dándose la muerte en casos severos. El inicio clínico de la sobreestimulación colinérgica puede variar de casi instantánea a varias horas después de la exposición según la Unidad de Especialidad en Salud Ambiental Pediátrica [27]. En la Figura 4 se refleja la hidrólisis normal de la acetilcolina y el efecto inhibitorio causado por pesticidas OPs.

Los efectos sobre la salud varían de acuerdo con la duración de la exposición y la dosis, pudiéndose presentar intoxicaciones agudas y crónicas. Por un lado, la toxicidad crónica derivada de una prolongada exposición a dosis muy bajas de uno o varios de estos productos, provocada principalmente por la ingestión de alimentos contaminados, aun en las regiones

donde existe el antecedente de rociado intradomiciliario [28]. Y por otro, la toxicidad aguda causada accidentalmente en su manipulación, aplicación o por intentos suicidas.

De acuerdo con Paoletti y Pimentel [29], se estima que se aplican más de 2.5 millones de toneladas de pesticidas en el mundo; sin embargo, hay pérdidas del 40 % del potencial de producción asociadas a la presencia de plagas, malezas y enfermedades; además, y de manera notoria, se registran diversos efectos en 26 millones de individuos en el mundo, entre quienes se cuentan 220 mil muertos anuales [30, 31]. Siendo estos es su mayoría, agricultores, trabajadores en la fabricación de pesticidas, aplicadores de pesticidas, floricultores y otras personas en especial las poco experimentadas en su manejo, pertenecientes a países en vías de desarrollo, son las que más sufren estos percances.

Entre las enfermedades y problemas de salud que pueden originar los pesticidas se encuentran la disminución de la fertilidad, sintomatologías como neuropatía retardada [32, 33] aumento en el número de cánceres, malformaciones congénitas, y desregulación de las hormonas reproductivas (reducción significativa en los niveles de testosterona libre), reportada por Ayotte et al. (2001) y De Jager et al. (2006) [34, 35].

Otro de los problemas relacionados con el empleo de pesticida es que, en muchos casos, no permanecen en el lugar en el que se han depositado originalmente sino que, a veces, se trasladan a grandes distancias a través del agua, del suelo y del aire pudiendo afectar a diferentes ecosistemas, y organismos no objetivos como insectos beneficiosos como las abejas, arañas y entre otros.

Con el tiempo ha crecido la preocupación pública en cuanto al efecto tóxico de dichas sustancias, los residuos de plaguicidas en alimentos y en el medio ambiente (agua, suelo y aire), el que los trabajadores de campo y de la industria estén expuestos a dichos productos y la contaminación de los cuerpos de agua subterráneos. Esto ha llevado a generar directrices para el control y detección de sus residuos y metabolitos de plaguicidas, los cuales son más tóxicos y estables en algunos casos, que los pesticidas de los que derivan.

La OMS, en colaboración con la FAO, se encarga de evaluar los riesgos de los plaguicidas para el ser humano —ya sea por exposición directa o a través de los residuos presentes en los alimentos— y de recomendar medidas de protección adecuadas.

El órgano responsable de la evaluación de los residuos de plaguicidas en los alimentos es el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA), un grupo internacional e independiente de expertos científicos. En las evaluaciones se tiene en cuenta todos los datos presentados para solicitar el registro de plaguicidas en todos los países, así como todos los estudios científicos publicados en revistas arbitradas. Tras evaluar el nivel de riesgo, el JECFA establece límites para la ingesta sin riesgos de residuos de plaguicidas en los alimentos de modo que una persona pueda ingerirlos en el transcurso de su vida sin que su salud se vea perjudicada.

Los gobiernos y los organismos internacionales encargados de gestionar los riesgos, como la Comisión del Codex Alimentarius (un organismo internacional de normalización en la esfera de los alimentos) se basan en la ingesta diaria admisible para establecer los límites máximos de residuos de plaguicidas en los alimentos. Las normas del Codex son la referencia para el comercio internacional de productos alimenticios, de modo que los consumidores de todo el mundo tengan la seguridad de que los alimentos que ingieren cumplen los criterios convenidos de inocuidad y calidad, con independencia de su lugar de fabricación. El Codex ha establecido normas para más de 100 plaguicidas distintos.

La OMS y la FAO han elaborado conjuntamente el Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas. Este marco de carácter voluntario, cuya edición más reciente se publicó en 2014, guía a las autoridades gubernamentales de reglamentación, el sector privado, la sociedad civil y las demás partes interesadas sobre las mejores prácticas en el manejo de los plaguicidas durante su ciclo de vida, desde su producción a su eliminación [36].

2.2 BIOSENSORES

2.2.1 Conceptos Fundamentales

Los biosensores iniciaron su desarrollo y comercialización alrededor de los años 60, orientados a aplicaciones clínicas y de impacto bioquímico. El primero desarrollado fue un sensor enzimático para determinar la concentración de glucosa en sangre a través, de la reacción catalizada por la glucosa oxidasa. Este biosensor fue diseñado por Clark y Lyons en 1962, acoplando la glucosa oxidasa a un electrodo selectivo de oxígeno [37]. El término "biosensor" fue introducido por Cammann en 1977 [38], sin embargo, la definición de un biosensor por la IUPAC se introdujo recientemente desde 1999 hasta 2001[39].

Durante los últimos años, el desarrollo de biosensores ha sido uno de los campos de más rápida evolución en química por su gran impacto y precisión en análisis biomédicos, químicos e industriales, así como en el control del medio ambiente. Lo que ha llevado a un crecimiento vertiginoso de la investigación y desarrollo, generando miles de publicaciones cada año (figura 5) [40, 41]. Hoy en día, los biosensores representan un mercado en rápida expansión, donde el mayor impulso procede de la industria sanitaria. En el mercado global se espera que a finales del 2020 alcance la cifra de 21.5 millones de dólares y llegue hasta los 27 millones en el 2022 [42].

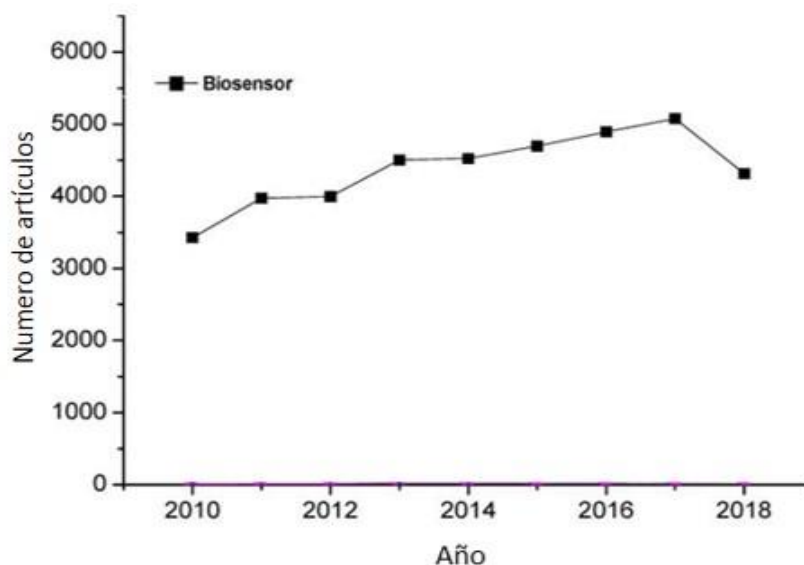


Figura 5. Números anuales de artículos de investigación publicados sobre biosensores [41].

Desde un punto de vista analítico, la tecnología de los biosensores permite el diseño de dispositivos de detección miniaturizados y portátiles, los cuales presentan una alta sensibilidad y un bajo límite de detección, combinado con la especificidad característica proporcionada por los sistemas de reconocimiento biológico.

De acuerdo a la IUPAC, un biosensor es un dispositivo analítico que incorpora un elemento de reconocimiento biológico, íntimamente asociado con un transductor fisicoquímico, que en presencia del analito produce una señal eléctrica discreta o de carácter continuo, proporcional a la cantidad presente del mismo [39]. Cabe destacar que las características fisicoquímicas del analito son las determinantes para la elección del material biológico/biomimético, mientras que el tipo de elemento de reconocimiento es el que determina el sistema transductor. La Figura 6 representa los elementos empleados generalmente en el diseño de un dispositivo biosensor.

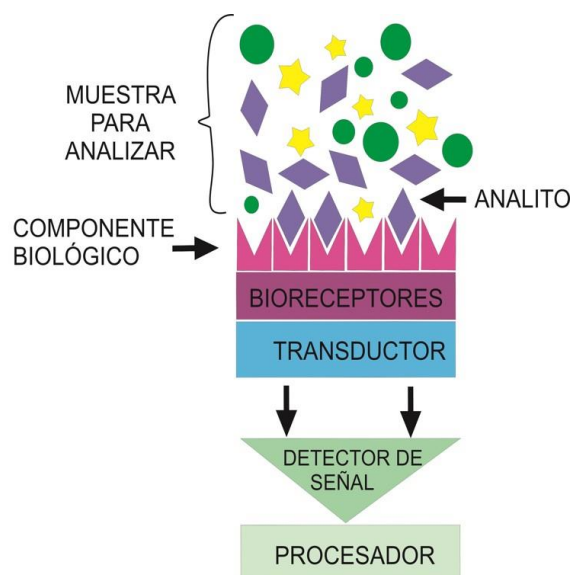


Figura 6. Estructura de un biosensor.

El principio de detección de un biosensor está basado en la interacción específica entre el analito de interés y el bioreceptor, una biomolécula que puede ser enzima, anticuerpo, ácido nucleico, hormona, orgánulo o célula completa. Mientras que el transductor garantiza la detección e interpretación de la variación de propiedades ópticas, fisicoquímicas, eléctricas, entre otras, obtenida de la interacción entre el analito y el dispositivo analítico. La singularidad de un biosensor es que los dos componentes están integrados en un único

componente, a través de la adsorción o la inmovilización del componente biológico sobre el transductor. Esta combinación permite la transducción directa del proceso de reconocimiento bioquímico en una señal eléctrica, que debe ser posteriormente amplificada, procesada y correlacionada con la concentración del analito diana en las muestras [43].

Los biosensores juegan un papel muy importante en todas las áreas de interés analítico, destacando las relacionadas con la alimentación, la salud, industria agroalimentaria, medioambiental, químico, farmacéutico y militar [44, 45]. En la industria agroalimentaria, las mayores áreas de aplicación de los biosensores son la seguridad y calidad alimentaria, y el control de procesos [46].

Las características más destacables que convierten a los biosensores en opciones altamente atractivas para competir en el mercado con otras tecnologías analíticas son [44, 47]:

- Alta especificidad
- Elevada sensibilidad
- Bajos tiempos de análisis
- Posibilidad de ser incluidos en sistemas integrados
- Facilidad de automatización
- Capacidad de trabajar en tiempo real
- Alta versatilidad, que permite el diseño de dispositivos a la carta, y
- Bajo coste

2.2.2 CLASIFICACIÓN DE LOS BIOSENSORES

Generalmente, los biosensores se clasifican en función del componente biológico utilizado, como enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos o células, o por el tipo de transductor, como el transductor electroquímico, óptico, basado en la masa o piezoeléctrico. Existe otro método de clasificación que se basa en el modo de interacciones entre los analitos y los materiales biológicos en un biosensor. Son de dos tipos: biosensor catalítico, en el que las

interacciones dan lugar a la formación de un nuevo producto de reacción bioquímica, y biosensor de afinidad, en el que las interacciones dan como resultado la unión del analito a la superficie del transductor.

2.2.2.1 CLASIFICACIÓN BASADA EN LA NATURALEZA DEL PROCESO BIOLÓGICO

a) Biosensores de afinidad

Los sensores de afinidad se basan en la interacción del analito de interés con el elemento de reconocimiento, sin que medie transformación catalítica. La interacción conlleva la modificación de un equilibrio en el que se forma un complejo analito-receptor. Para cuantificar la interacción, puede recurrirse a métodos directos, tipo sándwich, de desplazamiento y competitivos. Dado que en la interacción no se consumen sustratos ni se generan productos, como ocurre con los sensores catalíticos [48], en la mayor parte de este tipo de biosensores se recurre al marcaje del receptor implicado en la interacción o bien, al de un elemento que compita con el analito por la unión al receptor. Como marcadores se utilizan compuestos fluorescentes, nanopartículas o enzimas que intervengan en una reacción complementaria transducible, con la que se asocia el mecanismo de detección [49]. Los mecanismos de bioafinidad más comúnmente utilizados en la construcción de biosensores son los siguientes:

- Interacción antígeno-anticuerpo (Inmunosensores)
- Reconocimiento basado en ácidos nucleicos (Genosensores y aptasensores)
- Receptores artificiales (polímeros de impresión molecular (PIMs)).

b) Biosensores catalíticos

Como su nombre indica los sensores biocatalíticos se basan en la utilización de catalizadores biológicos que median en una reacción química, en la que intervienen uno o varios sustratos, para generar uno o varios productos. Finalizado el proceso, el biocatalizador se regenera y puede ser nuevamente reutilizado. Estos biocatalizadores pueden ser acoplados a transductores de tipo calorimétrico, potenciométrico, amperométrico, piezoeléctrico u optoeléctrico [50]. Pueden emplearse para detectar la presencia de alguno de los sustratos que participan en la reacción, bien cuantificando la desaparición de algún cosustrato o cofactor conocido, distinto de aquel que se quiere detectar o bien por la generación de algún producto conocido y determinable. También pueden utilizarse indirectamente para detectar compuestos que interfieren en la reacción de manera selectiva, inhibiendo las capacidades del biocatalizador cuya presencia puede cuantificarse a través del grado de inactivación de este. Se utilizan habitualmente cuatro tipos de biocatalizador:

- Las células enteras (microorganismos, como bacterias, hongos, células eucariotas o levaduras).
- Tejido (lámina de tejido animal o vegetal).
- ARN catalítico (ribozimas) y anticuerpos (abzimas).
- Enzima (mono o multi-enzima).

2.2.2.2 CLASIFICACIÓN BASADA EN EL BIORECEPTOR

Un bioreceptor es una especie molecular orgánica o un sistema biológico vivo que utiliza un mecanismo de reconocimiento bioquímico [51]. Estos elementos de reconocimiento biológico deberán cumplir con ciertos criterios fundamentales para poder ser empleadas como unidades sensoras. En primer lugar tienen que poseer afinidad hacia el elemento objeto del reconocimiento, que deberá ser suficientemente selectivo para reconocer a este elemento en presencia de otros compuestos y además, deberá permanecer estable a lo largo del tiempo [52]. Algunos de los tipos de bioreceptores que pueden inmovilizarse en la superficie de los biosensores se presentan en la figura 7.

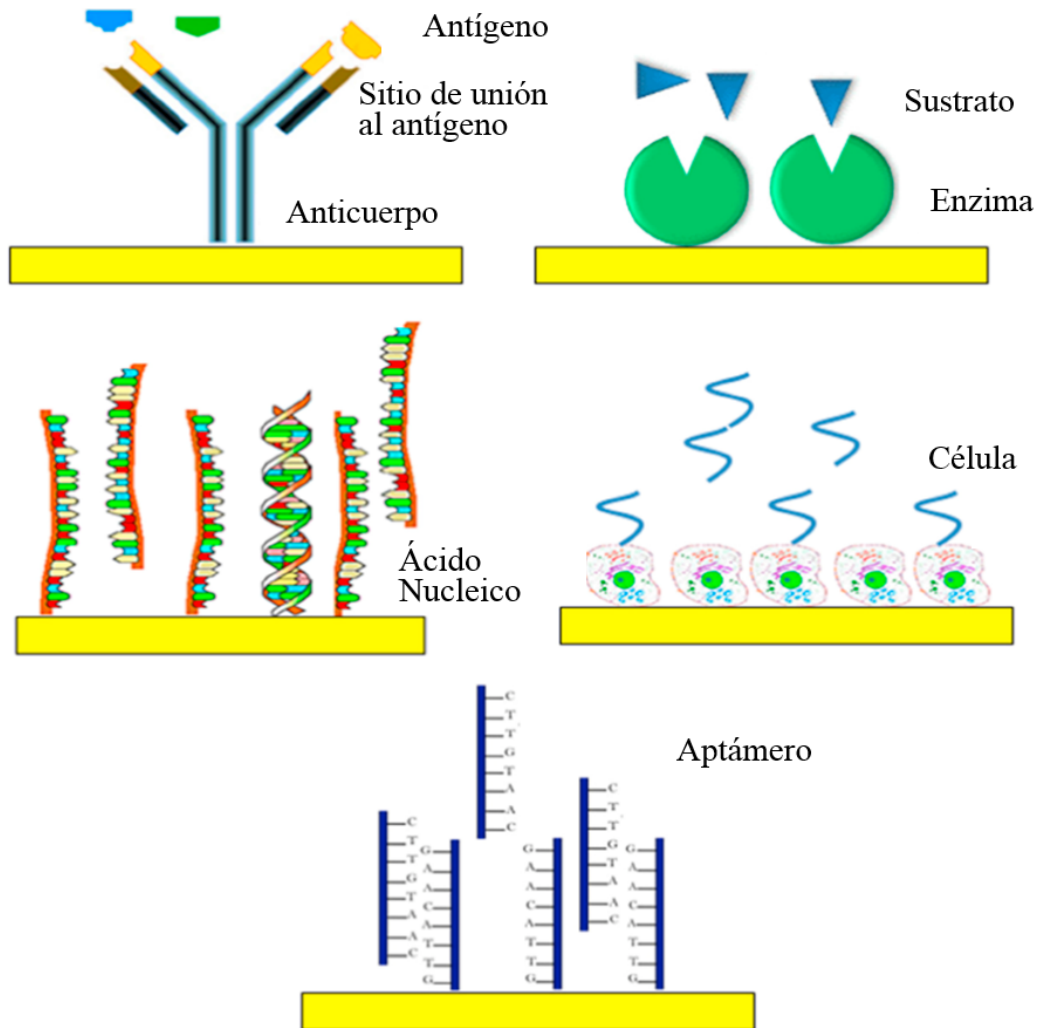


Figura 7. Los diferentes tipos de bioreceptores inmovilizados en las superficies de los biosensores [53].

- **Enzimas**

Las enzimas son los bioreceptores más empleados en biosensores, son proteínas naturales, que catalizan una molécula de sustrato específica en un producto sin ser consumidas en la reacción. Los biosensores basados en enzimas se basan principalmente en dos mecanismos de detección. El primer mecanismo implica la conversión catalítica de un analíto por la enzima (generalmente de una forma no detectable a una forma detectable). El segundo mecanismo implica la detección de analíto que inhiben o moderan la actividad de la enzima. Los biosensores enzimáticos utilizan enzimas específicas para la captura y producción catalítica del producto, que luego se determina directamente utilizando un

transductor (por ejemplo, electroquímico, óptico) [55]. El biosensor enzimático más común hoy en día es el biosensor para la detección de glucosa en sangre. No obstante, los biosensores basados en enzimas tienen una amplia variedad de aplicaciones, como en la detección de sustratos enzimáticos como glucosa, colesterol, urea, peróxido de hidrógeno, alcohol, como también en la detección de contaminantes ambientales (pesticidas y herbicidas como los organofosforados) [56], monitoreo de seguridad alimentaria [57], y monitoreo de bioprocesos industriales [58]. En la figura 8 se muestran los artículos publicados por año de los bioreceptores más utilizados en biosensores, entre los cuales se destacan las enzimas.

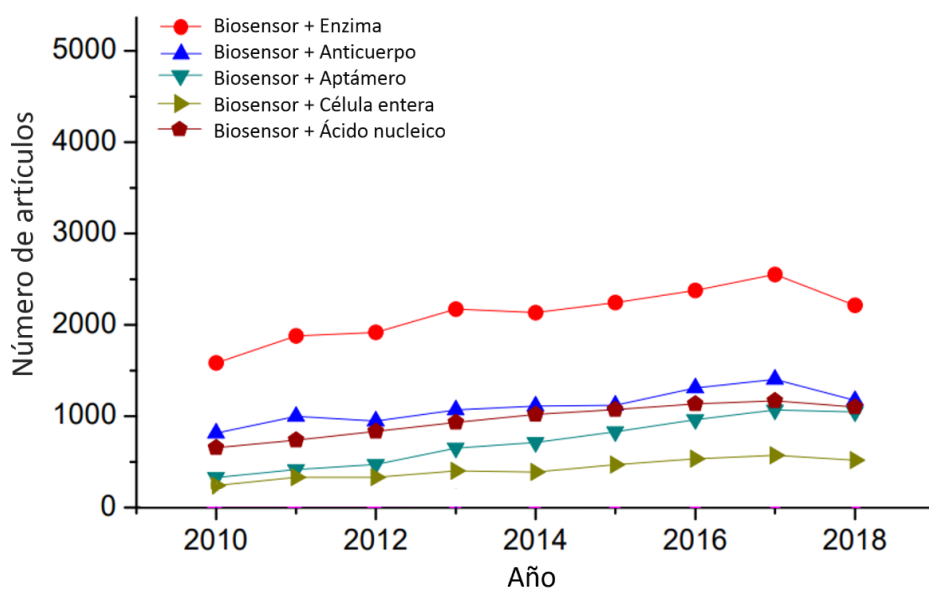


Figura 8. Tendencias de los números anuales de artículos publicados sobre biosensores basados en bioreceptores [41].

Con la excepción de un pequeño grupo de moléculas de ácido ribonucleico catalítico, todas las enzimas son proteínas globulares compuestas principalmente de los 20 aminoácidos de origen natural que catalizan reacciones bioquímicas. Estas pueden aumentar significativamente la velocidad de una reacción en comparación con una reacción no catalizada [59]. Algunas enzimas no requieren grupos químicos distintos de sus residuos de aminoácidos para su actividad. Otros requieren un componente adicional llamado cofactor, que puede ser uno o más iones inorgánicos o una molécula orgánica u organometálica más compleja llamada coenzima [40].

Las enzimas son altamente selectivas en comparación con las reacciones químicas y son bastante rápidas en comparación con otros receptores biológicos. Debido a sus estructuras

moleculares complejas, la disposición de los aminoácidos en el sitio activo de la enzima (a menudo localizado en el centro de la proteína) induce a que solo un sustrato específico se pueda unir haciendo a la biomolécula muy selectiva para un tipo de molécula de sustrato, (de manera similar a una llave que se ajusta a un candado) mostrando una selectividad exquisita por esta (figura 9) [60], lo que permite que se pueda detectar de forma muy selectiva sustancias individuales en mezclas complejas. Esto elimina la necesidad de realizar etapas que consumen tiempo y necesiten mano de obra especializada, tales como las de pretratamiento de la muestra y de separación de interferencias, normalmente necesarias en este tipo de muestras complejas [54].

Existen diferentes tipos de enzimas, clasificados según el tipo de reacción que llevan a cabo:

- **Transferasas**, catalizan la transferencia de un grupo químico de un sustrato a otro.
- **Hidrolasas**, catalizan reacciones de hidrólisis.
- **Liasas**, catalizan adiciones de grupos a dobles enlaces o formaciones de dobles enlaces por eliminación de grupos.
- **Isomerasas**, catalizan la interconversión de isómeros.
- **Ligasas**, catalizan la formación de enlaces C-C, C-S, C-O y C-N por reacciones de condensación acopladas a la hidrólisis de ATP (trifosfato de adenosina).
- **Oxidoreductasas**, catalizan reacciones de óxido-reducción, es decir, transferencia de hidrógeno o electrones de un sustrato a otro. Debido a esta capacidad redox, son el candidato ideal para su utilización como bioreceptores en biosensores amperométricos.

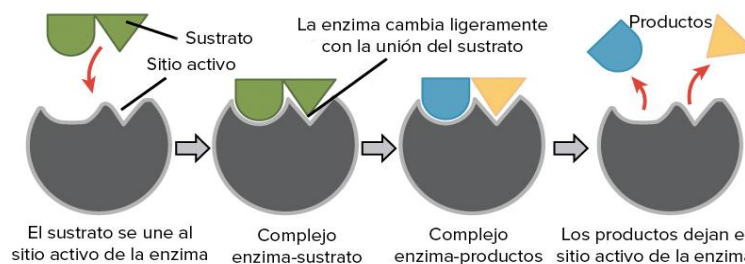


Figura 9. Representación esquemática de una reacción enzimática catalizada [60].

Una de las grandes ventajas de la utilización de enzimas, a parte de su alta selectividad, es su menor tiempo de respuesta en relación con los otros tipos de bioreceptores. Como

inconvenientes, se debe tener en cuenta que pierden actividad al ser inmovilizadas sobre la superficie del electrodo y tienen un tiempo de vida relativamente corto.

▪ **Inmunosensor (Antígeno-anticuerpo)**

Los anticuerpos son bioreceptores comúnmente utilizados en el desarrollo de biosensores. Los anticuerpos corresponden a un solo antígeno de una manera altamente específica. Los inmunoensayos son las técnicas analíticas más específicas, proporcionan límites de detección extremadamente bajos y pueden utilizarse para una amplia gama de sustancias. Tales ensayos se vuelven extremadamente útiles para identificar y cuantificar las proteínas [61]. Los inmunosensores basados en anticuerpos a menudo se describen en combinación con elementos transductores piezoeléctricos, electroquímicos u ópticos.

Los anticuerpos empleados en el desarrollo de inmunosensores son de dos tipos: policlonales y monoclonales. Debido a su especificidad, los anticuerpos monoclonales son excelentes como el anticuerpo primario en un inmunoensayo, o para detectar antígenos específicos en presencia de moléculas interferentes, y dan significativamente menos tinción de fondo que los anticuerpos policlonales [40].

▪ **Biosensores basado en ácidos nucleicos**

- **Aptámero (Aptasensor)**

Los biosensores que emplean aptámeros como un elemento de reconocimiento se llaman aptasensores. Los aptámeros son oligonucleótidos monocatenarios tales como ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN) o moléculas peptídicas que se pliegan en una estructura tridimensional compleja y se unen con una alta afinidad y especificidad a uno de sus objetivos [62]. Los aptámeros se sintetizan químicamente mediante una técnica denominada SELEX (Evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial), es una tecnología integrada basada en química combinatoria, PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y secuenciación de genes [63]. Los aptámeros son adecuados para el reconocimiento de moléculas pequeñas además de compuestos de alto peso molecular

e incluso células completas. Se consideran un biomaterial en el diagnóstico médico, pruebas de toxicidad ambiental, bioimagen, administración de fármacos y terapia, etc [64].

-Ácido Nucleico (Genosensor)

Los biosensores de ADN basados en procesos de reconocimiento de ácidos nucleicos se están desarrollando rápidamente hacia el objetivo de realizar pruebas rápidas y económicas de enfermedades genéticas e infecciosas. Un genosensor es un biosensor que puede detectar los nucleótidos individuales que comprenden una molécula de genoma (ADN). Los genosensores automatizados permiten una secuenciación rápida y no destructiva de las moléculas de ADN. Son dispositivos que combinan, como agente de reconocimiento biológico, un ADN monocatenario llamado sonda de ADN, con un transductor [65]. La selectividad de este dispositivo se debe al primero, mientras que su sensibilidad la proporciona el segundo. Los genosensores utilizan el evento de hibridación para detectar una secuencia de ADN objetivo. Entre los diferentes tipos de genosensores, según la técnica empleada para la transducción, se pueden distinguir tres clases principales: óptica, piezoeléctrica y electroquímica [66]. Entre los diversos métodos para la detección de ADN, las técnicas electroquímicas ofrecen grandes ventajas con simplicidad, rapidez, costo relativamente bajo y alta sensibilidad, y son adecuados para el desarrollo de dispositivos portátiles y económicos.

▪ Polímeros de impresión molecular

Los polímeros de impresión molecular (MIPs) son un enfoque sintético para reconocer moléculas biológicas como contaminantes, organofosforados, aminoácidos, fármacos, etc [67]. Los MIPs se producen formando un polímero alrededor de una molécula que se puede usar como plantilla y que corresponde a la molécula diana del bioreceptor. Se forman varias microcavidades dentro de las MIPs, de las cuales algunas son sitios de enlace específicos para el analito de plantilla. Los MIPs pueden, en principio, sintetizarse para cualquier molécula [68]. El sitio de reconocimiento de la molécula diana, formado en la cavidad de la MIP, se libera al eliminar la molécula de impronta [69].

▪ Biosensores de células enteras

Los biosensores celulares utilizan la respuesta de células completas para la detección de agentes biológicamente activos. Un biosensor microbiano consiste en un transductor en asociación con células microbianas inmovilizadas viables o no viables [70]. En los biosensores microbianos, el analíto entra en la célula y se convierte utilizando las enzimas intracelulares. Como resultado, los cosustratos se consumen y se generan los productos de reacción que también podrían ser electroquímicamente activos. El registro del nivel de oxígeno, la composición iónica media y otros parámetros en la capa de células inmovilizadas se pueden utilizar como indicadores del estado metabólico de las células y el fondo para la determinación electroquímica de compuestos biológicamente activos.

Actualmente, también se utilizan diferentes especies microbianas que contienen genes informadores que son inducidas específicamente por promotores seleccionados en el desarrollo de biosensores celulares. En presencia del analíto objetivo, el gen inducible se activa y activa o reprime la expresión de un gen indicador que es responsable de producir una señal óptica medible. Por lo tanto, los biosensores celulares microbianos basados en la detección óptica son particularmente útiles en el cribado de alto rendimiento porque pueden usarse para monitorear múltiples analítos al mismo tiempo [55]. Los biosensores microbianos se han convertido en uno de los medios más útiles para monitorear muestras ambientales, de alimentos y clínicas.

2.2.2.2.1 Inmovilización de bioreceptores en superficies de interacción

El objetivo de la inmovilización es favorecer un contacto íntimo entre el bioreceptor y el transductor de manera que se mantenga inalterable, en la medida de lo posible, la estabilidad y la actividad biológica de dicho sistema de reconocimiento [52]. De este modo, los tiempos de vida útil y almacenamiento del biosensor se verán prolongados. Los métodos de inmovilización utilizados se pueden diferenciar entre físicos y químicos: La selección del método de inmovilización depende de la naturaleza del elemento biológico, el tipo de sistema transductor a utilizar, las propiedades fisicoquímicas del analíto y las condiciones de trabajo del biosensor. Así, el grado de estabilidad obtenido en la inmovilización determina la

sensibilidad y la fiabilidad de la señal del biosensor [71]. En la tabla 1, se presentan las ventajas y desventajas de diferentes técnicas de inmovilización de bioreceptores en superficies.

Tabla 1. *Tabla 1. Las diferentes técnicas de inmovilización de bioreceptores en superficies [40].*

	Principio	Ventajas	Inconvenientes
Adsorción	Las fuerzas de van der Waals	Sencillez, sin desnaturalización del bioreceptor.	Inestabilidad (pH, fuerza iónica, temperatura, solvente)
Inclusión	Inmovilización física en una matriz de polímero (por ejemplo, poliacrilamida)	Actividad enzimática conservada (sin enlaces químicos)	Riesgo de desnaturalización de los bioreceptores. Puede impedir la accesibilidad del sitio activo del bioreceptor.
Atrapamiento	En solución detrás de una membrana selectiva (p. Ej. Membrana de diálisis)	Biodegradación o contaminación limitada.	Complejo de implementar. Puede impedir la accesibilidad del sitio activo de bioreceptor
Inmovilización covalente	Acoplamiento covalente (medio pre-activado)	Alta estabilidad. Restricciones difusionales reducidas	Riesgo de desnaturalización de bioreceptores. Técnica laboriosa.
Inmovilización por reticulación	Fabricación de membranas insolubles en agua que se adsorben sobre una superficie sólida	Estabilidad (difícil liberación del ligando)	Riesgo de alteración de la cinética enzimática (problemas de difusión en la membrana) Riesgo de desnaturalización de los bioreceptores
Inmovilización por afinidad	Afinidad entre dos moléculas (por ejemplo, estreptavidina / biotina (Kd ~ 10 ⁻¹⁵ M), casi tanto como un enlace covalente)	Estabilidad. Condiciones de regeneración más drásticas. La misma orientación para todos los bioreceptores	Interferencia potencial entre el bioreceptor modificado y componentes naturales (por ejemplo, biotina que se encuentra naturalmente en ciertos tejidos). Interferencia potencial entre la molécula de unión y componentes naturales.

2.2.2.3 CLASIFICACIÓN BASADA EN EL FUNDAMENTO DEL TRANSDUCTOR

Una amplia variedad de métodos de transducción se han desarrollado en la última década. Si bien se están desarrollando constantemente nuevos tipos de transductores, los transductores electroquímicos, ópticos y basados en masa son los métodos biosensores más populares y comunes para la detección de contaminantes de alimentos, contaminantes ambientales (figura 10). Cada una de estas tres clases principales contiene muchas subclases diferentes [40].

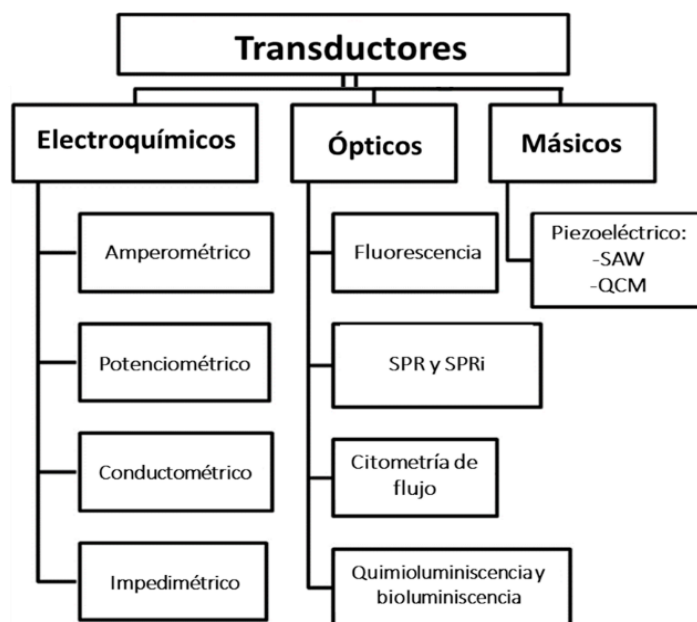


Figura 10. Clases y subclases de biosensores, en relación con el tipo de transductor. Las tres categorías de transductores se pueden dividir en varias subclases [40].

▪ Biosensores Ópticos

En la forma más comúnmente utilizada de un biosensor óptico el proceso de transducción se basan en la medición de las variaciones que se producen en las propiedades de una radiación electromagnética, como consecuencia de la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento del biosensor. Dicha interacción puede inducir cambios en las características de absorción, emisión, dispersión, polarización, refracción o reflexión de la radiación, cuando ésta incide sobre la superficie donde se encuentra el elemento de reconocimiento. Se utilizan tanto métodos de detección directa como métodos de detección indirecta, en la que es necesario utilizar marcadores, adaptándose igualmente a sistemas

biocatalíticos como de bioafinidad. La detección basada en la óptica ofrece un gran número de subclases basadas en los diferentes principios ópticos que se describen a continuación (figura 11) [72].

Fluorescencia	Medición de la emisión de luz por una sustancia que ha absorbido la luz u otra radiación electromagnética
TR-FIA^a	La medición de la emisión de luz por los quelatos de lantánido intrínsecamente fluorescentes
FCIA^b	La medición de la dispersión de la luz y la señal fluorescente generada cuando la partícula o célula pasa a través del haz de luz (por ejemplo, un láser)
SPR^c	Medición de cambios en el índice de refracción, en la superficie
SPRi^d	Medición de cambios en el índice de refracción, en una superficie, en el espacio
DOT^e	Medición de cambios en la difracción de la luz
Quimioluminiscencia	Medición de la quimioluminiscencia, a partir de una reacción química catalizada por una enzima
Bioluminiscencia	Medición del cambio en la luminiscencia emitida por microorganismos vivos

Figura 11. Los diferentes tipos de transductores ópticos. Los transductores ópticos se pueden dividir en un gran número de subclases basadas en diferentes principios ópticos. a) TR-FIA: Fluoroimmunoensayo de resolución temporal; b) FCIA: inmunoensayo citométrico de flujo; c) SPR: resonancia de plasmón superficial; d) SPRi: imágenes de resonancia de plasmón superficial; e) DOT: tecnología de óptica difractiva [40].

▪ Biosensores Másicos

Bajo esta denominación se incluyen biosensores con sistemas de transducción que detectan pequeños cambios de masa producidos sobre la superficie sensora, debidos a la interacción analíto-sistema de reconocimiento. Los biosensores sensibles a la masa también se denominan biosensores gravimétricos, piezoeléctricos o acústicos. Los métodos de transducción mecánica se basan principalmente en la generación y detección de ondas mecánicas o acústicas. Los dispositivos sensibles a la masa más comunes utilizan cristales piezoeléctricos, microbalanzas de cristal de cuarzo (QCM) y ondas acústicas de superficie (SAW) [73]. La piezoelectricidad es la carga eléctrica que se acumula en ciertos materiales sólidos (notablemente cristales, cerámicas y algunos materiales orgánicos como el hueso, el

ADN y varias proteínas) en respuesta a la presión (cambio de masa en el área). Los transductores de onda acústica se clasifican según el modo de propagación de la onda a través o sobre la superficie del material piezoeléctrico. La microbalanza de cristal de cuarzo o QCM es, con mucho, el biosensor sensible a la masa más popular. Es una herramienta de referencia para la detección de biomoléculas sin etiquetado [74]. Los transductores mecánicos de onda se llaman voladizos. Un voladizo es una viga anclada en un solo extremo. El cambio en la masa al final del haz es detectado por un fenómeno óptico (amplitud de oscilación) [75]. Los biosensores en voladizo son sensores electromecánicos ultra sensibles que se utilizan para la detección sin etiquetas de un gran número de entidades biológicas.

Las limitaciones de esta tecnología son la falta de selectividad y las interferencias producidas cuando se usa en un medio líquido. A pesar de ello, son numerosas las publicaciones existentes que utilizan este principio, dado que permite el análisis directo y prescinde de la utilización de marcadores adicionales.

▪ **Biosensores Electroquímicos**

Estos biosensores se basan en la interacción selectiva entre el compuesto objetivo y el elemento de reconocimiento para generar una señal eléctrica relacionada con la concentración del compuesto que se está estudiando [76]. Los biosensores con transducción electroquímica se destacan por sus importantes características [77]:

- La naturaleza interfacial de las medidas electroquímicas hace que sea posible monitorizar fácilmente volúmenes pequeños de muestra. Esto hace que los biosensores electroquímicos sean especialmente adecuados para la monitorización “in vivo”.
- La señal obtenida es eléctrica, y por tanto es viable la transducción directa de la velocidad de la reacción en la señal de lectura.
- Los límites de detección que se obtienen, normalmente entre 10^{-9} y 10^{-6} M, son suficientes y adecuados para la determinación de numerosos análisis de interés.
- La relativa simplicidad y el bajo coste de la instrumentación electroquímica permiten una fácil disponibilidad de estos dispositivos.

-
- Sin embargo, los sensores electroquímicos tienen dos principales inconvenientes:
 - Su selectividad es relativamente baja, si bien este inconveniente puede minimizarse drásticamente utilizando un sistema de reconocimiento biológico que posea una alta selectividad para ciertos analitos.
 - Es necesario emplear un electrodo de referencia que mantenga constante el potencial durante el transcurso de la medida a lo largo de un amplio período de tiempo.

Los biosensores electroquímicos se pueden clasificar según el tipo de medición empleado en:

- a) **Biosensores Potenciométricos:** Determinan cambios de potencial asociados al proceso de reconocimiento. Generalmente, en las mediciones potenciométricas se emplean electrodos selectivos de iones.
- b) **Biosensores Conductimétricos:** Detectan cambios en la corriente de la muestra.
- c) **Biosensores Impedimétricos:** Basados en medidas de impedancia sobre la superficie del electrodo.
- d) **Biosensores Amperométricos:** Determinan cambios de corrientes eléctricas asociadas a procesos redox involucrados en el proceso de reconocimiento.

En el contexto de los biosensores electroquímicos, los más empleados son los biosensores amperométricos [78]. En los que la señal medida es la corriente, que se produce por la oxidación o reducción de especies electroactivas en el electrodo de trabajo (es decir, oro, carbono, platino, etc.). La magnitud de la corriente, que se produce en la superficie del electrodo de trabajo, es proporcional a la concentración de los analitos presentes en la solución de prueba, al agregar el sustrato, y se controla cuando se aplica un potencial fijo entre los dos electrodos.

- **Biosensores enzimáticos amperométricos**

Los biosensores amperométricos basados en enzimas han sido ampliamente estudiados, debido a ventajas como la facilidad de miniaturización, la solidez y la capacidad de operar

con pequeños volúmenes de muestra de matrices bastante complejas [78]. Los biosensores amperométricos enzimáticos se han desarrollado a lo largo de tres generaciones, de acuerdo con los métodos de transferencia de electrones que se han utilizado para medir la reacción bioquímica [79]. Hoy en día, varios tipos de biosensores amperométricos comerciales basados en enzimas son accesibles para medir glucosa, lactato, alcohol, etc., mediante el uso de oxidasas (es decir, glucosa oxidasa, lactato oxidasa, alcohol oxidasa, etc.) que oxidan sus sustratos produciendo peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que es detectado por el electrodo.

Cuando se preparan biosensores enzimáticos amperométricos es importante determinar la sensibilidad de la enzima a las condiciones experimentales tales como el pH, la temperatura, y la agitación. Deben ser también considerados otros parámetros tales como el origen y la disponibilidad de la enzima, su estabilidad operacional y de almacenamiento, así como el procedimiento de inmovilización y las características del soporte (superficie del electrodo).

La Figura 12 muestra una representación esquemática de estos diferentes enfoques en el desarrollo de biosensores amperométricos basados en enzimas. En un biosensor de primera generación, la enzima se inmoviliza sobre una superficie del transductor y el sustrato analíto se supervisa a través de la medición del producto enzimático (es decir, H_2O_2 , NADH, etc.) o en el monitoreo del consumo del cofactor, como el oxígeno [80, 81]. Para eliminar la dependencia del oxígeno, los biosensores de segunda generación utilizan un mediador (aceptor de electrones), en lugar de oxígeno, para transportar los electrones al electrodo. El mediador son pequeñas moléculas activas redox (es decir, derivados del ferroceno, ferrocianuro, sales orgánicas conductoras y quinonas) que reaccionan con el sitio activo de la enzima, y luego con la superficie del electrodo, transfiriendo electrones para producir una señal de corriente que es proporcional a la concentración de analíto detectada. En este principio, el mediador se reduce por el electrón generado a partir de la reacción enzimática, y luego finalmente se oxida en el electrodo, lo que resulta en la transferencia de electrones al electrodo [82, 83]. En los biosensores de tercera generación, la transferencia de electrones entre la enzima y el electrodo se produce de manera directa sin mediadores o sustratos durante la transformación catalítica del sustrato al producto. La enzima redox desempeña un papel

como electrocatalizador que facilita la transferencia de electrones entre el electrodo y la molécula de sustrato [84]. Para mejorar la eficiencia de la transferencia de electrones, los complejos de transferencia de carga como el tetratíafulvaleno-tetracianoquinodimetano a menudo se usan [85].

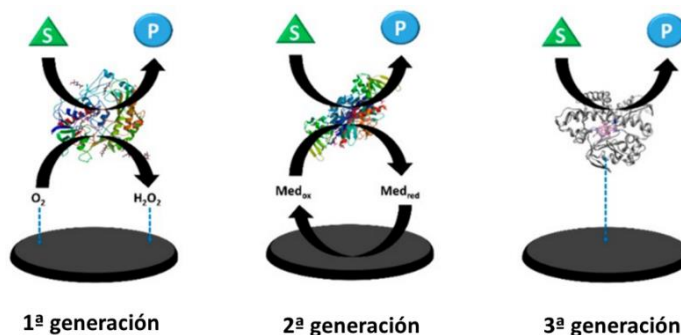


Figura 12. Ilustración de biosensores enzimáticos amperométricos de primera, segunda y tercera generación [80].

2.2.3 Electrodo funcionalizado con nanomateriales

De acuerdo con la Organización Internacional de Normalización (ISO), el prefijo *nano* hace referencia a un tamaño que varía aproximadamente entre 1 nm y 100 nm [86]. En este sentido, *los nanomateriales son aquellos materiales en los cuales al menos una de sus dimensiones se encuentra en la escala nanométrica*. En este rango, los nanomateriales muestran unas propiedades mejoradas con respecto a las que tiene la materia a escala macroscópica, lo que permite su empleo en nuevas aplicaciones [87]. Los nanomateriales, pilares fundamentales de la nanotecnología, se pueden clasificar en cuatro categorías (0D, 1D, 2D y 3D) de acuerdo a sus dimensiones. Estos nuevos materiales pueden prepararse con una gran diversidad de composición y morfologías en forma de nanopartículas, nanopólvos, nanotubos, nanocápsulas, nanocontenedores porosos, nanohilos o brochas, etc.

En los últimos años, la sensibilidad y otros atributos de los biosensores electroquímicos se están enriqueciendo mediante el uso de la nanotecnología. Los materiales de tamaño nanométrico mejoraron en gran medida los factores de rendimiento (sensibilidad, tiempo de respuesta, límite de detección, etc.) de los biosensores electroquímicos [88]. En la Figura 13

se representan diversos nanomateriales comúnmente empleados en la tecnología de los biosensores electroquímicos.

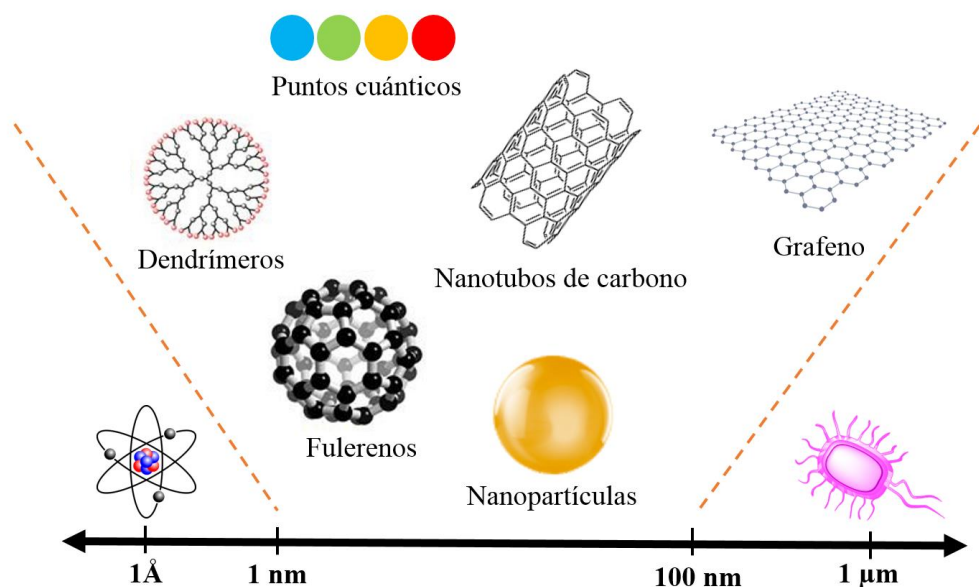


Figura 13. Nanomateriales comúnmente empleados en la tecnología de biosensores.

Un nanomaterial ideal deberá cumplir con una gama de propiedades fundamentales como: facilidad de preparación, disponibilidad, abundancia de grupos funcionales y estabilidad química para su uso como matriz adecuada en la fabricación de biosensores. El uso de estos materiales de tamaño nanométrico se han empleado extensamente en la modificación de electrodos para la construcción de biosensores [89, 90]. El empleo fundamental de los nanomateriales en los biosensores electroquímicos se basa en su función como elementos: i) de transducción o plataforma para la inmovilización de biomoléculas; ii) de amplificación de la señal electroquímica o iii) de etiquetado para la señalización [91].

Esta Tesis Doctoral ha centrado la atención en el desarrollado de nuevas estrategias para la preparación de superficies electródicas nanoestructuradas como elementos de transducción para la construcción de nuevos biosensores electroquímicos con un rendimiento bioanalítico mejorado y de mayor robustez. En la Figura 14, se representan las partes básicas que constituyen un biosensor electroquímico nanoestructurado.

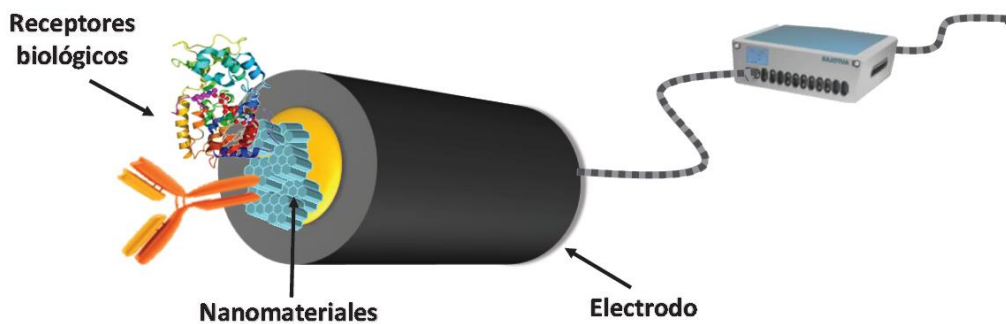


Figura 14. Esquema básico de un biosensor nanoestructurado [92].

El diseño de nuevos materiales nanoestructurados y electroconductores, sobre los cuales sea factible la inmovilización eficiente y específica de biomoléculas de utilidad e interés analítico, constituye una de las tendencias científicas actuales orientadas a la construcción de biosensores más sensibles, versátiles y robusto [92]. Esto se debe a las características únicas que presentan estos materiales, como son su elevada relación entre área superficial y volumen, la creación de microentornos estables y favorables para el mantenimiento de la estructura biológicamente activa de las biomoléculas analíticas, y la posibilidad de reducir los límites de detección analítica al poseer mayores relaciones entre las corrientes farádicas y capacitivas que aquellos electrodos no nanoestructurados. Asimismo, estos nanomateriales abren la posibilidad de realizar diseños específicos encaminados a la continua miniaturización y especialización de los sistemas biosensores [93, 94, 95].

Las estrategias empleadas para la preparación de electrodos funcionalizados con nanomateriales pueden clasificarse en dos grandes grupos [96]:

1. Inclusión del nanomaterial dentro de la matriz electródica.
2. Modificación de la superficie del electrodo con el nanomaterial.

Aunque la primera de estas metodologías destaca por su sencillez y reproducibilidad, es la nanoestructuración superficial de los electrodos la que proporciona una mayor versatilidad para el diseño de biosensores de arquitectura predefinida, ya que permite, entre otras mejoras:

-
- Reducir los tiempos de respuesta analítica, debido a la aceleración que se produce de los procesos de transferencia electrónica entre los electrodos y las moléculas objeto del análisis.
 - Reducir los límites de detección analítica, debido a que funcionan como ensamblados de nanoelectrodos y, por tanto, poseen una relación mayor entre la corriente farádica y capacitiva que los electrodos no nanoestructurados.
 - Disminución del valor del potencial de medida en los casos en que la estructura superficial de los nanomateriales contribuye a catalizar los procesos bioelectroquímicos que ocurren sobre los electrodos.
 - Aumentar la estabilidad de los biosensores, ya que los nanoensamblajes tridimensionales sobre la superficie de los electrodos crean microentornos estables y favorables para el mantenimiento de la estructura biológicamente activa de las biomoléculas.
 - Diseñar una gran variedad de arquitecturas sobre los electrodos, ya que los nanomateriales pueden actuar como unidades de ensamblaje supramolecular con propiedades funcionales únicas [97, 98].

El desarrollo de metodologías para la nanoestructuración de las superficies de los electrodos con tal propósito debe considerar los siguientes puntos: i) el tipo de superficie a modificar; ii) el nanomaterial que se utiliza; iii) otros compuestos o materiales que podrían ser también empleados; iv) el método físico o químico para la modificación de la superficie, v) la biomolécula a inmovilizar y el método para hacerlo; y vi) la reacción electroquímica que tiene lugar en la superficie del electrodo funcionalizado [99].

Estas estrategias deben proporcionar interfaces eléctricas con nano- o micro-topología tridimensional que permita la inmovilización estable de las biomoléculas sin afectar su función biológica, favoreciendo además la generación rápida y eficiente de los procesos electroquímicos que participan en la reacción analítica sobre tales interfaces [77].

Un gran número y diversidad de nanomateriales han sido empleados como elementos de transducción para la construcción de electrodos nanoestructurados con fines bioanalíticos. Entre los más destacados deben citarse las nanopartículas metálicas (fundamentalmente de oro), los nanotubos de carbono, el grafeno y diversas nanoestructuras de óxidos metálicos [97].

2.2.3.1 Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono llamados anteriormente nanocables fullerénicos o fullerenos cilíndricos [100], son cilindros compuestos de anillos hexagonales de carbono con hibridación sp^2 . Los CNTs se pueden dividir en nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT) y nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNTs), como se muestra en la Figura 15 a y b respectivamente. En general, el SWCNT es un nanomaterial molecular único, que se forma solo de una capa que enrolla una sola hoja de grafito (grafeno) en un cilindro molecular sin costura, su distribución de diámetro y longitud están en el rango de 0.75-3 nm y 1-50. μm respectivamente. Mientras que el MWCNT está compuesto por más de dos capas de lámina de grafito rizado, su diámetro está en el rango de 2 a 30 nm y algunas incluso más de 100 nm (Figura 15 b), la distancia entre cada capa es aproximadamente 0.42 nm [101].

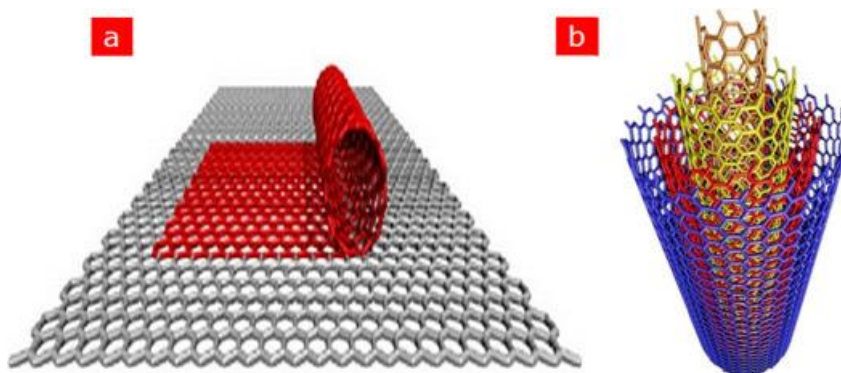


Figura 15. (a) Esquemas de SWCNTs que se componen de una sola capa de grafito rizado. (b) Esquemas de MWCNTs [60].

Desde su descubrimiento en 1991 por Iijima [102], los CNTs se han convertido rápidamente en una actividad de investigación global debido a su gran área de superficie específica y sus excelentes propiedades eléctricas, mecánicas y electroquímicas.

Actualmente, existe una multitud de biosensores electroquímicos en los que se emplean SWCNT y MWCNT para la modificación electródica [103]. La alta relación superficie-volumen de la CNTs hace posible obtener una detección muy rápida de especies biológicas en bajas concentraciones. Por lo tanto, los biosensores basados en CNTs son reconocidos como un bloque de construcción para sistemas de biosensores ultra-sensibles.

En comparación con la mayoría de los sensores disponibles en el mercado, basados generalmente en óxidos metálicos, silicio y otros materiales, los biosensores basados en CNTs tienen las siguientes grandes ventajas: (i) alta sensibilidad, debido a la gran relación de área de superficie y tubería hueca, los CNTs se puede utilizar para inmovilizar enzimas [104] que mantienen alta actividad biológica; (ii) tiempo de respuesta rápido, los CNTs tienen una capacidad excepcional para mediar cinéticas de transferencia de electrones rápidas, por lo tanto, promueven las reacciones de transferencia de electrones como NADH y peróxido de hidrógeno [105]; (iii) menor potencial de reacción redox y menos efectos de ensuciamiento de la superficie; (iv) gran estabilidad y vida útil más larga. Estas características mejoradas han estimulado el creciente interés de la investigación en las aplicaciones de los CNTs como componentes para biosensores.

Sin embargo, uno de los mayores problemas del uso de los nanotubos de carbono para la fabricación de biosensores electroquímicos es su escasa solubilidad en disolventes acuosos y orgánicos. Esto se debe a que su elevada área superficial, con enlaces π continuos, les confiere una gran tendencia a aglomerarse, formando “manojos” (bundles) de nanotubos que interaccionan a través de fuerzas de Van der Waals [106]. Recientemente, la preparación de nanotubos de carbono funcionalizados ha recibido una considerable atención. Los procedimientos que se utilizan alteran la energía superficial de este material y de este modo mejoran su compatibilidad con el disolvente, reduciendo su tendencia a formar aglomerados [107]. Pero además, la funcionalización de los CNTs con grupos como aminas o carboxilos mejoran su biocompatibilidad para la unión de los elementos de reconocimiento biológico, y también aumentan la tasa de electrones a transferir [108].

2.2.3.2 Nanopartículas cerámicas

Las cerámicas inorgánicas muestran una resistencia mecánica relativamente alta, estabilidad térmica mejorada e hinchamiento insignificante tanto en soluciones acuosas como orgánicas, en comparación con la mayoría de los polímeros orgánicos [109]. Los nanomateriales cerámicos han sido utilizados en algunos diseños para la construcción de biosensores [110, 111, 112]. Las propiedades más importantes que poseen para este cometido son su excelente biocompatibilidad y no toxicidad [113].

- Nanopartículas de óxido de zirconio

La zirconita pura existe en tres fases polimórficas a diferentes temperaturas: estructura cúbica a altas temperaturas $>2370\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una estructura tetragonal a temperaturas intermedias (1150 y $2370\text{ }^{\circ}\text{C}$). Sin embargo, una estructura monoclinica de ZrO_2 es estable a temperaturas moderadas, específicamente a temperatura ambiente, porque forma un fuerte enlace covalente (Zr-O) y forma ZrO_2 monoclinica [114,115].

Particularmente, el óxido de zirconio presenta buenas propiedades catalíticas, conductoras, refractarias, mecánicas y de resistencia a la corrosión [116, 117]. Las nanopartículas de óxido de zirconio presentan propiedades mejoradas en cuanto a: baja conductividad térmica, transparencia en el rango visible, alto índice de refracción, resistencia al rayado, resistencia mecánica, propiedades mejoradas de lubricación, aumento de la resistencia al ataque químico, aumento de la resistencia a la oxidación y al envejecimiento.

Las ZrO_2NPs son un material ideal para la inmovilización de biomoléculas con grupos de oxígeno [118], es decir, enzimas [119], ADN [120], anticuerpos [121], etc. y poseen un punto isoelectrico significativamente alto (~ 9.5) que ayuda a aumentar las interacciones con las biomoléculas deseadas con puntos isoelectricos bajos ($\sim 4-5$) a través, de las interacciones electrostáticas. Además, gracias a que carecen de toxicidad debido a su excelente inercia química, estabilidad térmica y estabilidad al pH, desempeñan un papel importante en recubrimientos ópticos, dieléctricos, resistentes a la corrosión y aplicaciones de sensores

[122,123]. Por lo tanto, las ZrO₂NPs se han convertido en un candidato ideal de materiales para inmovilización de biomoléculas para la fabricación de biosensores [124].

- **Nanopartículas de Hidroxiapatita**

La hidroxiapatita, [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂] es un biocerámico análogo al componente mineral del hueso y dientes humanos [125]. Este fosfato de calcio, que se puede obtener de forma sintética, se ha aplicado ampliamente en implantes biomédicos, regeneración ósea, administración de fármacos y separación de proteínas debido a su excelente biocompatibilidad, bioactividad y sitios de multi-adsorción [126]. La buena estabilidad mecánica, biodegradación lenta y naturaleza no tóxica, son otras de las características atractivas de la HA y que han impulsado su aplicación en los biosensores en los últimos años [127]. Hasta ahora, los biosensores basados en HA son muy pocos en número [128].

Estudios recientes han demostrado que las nanopartículas de HA pueden usarse para la preparación de sensores [129], y la inmovilización de enzimas [130]. Debido a su alta porosidad (del orden de cientos de micras) y sorprendente capacidad de absorción, basada en interacciones de grupos funcionales, electrostáticos, formación de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de proteína y el Ca (II) y los fosfatos en la superficie de HA [131]. Sin embargo, la tendencia a la agregación de materiales puros basados en HA limita sus aplicaciones adicionales, por lo que es necesario dispersar dichos nanomateriales en una matriz adecuada para evitar la agregación.

2.2.4 COMPOSITOS DE QUITOSANO Y NANOMATERIALES

Durante la última década se han producido considerables avances en el desarrollo de materiales poliméricos que pueden ser utilizados para la obtención de sensores químicos y bioquímicos. Entre éstos los electrodos modificados con películas de polímeros.

Se ha demostrado que el empleo de recubrimientos poliméricos para producir superficies modificadas conlleva varias ventajas importantes desde el punto de vista del análisis. Quizás,

la más significativa sea que estos recubrimientos, proporcionan una zona de reacción tridimensional en la superficie del electrodo, que ocasiona un aumento en el flujo de las reacciones que ocurren en dicha superficie, lo que a su vez produce un aumento de la sensibilidad.

Aunque los materiales poliméricos han sido depositados sobre los sustratos de muy diversas formas (enlace covalente, adsorción, mezcla física, etc.), parece ser que la electropolimerización es la que tiene más ventajas, constituyendo una ruta de síntesis polimérica simple, limpia y eficiente. Utilizando métodos electroquímicos se pueden controlar cuidadosamente la velocidad y la extensión del proceso de electropolimerización mediante la aplicación de las condiciones electroquímicas adecuadas. Además, las propiedades físicas y químicas del polímero resultante son también controladas por dichas condiciones electroquímicas durante el proceso de síntesis [132].

En comparación con los electrodos modificados químicamente mediante la formación de monocapas, los electrodos modificados con películas poliméricas ofrecen una mayor estabilidad física y química, una mayor densidad de centros activos (10^{-10} - 10^{-6} mol/cm² corresponden a $1-10^5$ monocapas), y una respuesta electroquímica muy sensible. Estas ventajas están asociadas con la estructura, composición y propiedades de los polímeros empleados. Entre las cualidades deseables en un polímero para poder ser aplicado desde el punto de vista analítico deben mencionarse la facilidad de preparación, la formación de uniones estables con el electrodo, un largo tiempo de vida del mismo y que proporcionen un adecuado micro entorno espacial, electrostático y químico.

El quitosano es un polímero catiónico lineal, biodegradable, que se obtiene a partir de la quitina, uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza después de la celulosa. Actualmente la quitina se obtiene principalmente del exosqueleto de crustáceos industrialmente procesados, tales como langosta, cangrejo y camarón [132].

Tanto la quitina como el quitosano son aminoglucopiranos de cadenas lineales, constituidos por residuos de *N*-acetil-*D*-glucosamina y *D*-glucosamina unidos por enlaces $\beta(1-4)$. El quitosano se obtiene a partir de la quitina por desacetilación de un porcentaje variable de los residuos de *N*-acetilglucosamina, por lo que se considera un copolímero de

N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina en el que tanto la longitud de la cadena polimérica como el grado de desacetilación y degradación química contribuyen decisivamente a las propiedades de la molécula (figura 16) [133].

Las principales aplicaciones de la quitina y el quitosano han sido en el campo de alimentos y bebidas, en el tratamiento de aguas y en la agricultura. Actualmente más de 300 artículos de investigación reportan la aplicación de quitosano y bionanocompuestos de quitosano como plataformas de biosensores electroquímicos en la construcción de biosensores.

El quitosano ha sido utilizado para la preparación de películas bionanocompuestas en biosensores electroquímicos, debido a su naturaleza renovable, biodegradable y no tóxica. El quitosano es un importante polisacárido natural para la inmovilización de biomoléculas, debido a su excelente capacidad de formación de película, resistencia mecánica, alta permeabilidad, biocompatibilidad, no toxicidad, fácil disponibilidad y bajo costo (figura 16) [133, 134].

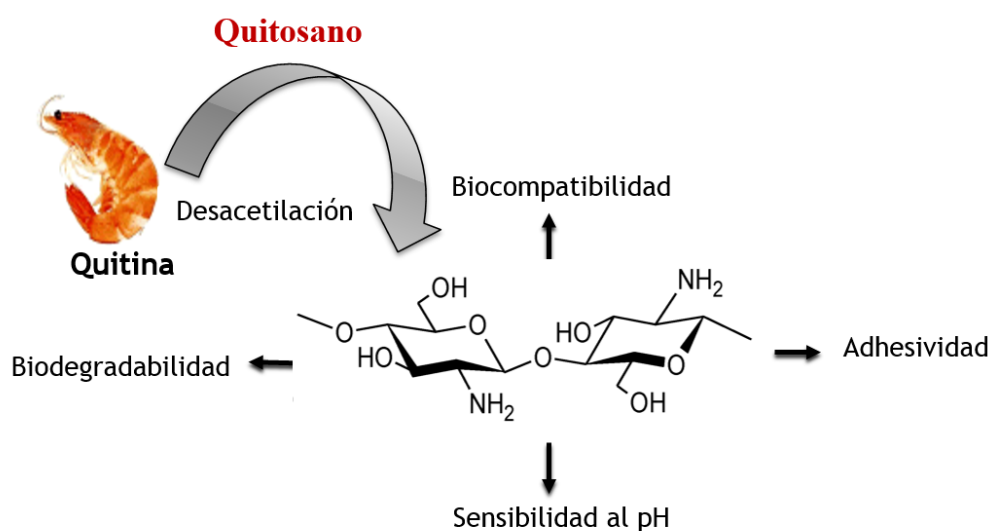


Figura 16. Estructura de quitosano y sus propiedades características.

La característica estructural distintiva del quitosano es su amina primaria en la posición C-2 de los residuos de glucosamina. La presencia de los grupos -NH_2 en la estructura del quitosano, lo hace un polímero muy versátil y confiere las películas de quitosano múltiples

funcionalidades que son especialmente importantes para la construcción y la comunicación a través de la interfaz de bio-dispositivo.

Debido a las aminas, el quitosano es un polielectrolito débil que posee propiedades sensibles al pH. A un pH bajo, las aminas primarias del quitosano están protonadas, lo que hace que el quitosano sea un polielectrolito catiónico soluble en solución acuosa. A un pH alto, estas aminas se desprotonan haciendo que el quitosano sea neutro e insoluble. Es importante destacar que el quitosano sufre una transición soluble a insoluble cerca de su pKa ($\approx 6.2-6.6$) que se encuentra dentro de un rango conveniente para aplicaciones biológicas [133].

Dada su sensibilidad al pH, el quitosano puede ser depositado en la superficie del electrodo por el cambio de pH local electroquímicamente generado. La Figura 17 ilustra el mecanismo de neutralización responsable de la electrodeposición catódica de quitosano. El quitosano se disuelve en una solución ácida ($\text{pH} < 6$) y luego los electrodos se sumergen en esta solución. Normalmente, se aplica un potencial controlado o una corriente controlada a los electrodos para iniciar las reacciones electroquímicas (por ejemplo, reacciones de electrólisis en agua). El efecto neto de estas reacciones catódicas es generar OH^- (como se ilustra en la Figura 17 para consumir H^+) para establecer un gradiente de pH con un alto pH localizado adyacente a la superficie del cátodo. Las cadenas de quitosano cerca de esta región catódica experimentan un pH alto y sus aminas primarias están desprotonadas, lo que induce la reacción localizada de sol-gel [134]. Las interacciones que mantienen unidas a las cadenas son fuertes (aunque no covalentes) y una vez que se forma la estructura, tienden a ser estable.

La electrodeposición de quitosano permite depositar y atrapar otros materiales en la película de quitosano. La deposición conjunta permite para localizar una proteína en la interfaz de un electrodo y conferir funcionalidad biológica (es decir, actividad enzimática) a la película depositada. Dicha biofuncionalización es particularmente conveniente para crear biosensores electroquímicos basados en enzimas [134].

Además de las proteínas, también es posible co-depositar varios otros materiales para su incorporación en la película de quitosano electrodepositada. En muchos casos, la co-deposición tiene como objetivo generar recubrimientos compuestos [135].

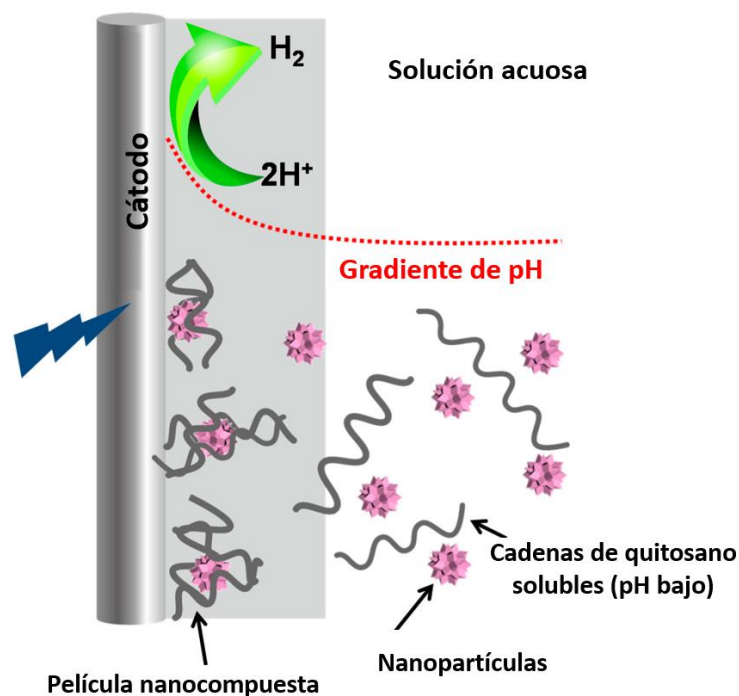


Figura 17. Electrodeposición catódica del quitosano. La deposición conjunta permite que varios componentes biológicos y no biológicos sean ensamblados y atrapados en la película de quitosano electrodepositada [134].

El enriquecimiento de la matriz de CS con nanomateriales ha mostrado resultados interesantes. Nanomateriales como los nanotubos de carbono [104], puntos cuánticos [136] u otras nanopartículas [135, 137] se han depositado conjuntamente con quitosano con el objetivo de facilitar la transferencia de electrones y la transducción de señales.

Es importante destacar que la electrodeposición de quitosano es una forma simple, rápida, versátil, y reversible para crear películas delgadas con diversas propiedades funcionales, en condiciones suaves (sin la necesidad de reactivos).

2.3 ANTECEDENTES DE LOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

2.3.1 Métodos convencionales

Actualmente el análisis de POs en muestras contaminadas se realiza, generalmente, empleando técnicas convencionales que incluyen cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida (LC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), espectrometría de masas (MS), electroforesis capilar (CE), resonancia de plasmón superficial (SPR), fluorimetría, espectroscopia ultravioleta y GC-MS [138]. Para el procedimiento de extracción de POs, se utilizan varias metodologías, como extracción en fase sólida dispersiva (QuEChERS), extracción líquido-sólido (LSE) entre otras [139]. En la tabla 2 se presentan los rendimientos analíticos de algunos métodos cromatográficos aplicados al análisis de plaguicidas OPs.

Aunque estos métodos se han utilizado con éxito para la detección de OPs, presentan varias desventajas debido al hecho de que requieren mucho tiempo, requieren un tratamiento previo de la muestra, una instrumentación costosa, personal altamente calificado y solo se pueden utilizar en laboratorios. Por estas razones, existe una necesidad creciente de métodos analíticos desplegados en campo capaces de proporcionar una detección simple, rápida, sensible, selectiva, de bajo costo y confiable de OP en concentraciones bajas.

Tabla 2. Rendimientos analíticos de algunos métodos cromatográficos aplicados al análisis de plaguicidas OPs

Pesticida	Método de detección	Preparación de muestra	LOD	Referencia
Paraoxón	GC-MS	ASE	1.10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[138]
Diclorvos	GC-MS	ASE	6.00 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[138]
Triclorfon	GC-MS	ASE	5.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[138]
Clorpirifos	GC-ECD	LLE	14.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[139]
Clorpirifos	GC-MS	LLSE	0.13 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[140]
Paratión	GC-QqQ-MS/MS	DSPE	1.50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[141]
Paratión	HPLC-DAD	UASEME	0.10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[142]
Metil paratión	HPLC-DAD	UASEME	0.10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[142]
Metil paratión	GC-PFPD	SPE	0.03 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[143]
Malatión	GC-MS	SPME	2.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[144]

GC-ECD: Cromatografía con detector captura de electrones, GC-QqQ-MS/MS: Cromatografía-Espectrómetro de masas triple cuadrupolo, GC-PFPD: Cromatografía con detector de flama pulsada; DAD: Cromatografía líquida de alto rendimiento con detección de matriz de diodos, ASE: extracción acelerada de solventes; LLE: extracción líquido-líquido ; LLSE: extracción solvente líquido-líquido ; UASEME: Microextracción de emulsificación potenciada con surfactante asistida por ultrasonido ; SPME: microextracción en fase sólida.

Aunque estos métodos se han utilizado con éxito para la detección de OPs, presentan varias desventajas debido al hecho de que requieren mucho tiempo, requieren un tratamiento previo de la muestra, una instrumentación costosa, personal altamente calificado y solo se pueden utilizar en laboratorios. La preparación de muestras es una tarea elaborada, que incluyen generalmente una etapa de extracción, una etapa de limpieza y/o preconcentración y finalmente la etapa de análisis, por lo que limita el número de muestras en un intervalo de tiempo específico. Además, varios pesticidas bajo investigación cromatográfica se descomponen a altas temperaturas de columna y de inyección. La interferencia de la matriz y una mayor duración de la prueba son problemas comunes con los métodos espectrofotométricos que utilizan reacciones complejas de color [144]. Por estas razones, existe una necesidad creciente de métodos analíticos desplegados en campo capaces de proporcionar una detección simple, rápida, sensible, selectiva, de bajo costo y confiable de OPs en bajas concentraciones.

Los biosensores emergen como una herramienta analítica altamente eficiente para la resolución de los problemas mencionados anteriormente vinculados con las técnicas convencionales de detección de pesticidas. Los biosensores allanan el camino para una detección fácil y eficiente de plaguicidas con una enorme precisión. La capacidad de detectar cantidades muy diminutas de la sustancia objetivo (pesticidas), el monitoreo continuo, bajo costo y análisis descentralizado en campo, son las características clave de la tecnología de biosensores.

2.3.2 Determinación de pesticidas organofosforados con biosensores electroquímicos

Los biosensores electroquímicos, se consideran una alternativa a las costosas, lentas y sofisticadas técnicas cromatográficas aplicadas actualmente para la cuantificación de OPs. La Tabla 3, muestra una comparación entre las características de los métodos analíticos

convencionales y las técnicas de biosensores. Las muestras ambientales que contienen OPs se detectan mediante sensores electroquímicos, ópticos y de masa, de los cuales el primero es el enfoque más común [56].

Tabla 3. Comparación de técnicas analíticas convencionales y biosensores

Técnicas analíticas convencionales		Biosensores	
HPLC, LC, GC, GC-MS, CE, SPR y fluorimetría		Electroquímicos, óptico y basados en masa	
Ventajas	Desventajas	Ventajas	Desventajas
Sensible	Pérdida de tiempo	Detección rápida en tiempo real	Aplicación comercial limitada
Específico	Costoso	Económico	
	Monitoreo de laboratorio	Portátil	
	Personal de laboratorio capacitado.	Uso simple	
	Equipo de alta tecnología	Altamente sensible	
	Extensa preparación de muestras.	Poca preparación de muestras	
	No reutilizable	Reutilizable	
	Mayor consumo de disolventes orgánicos.	Menor consumo de disolventes orgánicos.	
		Específico	

Hoy en día, los biosensores electroquímicos son los más utilizados, seguidos de los biosensores ópticos y másico (Figura 18) y esto es debido a las importantes ventajas que estos presentan [40]. Estos dispositivos suelen tener diseños relativamente simples y no requieren instrumentación costosa. Por lo tanto, son dispositivos de fácil manejo, compactos y de bajo costo.

Otras ventajas inherentes de biosensores electroquímicos son su robustez, fácil miniaturización, excelentes límites de detección, también con volúmenes de análisis pequeños, y la capacidad para ser utilizado en biofluidos turbios con compuestos ópticamente absorbentes y fluorescentes.

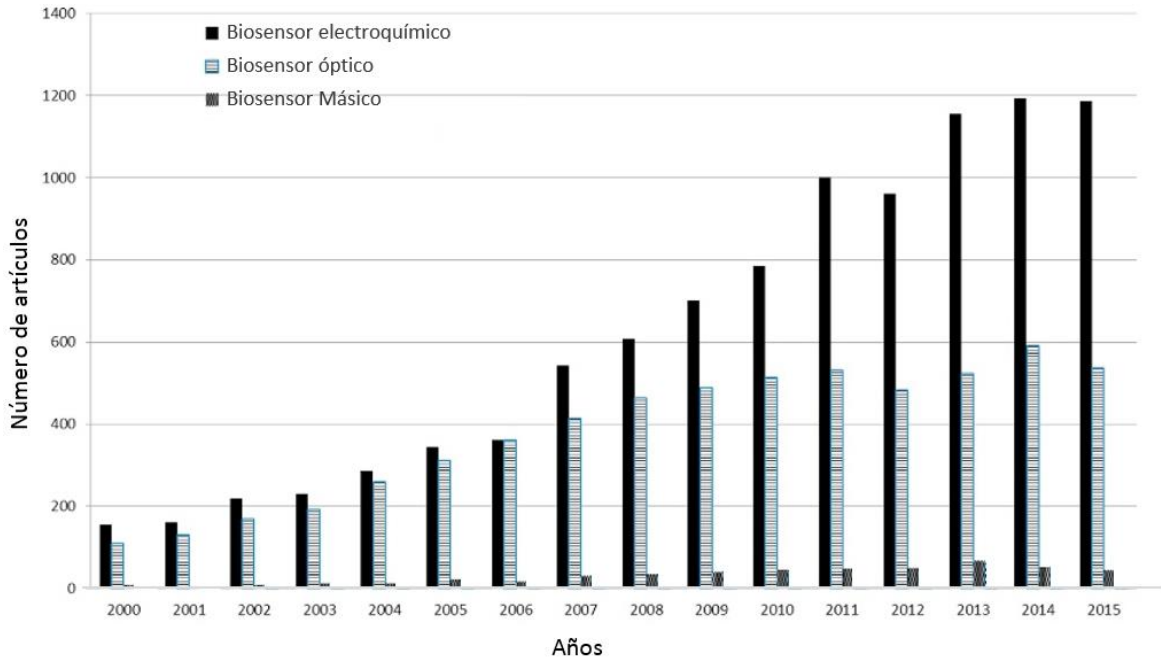


Figura 18. Evolución del número anual de artículos sobre los diferentes tipos de biosensores desde 2000 hasta 2015. Los biosensores electroquímicos son claramente los biosensores más frecuentemente encontrados, seguidos de los biosensores ópticos [40].

El modo de transducción electroquímica aplicada de los biosensores electroquímicos es comúnmente potenciométrica o amperométrica [145]. Las determinaciones amperométricas implican la medición de la corriente de respuesta de un electrodo indicador a un potencial constante. La señal analítica es directamente proporcional a la concentración de la especie electroactiva presente en la solución [145]. La aplicación de un potencial apropiado, mantenido constante, hace que la determinación sea selectiva. Las otras ventajas de las detecciones amperométricas sobre la potencimetría son la alta sensibilidad y precisión del análisis, el gráfico de calibración lineal y respuesta rápida de los sensores.

El biosensor amperométrico es el biosensor electroquímico más utilizado para la detección de pesticidas, para el cual la enzima es el principal elemento de bio-reconocimiento. Los principales procesos involucrados en los biosensores amperométricos enzimáticos para la cuantificación de OP son: (i) inhibición de la actividad de colinesterasas por OPs (inhibidores de AChE/enfoque indirecto) (ii) hidrólisis de OPs catalizada por la enzima organofosforado hidrolasa (OPH/enfoque directo); seguido por la detección amperométrica de las especies electroactivas generadas en los ambos mecanismos [145,146].

2.3.2.1 Biosensores basados en la inhibición

Las colinesterasas (ChEs) son enzimas importantes presentes en vertebrados e insectos, hidrolizan el neurotransmisor acetilcolina en el sistema nervioso. En el cuerpo, las ChEs son responsables de la transmisión de los impulsos nerviosos a las sinapsis colinérgicas y están relacionadas con la memoria humana y la enfermedad de Alzheimer [147]. Las ChEs son inhibidas por una serie de compuestos que incluyen pesticidas organofosforados y carbamatos, agentes nerviosos, toxinas naturales, metales pesados y algunos medicamentos. La AChE y butirilcolinesterasa (BChE) son los dos tipos de enzimas colinesterasas más empleados como bioreceptores para la fabricación de biosensores. La AChE en las sinapsis nerviosas termina la transmisión del impulso nervioso hidrolizando el neurotransmisor acetilcolina. La BChE actúa como un respaldo para AChE, y como un eliminador de venenos que podrían inhibir la actividad de la AChE [148].

En la actualidad, se han purificado varios tipos de enzimas AChE a partir de diferentes fuentes, como el suero de caballo, los eritrocitos humanos, la sangre humana, los eritrocitos bovinos o el órgano eléctrico de la anguila eléctrica, están disponibles comercialmente y se han utilizado para la fabricación de biosensores.

Los biosensores basados en inhibición más utilizados son los basados en la enzima AChE [145]. Un gran número de documentos, incluidos varios artículos de revisión sobre biosensores electroquímicos basados en AChE para la detección de compuestos OPs, están disponibles en la literatura, con límites de detección (LOD) que varían desde los niveles de micromolares a picomolares, dependiendo de la fuente de la enzima AChE, técnica y mecanismo de transducción empleados [145,149].

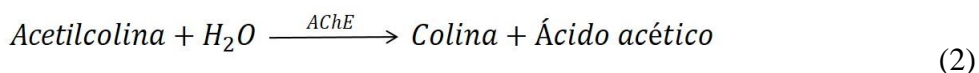
Los plaguicidas organofosforados inhiben selectivamente las AChE al bloquear la serina en el sitio activo mediante un ataque nucleofílico para producir un fosfoéster de serina (a través de la fosforilación) [150]. El principio general de los biosensores desarrollados se basa en la correlación entre la toxicidad de los pesticidas y la disminución de la actividad enzimática. Por lo tanto, el desarrollo de estos sistemas de biosensores se basa en una medición cuantitativa de la actividad de la enzima antes y después de la exposición a un analito objetivo. Este mecanismo de inhibición permite la cuantificación del contenido de pesticida al medir la actividad de la enzima en ausencia y en presencia del analito. El

procedimiento abarca los siguientes pasos: i) medición de la actividad enzimática inicial, ii) incubación del biosensor en una muestra que contiene pesticidas, y iii) finalmente la medición de la actividad residual (actividad después de la exposición del biosensor al pesticida) [151]. El porcentaje de inhibición de la actividad enzimática que resulta de la exposición a pesticidas está relacionado cuantitativamente con la concentración de pesticidas. Los OPs se cuantifican utilizando la ecuación. (1):

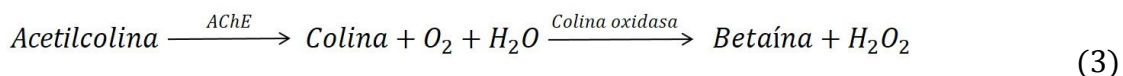
$$I\% = \left(\frac{I_0 - I_1}{I_0} \right) \times 100 \quad (1)$$

Donde I% es el grado de inhibición, I_0 es la actividad de la enzima antes de la exposición a la muestra e I_1 es la actividad de la enzima después de la exposición a la muestra. En presencia de pesticidas, se observa una disminución de la actividad enzimática, resaltada por la disminución del valor de I%.

Varios biosensores electroquímicos se han descrito en la literatura basada en la enzima AChE [150,152]. La AChE puede hidrolizar la acetilcolina siguiendo la ecuación (2):



Esta reacción se puede monitorizar midiendo i) la variación del pH mediante transducción potenciométrica [153]; ii) la variación de la conductibilidad por transducción conductométrica; iii) la detección de peróxido de hidrógeno por transductores amperométricos utilizando un enfoque bi-enzimático (AChE y colina oxidasa). Primero, la AChE cataliza la hidrólisis de la colina afectada por la inhibición de la actividad enzimática por los OPs, seguida de la oxidación de betaína catalizada por colina oxidasa (Ecuación 3). La corriente de oxidación del H_2O_2 producido (Ecuación 4) o la corriente de reducción del O_2 consumido (Ecuación 5) se registra como una respuesta del sensor y se correlaciona con la concentración de OPs [154].



Sin embargo, estos sensores bi-enzimáticos presentan algunas deficiencias intrínsecas como: diseño sofisticado ya que deben acoplarse dos enzimas, protocolo de múltiples etapas y las posibles interferencias en el potencial de oxidación de H_2O_2 (+0.6 V/SCE), entre otros [145].

Para evitar el uso de un enfoque bi-enzimático, otros biosensores de AChE amperométricos se basan en la medición del cambio en la concentración del producto electroactivo tiocolina, producido como resultado de la hidrólisis del sustrato no natural acetiltiocolina (ecuación 6). En presencia de un inhibidor como OPs, la AChE se inhibe y, por lo tanto, la hidrólisis de la acetiltiocolina disminuye o incluso es nula [154], lo que resulta en una reducción de la oxidación de la tiocolina (a un potencial de + 0.8 V/SCE). La corriente máxima de oxidación de la tiocolina es inversamente proporcional a la concentración de OPs. Al monitorear la corriente máxima de oxidación de la tiocolina antes y después de la inhibición, se puede determinar la concentración de OPs. No obstante, la determinación de tiocolina con electrodos descubiertos es restringida, debido al alto potencial requerido y a los problemas de ensuciamiento del electrodo que afectan a la detección de tiol [155].



El uso de sensores modificados con nanomateriales ha aumentado el desarrollo de este tipo de biosensores, debido a las propiedades electrocatalíticas de varios nanomateriales que realizan la detección de tiocolina a un bajo potencial aplicado, superando el problema de ensuciamiento. Varios nanomateriales se han utilizado como matrices de inmovilización AChE durante el desarrollo de biosensores para OPs [146, 156]. Los resultados de estos estudios demuestran que la modificación del transductor con nanomateriales permite la detección de OPs en el rango de nano-mol a pico-mol y mejora la estabilidad de los biosensores [145]. En la tabla 4, se enumeran algunos biosensores a base de AChE.

Tabla 4. Biosensores electroquímicos de AChE con nanomateriales

Material de electrodo	Técnica de transducción	LOD	Linealidad	Analíto	T.I (min)	Ref.
MWCNTs-AuNC/GCE	Amperom.	0.0018 μM	3.0×10^{-3} - 3.027 μM	Malatión	8	[157]
ZrO ₂ /CS/GCE	Amperom.	0.0013 μM , 0.005 μM , 0.017 μM	6.6-440 μM , 0.01-0.59 μM , y 8.6-520 μM	Foxin, Malatión, and imethoate	15	[158]
AuNPs/GCE	Amperom.	0.007 μM	28×10^{-3} - 170×10^{-3} μM	Metamidofos	10	[159]
MWCNTs/AuNPs-CS/GCE	Amperom.	0.01 μM	0.1-10 μM	Monocrotofos	NR	[160]
Au-PtNPs/GCE	Amperom.	50×10^{-4} μM , 0.04 μM , y 40 μM	$50-200 \times 10^{-3}$, $1.40-50 \times 10^{-3}$, 40-60 μM	Paraoxón etil, sarín, y aldicarb	25	[161]
TiO ₂ /grafeno/GCE	Amperom.	0.0014 μM	$74.5-9.9 \times 10^{-3}$ μM	Carbyl	3	[162]
Grafito/CS/GCE	Amperom.	1.58×10^{-4} μM	1×10^{-4} -1.0 μM	Clorpirifos	10	[163]
Fe ₃ O ₄ /MWCNT/Au	Voltam.	0.1 nM, 0.1 nM, 1 nM y 10 nM	0.1-40 nM, 0.1-50 nM, 1-50 nM, 10-100 nM	Malatión, clorpirifos, monocrotofos, endosulfan	10	[164]
CS/3DG-CuO/NFs/GCE	SWV	0.93 pM	3 pM - 665 nM	Malatión	10	[165]
AuNP/rGO/GCE	Amperom.	0.1 pM	0.02 μM - 0.4 μM	Paraoxón	15	[166]
Au-PPY-rGO	Amperom.	0.5 nM	1.0 nM- 5 mM	Paraoxón	15	[167]
MWCNTs/PAN/Pt	Amperom.	0.005 pM	3.6×10^{-8} - 3.6×10^{-5} μM	Paraoxón	20	[168]
PPY-PANI /MWCNTs/GCE	Amperom.	3.02×10^{-3} μM	0.030-1.51 μM 3.027-75.67 μM	Malatión	15	[169]

SWV: voltametría de onda cuadrada, AuNC: nanocables de oro, GCE: electrodo de carbón vítreo, PAN: Metacrilato de metilo vinil sulfonato de sodio, CS: quitosano, PPY: polipirrol, PANI: polianilina

Como se aprecia en esta tabla, la mayor proporción de biosensores basados en AChE, construidos con nanomateriales tienen una LOD comparable a las técnicas de laboratorio clásicas enumeradas anteriormente, sin embargo, los principales inconvenientes de estos métodos surgen de los hechos que: (1) a menudo carecen de selectividad, dado que los metales pesados, fluoruros, gases nerviosos o nicotina, etc. también pueden impedir la enzima AChE y, por lo tanto, pueden interferir en la especificidad del proceso de detección de pesticidas. (2) Otra dificultad de los biosensores de AChE es la mala resolución de las

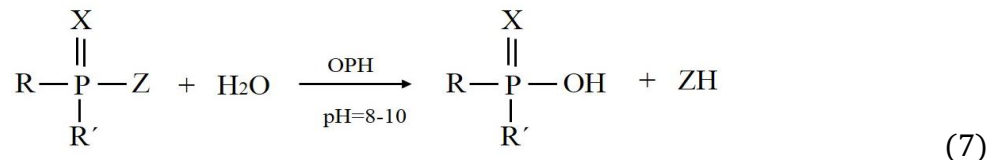
mezclas de pesticidas, ya que proporcionan información sobre una familia de compuestos y no sobre compuestos individuales en una familia, por lo tanto no se puede obtener información cualitativa o cuantitativa sobre un inhibidor individual en una solución compleja. (3) Estos protocolos incluyen varios pasos que requieren la medición de la actividad no inhibida de AChE, seguido de la incubación del sensor con la muestra de análisis durante 10-15 min (y aún más) y la medición de la AChE nuevamente para determinar el grado de inhibición. (4) Es necesario un paso final de reactivación / regeneración de la enzima, que en muchos casos es parcial y en algunos casos no es posible debido a una inhibición irreversible. Por lo que no son adecuados para el monitoreo continuo.

Otra estrategia para superar las desventajas de los biosensores basados en la inhibición de la AChE, son los basados en las enzimas organofosforada hidrolasas (OPH) también conocidas como fosfotriesterasas, enzimas degradadoras de organofosfatos o hidrolasas paratiónicas [170]. Estas enzimas detectan OPs como sustratos directos y se han caracterizado con el objetivo de disminuir el tiempo de análisis.

2.3.2.2 Biosensores basados en la hidrólisis

Las organofosforado hidrolasas son una clase de enzimas bacterianas que recientemente han sido reconocidas y caracterizadas como enzimas de reconocimiento alternativas para la detección directa de OPs. En este trabajo de tesis, nos centraremos en la OPH bien caracterizada EC 3.1.8.1, que se aisló por primera vez de las bacterias del suelo *Pseudomonas diminuta* MG y *Flavobacterium sp* [170].

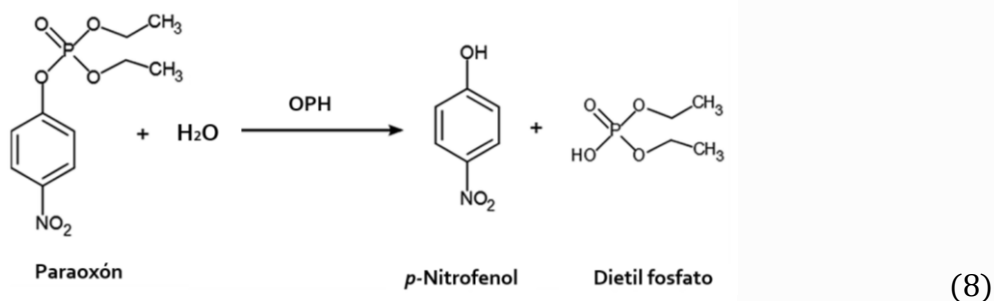
La enzima OPH tiene amplia especificidad de sustrato y es capaz de hidrolizar un gran número pesticidas organofosforados: paraoxón, paratión, metil paratión, cumafos, malatión, fenitrotión, acefato, demethon-S, diazinón, clorpirifos y algunos agentes de guerra química (sarin, soman, tabun, VX, etc.). La enzima cataliza la hidrólisis de los enlaces P-O, P-S, P-F y P-CN, de acuerdo con la siguiente reacción [170]:

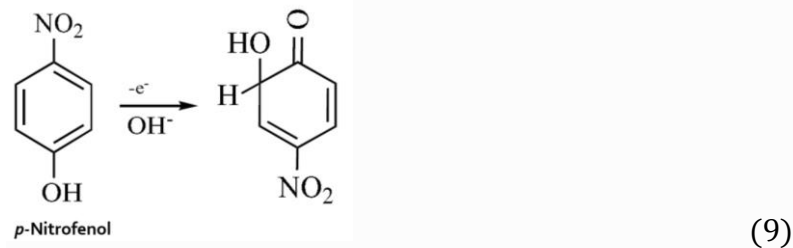


X es oxígeno o azufre, R es un grupo alcoxi (metoxi a butoxi), R' es un grupo alcoxi o fenilo, y Z es un grupo fenoxi, un tiol, un cianuro o un grupo flúor.

A diferencia de AChE, la OPH cataliza la hidrólisis de los OPs con una alta tasa de conversión; por lo tanto, OPH ha demostrado un potencial considerable en las aplicaciones de biosensores de OPs. Los ensayos de biosensores basados en OPH se reportan como sistemas de detección reversibles, ya que responden tomando los OPs como sustratos de enzimas, en lugar de inhibidores. Dado que la hidrólisis de los sustratos OPs catalizados enzimáticamente implica cambios en el pH y genera productos electroactivos, la determinación podría realizarse en una sola etapa, utilizando transductores potenciométricos (sensibles al pH) o amperométricos. Para la detección amperométrica de OPs con biosensores de OPH, generalmente se emplea la oxidación anódica de *p*-nitrofenol (*p*-NP), que es un producto de la hidrólisis de los analítos OPs [171].

La aplicación de sensores amperométricos basados en OPH se limita a los OPs sustituidos con fenilo con grupos salientes electroactivos, tales como paraoxón, paratión, metil paratión, etc [171]. Los procesos involucrados son: hidrólisis del OPs catalizada por OPH inmovilizada en el electrodo y la detección anódica amperométrica del *p*-NP liberado enzimáticamente, de acuerdo con las siguientes reacciones: Las reacciones que ocurren, seleccionando el paraoxón como modelo, son las siguientes:





La corriente de oxidación del p -NP, que es la señal del sensor medida a un potencial fijo, debe ser directamente proporcional a la concentración del pesticida OPs. La Figura 19 ilustra los procesos descritos.

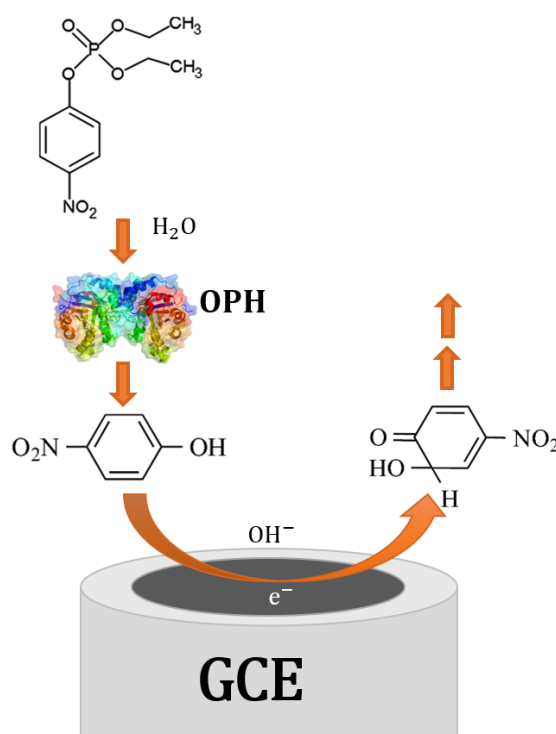


Figura 19. Esquema de la Cuantificación de OPs por electrodo enzimático.

El mecanismo de detección basado en el seguimiento de los productos de hidrólisis de los OPs catalizado por OPH, es más simple, directo, presenta mayor selectividad frente a los compuestos diana y tiempos de respuesta más cortos que los basados en la inhibición de las AChE, que responde a todo tipo de OPs [145]. Por lo tanto, muchos biosensores de OPH se han desarrollado para el análisis de OPs. Los rendimientos analíticos de algunos biosensores basados en OPH seleccionados para los OPs de detección se muestran en la Tabla 5.

Los sensores basados en OPH presentaron varias ventajas sobre los basados en colinesterasas, como el mecanismo de detección directa, el protocolo de ensayo de un solo paso, la especificidad hacia los OPs sustituidos con p-nitrofenol y respuesta reversible del sensor. El principal inconveniente de los sensores basados en OPH es su menor sensibilidad y límites de detección más altos que los métodos de inhibición de la AChE [179].

Tabla 5. Biosensores electroquímicos basados en OPH para la determinación de OPs.

Enzima	Analíto	LOD	Sensibilidad, nA/ μ M	Referencia
OPH	Paraoxón	2.0 μ M	12.24	[172]
OPH	Metil paratión	2.0 μ M	1.49	[172]
OPH	Metil paratión	2.0 μ M	1.04	[173]
OPH	Paraoxón	0.1 μ M	2.29	[173]
OPH	Paraoxón	0.15 μ M	25	[174]
OPH	Metil paratión	0.8 μ M	6	[174]
OPH/AChE	Paraoxón	0.5 μ M	NR	[175]
OPH	Paraoxón	0.4 μ M	NR	[176]
OPH	Paraoxón	0.1 μ M	NR	[177]
OPH	Paraoxón	20 nM	3.76	[178]
OPH	Metil paratión	20 nM	3.15	[178]

Otro inconveniente importante también representa el procedimiento complejo, largo y costoso para la extracción y purificación de OPH, realizado en laboratorios microbiológicos especializados (cabe también resaltar, que estas enzimas no están disponibles comercialmente) [146]. Teniendo en cuenta que la mayoría de los biosensores de OPH amperométricos reportados en la literatura se basan en la detección anódica del producto de hidrólisis p-nitrofenol a un alto potencial anódico ($E \geq 0.80$ V vs Ag, AgCl/KCl sat) [179], las interferencias constituyen un problema, así como también ensuciamiento y pasivación de la superficie de los electrodos causada por polímeros productos oxidativos de p-NP, impidiendo la posterior electro-oxidación de p-NP, alternando la precisión y sensibilidad del método. Un enfoque simple para superar este inconveniente es sugerido por Stoytcheva et al. [180]. Se basa en la aplicación de la detección por amperometría de pulsos. Por lo tanto, el p-NP producido en la hidrólisis catalizada por OPH de los OPs se detecta a un potencial de +1.1 V/Ag, mientras que la limpieza y reactivación *in situ* del electrodo se aseguran aplicando un potencial de limpieza de +1.4 V vs Ag, AgCl/KCl sat. Las otras desventajas de este grupo de

biosensores son la inestabilidad de la respuesta (debido a la fuga o desactivación de la enzima) y la corta vida útil a temperatura ambiente [179].

La estrategia reciente que se ha aplicado para mejorar los rendimientos analíticos de los sensores amperométricos basados en OPH se basa en la funcionalización de la interfaz de los biosensores utilizando nanomateriales. El enfoque nanotecnológico aprovecha las propiedades electroanalíticas de las nanoestructuras. Su acción como mediadores de transferencia de electrones logra una disminución del potencial del electrodo y evita el ensuciamiento del electrodo, mientras que la gran relación superficie/volumen, robustez estructural y la biocompatibilidad de los nanomateriales favorecen la sensibilidad y estabilidad de los biosensores [181].

Los nanotubos de carbono son los nanomateriales más empleados para mejorar el rendimiento analítico de los biosensores electroquímicos para pesticidas, teniendo en cuenta que: (i) tienen propiedades únicas, como una alta relación superficie-volumen, alta conductividad eléctrica, resistencia mecánica actividad catalítica y biocompatibilidad favorable. (ii) Pueden promover reacciones de transferencia de electrones y minimizar el ensuciamiento de la superficie en dispositivos electroquímicos. (iii) La funcionalización química de los CNT se puede usar para unir casi cualquier especie química deseada, lo que permite, por ejemplo, aumentar la solubilidad y la biocompatibilidad de los tubos. (vi) Los CNT, con sus interesantes propiedades electrocatalíticas y eléctricas, son ideales como electrodos y como componentes de transductores en biosensores [182].

Tanto los nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT) como los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) se han utilizado para la inmovilización de enzimas, aunque los inconvenientes de los SWCNTs como el alto costo y la baja dispersabilidad favorecen la aplicación del MWCNTs, a pesar de la alta superficie y umbrales de percolación eléctrica bajos de los SWCNTs [181]. Además, la funcionalización de MWCNTs con grupos -COOH imparte mayor solubilidad y procesabilidad, lo que permite su uso como material catalíticamente activo para aplicaciones electroquímicas [107,108].

En virtud de ello, Pedrosa et al. [187] demostraron el uso de OPH conjugada con SWCNT y MWCNTs funcionalizados para la detección amperométrica directa de paraoxón,

como modelo OPs. La hidrólisis catalítica del paraoxón produjo *p*-NP y la oxidación se controló amperométricamente en tiempo real en el modo análisis por inyección en flujo (FIA). La OPH inmovilizada covalentemente con SWCNT demostró una actividad mucho más alta que la OPH conjugada con MWCNTs. El rango de concentración lineal para OPH-SWCNT fue de 0.5–8.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ con un límite de detección de 0.01 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (S/N = 3). Además, de esta alta sensibilidad, la OPH inmovilizada retuvo significativamente la actividad enzimática y mostró una estabilidad notable con solo un 25% de pérdida de señal durante 7 meses. Estos resultados sugirieron que la inmovilización covalente de OPH en los CNT podría usarse para la inmovilización específica con ventajas de estabilidad a largo plazo, alta sensibilidad, buena reproducibilidad y simplicidad.

En otro estudio, Deo et al. (2005) [184] desarrollaron un biosensor amperométrico para OPs basado en un transductor modificado con CNTs y OPH. La capa de CNTs condujo a una detección anódica mejorada del producto de *p*-NP, incluida una mayor sensibilidad y estabilidad. Bajo las condiciones óptimas, el biosensor se utilizó para medir concentraciones tan bajas como 0.15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de paraoxón y 0.8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de metil paratión. Estos resultados demuestran que el acoplamiento de la enzima OPH y transducción amperométrica con CNT, tiene ventaja sobre los biosensores de CNTs basados en AChE que carecen de especificidad hacia los pesticidas organofosforados y requieren la adición del sustrato y un período de incubación.

Por otra parte, Bao et al. (2016) [185] desarrollaron un biosensor basado en OPH para la determinación de paratión y paratión metílico usando nanofibras de dióxido de titanio (TiO_2NFs) decoradas con MWCNTs funcionalizados con carboxilo (cMWCNTs- TiO_2NFs). Demostraron que una fuerte afinidad de TiO_2NFs podría conducir a la agregación de los OPs. Mientras que los cMWCNTs podrían promover el proceso de transferencia de electrones y la inmovilización covalente de la OPH. Bajo las condiciones de óptimas, el paratión y el paratión metílico pudieron detectarse con una respuesta rápida (menos de 5 s) y un LOD bajo (10 nM y 12 nM, respectivamente). En base a este estudio, es posible llevar a cabo el monitoreo de los residuos de OPs en muestras de agua de lago, ríos etc., con buena precisión y selectividad.

En otro estudio, Trojanowicz et al. (2004) [186] Desarrollaron un biosensor para la determinación de paraoxón, con la OPH inmovilizada por absorción física en la superficie de un electrodo de grafito modificado con MWCNTs. La modificación se realizó mediante la evaporación de una solución de MWCNTs en dimetilformamida sobre la superficie de un electrodo de grafito. Además, demostraron el efecto de la modificación sobre la reversibilidad del proceso del electrodo en el sistema hexacianoferrato (II)/(III), junto con la mejora de la sensibilidad del sensor en la detección del pesticida paraoxón. Los resultados indican que con un aumento de los MWCNTs de aproximadamente 5 a 20 μg en el sensor, aumenta el valor de la corriente residual dos veces, mientras que la sensibilidad de las mediciones hasta 10 μM aumentó de 3.8 a 12.8 nA/mM de paraoxón, en comparación a 0.11 nA/mM en la medición sin modificación del electrodo. El límite de detección alcanzado (S/N) fue igual a 3.0 μM .

Zhao et al., (2012) desarrollaron un biosensor mediante el uso de un electrodo de carbono vítreo modificado con MWCNTs y quitosano para detectar Metomil. La matriz formada por deposición capa-por-capla de CS se usó para la inmovilización enzimática. La película bio-nanocompuesta del biosensor exhibió una combinación de la excepcional conductividad de los MWCNTs y la biocompatibilidad del CS logrando una detección altamente sensible. Se lograron límites de detección bajos (10-11 $\mu\text{g L}^{-1}$) para metomil en agua de mar. Además, el biosensor electroquímico mostró una excelente estabilidad de almacenamiento y de respuesta [187].

Como se mostró anteriormente, la modificación de la superficie del electrodo con CNT puede mejorar la sensibilidad de la determinación de los compuestos fenólicos, producida por la hidrólisis de OPs catalizada por OPH y también puede mejorar la estabilidad del sensor.

Las materiales cerámicas como las nanopartículas de óxido de circonio (ZrO_2NPs) son otros materiales prometedores, que se podrían utilizar con éxito para la construcción de sensores electroquímicos basados en OPH para la determinación de OPs con una sensibilidad mejorada [188].

Las ZrO₂NPs, un óxido inorgánico, son un material ideal para la inmovilización de biomoléculas con grupos de oxígeno, es decir, enzimas, ADN, anticuerpos, etc. y poseen un punto isoeléctrico significativamente alto (~9.5) que ayuda a aumentar las interacciones con las biomoléculas deseadas con puntos isoeléctricos bajos (~4–5) a través, de las interacciones electrostáticas. Además, gracias a que carecen de toxicidad debido a su inercia química, estabilidad térmica y estabilidad al pH, desempeñan un papel importante en recubrimientos ópticos, dieléctricos, resistentes a la corrosión y aplicaciones de sensores [122,123]. Por lo tanto, las ZrO₂NPs se han convertido en un candidato ideal de materiales para inmovilización de biomoléculas para la fabricación de biosensores [124].

Estas nanopartículas de ZrO₂ también proporciona una etapa tridimensional y algunas orientaciones restringidas, que pueden adaptarse a la transferencia electrónica directa entre las moléculas de proteína y la superficie del conductor [189]. Conjuntamente, varios investigadores han reportado que el ZrO₂ tienen una fuerte afinidad por los grupos fosfóricos [190,191], y los OPs nitroaromáticos se unen fuertemente a la superficie de nanopartículas de ZrO₂. Debido a estas propiedades atractivas, las ZrO₂NPs se ha utilizado en aplicaciones de sensores electroquímicos para la determinación de OPs [191].

Liu y sus colaboradores propusieron un método novedoso que utiliza un electrodo de oro modificado con ZrO₂NPs para lograr la detección electroquímica de OPs nitroaromáticos [191].

En una investigación reciente sobre ZrO₂ [189], Zhou y colaboradores propusieron un método novedoso que usaba una plantilla de monocapa autoensamblada (SAM) para la electrodeposición de una película de nanopartículas de ZrO₂ en un electrodo de oro. La película de ZrO₂PNs era altamente estable y podía adsorber selectivamente moléculas que contenían grupos fosfóricos. Por lo tanto, desarrollaron un sensor para la determinación del paratión basado en las ZrO₂PNs electrodepositadas en el electrodo de oro modificado con SAM. Bajo los parámetros operacionales optimizados de SWV se obtuvo una respuesta lineal en el rango de concentración 0.005 a 1.0 µg ml⁻¹. El límite de detección fue de 0.8 ng ml⁻¹ (S/R = 3). Las ZrO₂PNs modificadas en la superficie SAM del electrodo de oro presentaron una reproducibilidad aceptable (RSD 4.16%, n = 10) y una buena estabilidad. El electrodo

se aplicó a la determinación de paratión en muestras reales y se obtuvieron resultados satisfactorios.

En otro estudio Devadas et al. (2014) [188], informaron sobre la incorporación de ZrO₂PNs con MWCNTs funcionalizadas sobre un electrodo de carbono vítreo para la determinación electroquímica de *p*-nitrofenol. El electrodo de carbono vítreo modificado, mostró una actividad electrocatalítica sobresaliente hacia la determinación voltamétrica de *p*-nitrofenol. La presencia de los MWCNTs en la película mejora la concentración de la cobertura de la superficie y también aumenta la constante de velocidad de transferencia de electrones de las nanopartículas de ZrO₂. El electrodo modificado tiene un rango lineal de 2–26 μM para *p*-nitrofenol. La película propuesta también se usó con éxito para la determinación voltamétrica de *p*-nitrofenol en muestras de agua de grifo y de río con un rango lineal de 0–24 μM, los que demuestra que el MWCNTs/ZrO₂ es un excelente material para el desarrollo de sensores.

En otro trabajo Wang, (2008) [192] describe la fabricación de una película nanocompuesta de ZrO₂/Au y su aplicación para la detección voltamétrica del OPs paration. El La película nanocompuesta mostró una fuerte afinidad hacia el grupo fosfato en las moléculas de paratión, lo que proporcionó sensibilidad y selectividad a la película de detección. Se obtuvo una relación lineal entre las corrientes de pico y la concentración de paratión, con un límite de detección para muestras estándar de 3 ng ml⁻¹. Además, los estudios de interferencia mostraron que los compuestos estructuralmente similares sin grupos fosfato no interferirían con la respuesta hacia el paratión de la película del electrodo.

Por otro lado, también se ha demostrado que la hidroxiapatita (HA, Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂), un biocerámico análogo al componente mineral del hueso y dientes humanos, aumenta la oxidación electroquímica del *p*-nitrofenol, que es el producto de la hidrólisis de los OP sustituidos con nitrofenilo catalizada por la OPH [193].

Además, también ha sido reportada como una excelente matriz para la inmovilización de enzimas, debido a su alta porosidad (del orden de cientos de micras) y sorprendente capacidad de absorción, basada en interacciones de grupos funcionales, electrostáticos, formación de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de proteína y el Ca (II) y los fosfatos en la superficie de HA [131].

Por lo tanto, debido a sus propiedades únicas de alta superficie específica y fuerte capacidad de adsorción, las nanopartículas de HA podrían mejorar efectivamente la respuesta electroquímica del *p*-nitrofenol, aumentar la sensibilidad de determinación y disminuir el límite de detección [193]. Además, la modificación de los electrodos con HANPS es muy simple, económica y fácil de preparar.

Como se ha mencionado anteriormente, las nuevas investigaciones demuestran que la sensibilidad de los sensores electroquímicos basados en OPH podría mejorarse aprovechando las capacidades de los nanomateriales para mejorar la respuesta de los biosensores electroquímicos. De este modo, la electrodeposición del quitosano podría considerarse una estrategia muy atractiva para la modificación de electrodos y la biofuncionalización.

El quitosano también es adecuado para la dispersión homogénea de nanotubos de carbono y nanopartículas. La solubilización de los nanotubos se ve favorecida por la capacidad del quitosano para formar enlaces covalentes con sus extremos carboxilados por el intermediario de sus grupos amino libres [194,195], mientras que las HANPs y el quitosano interactúan formando enlaces de hidrógeno y coordinación [196]. Las ZrO₂NPs que poseen afinidad hacia los OPs, también podría estar dispersas en la película de CS [190,191]. Asimismo, los grupos funcionales de la enzima actúan como ligandos de ZrO₂, por lo que la incorporación del óxido en el gel de quitosán podría ser útil para el aumento de la carga enzimática.

A pesar de las características interesantes de los nanomateriales descritos, actualmente no se había reportado ningún estudio para la determinación de OPs por biosensores electroquímicos basados en OPH, mediante la electrodeposición de quitosano con cMWCNTs, ZrO₂NPs y HANPs.

3

MATERIALES Y METODOS

3.1 INSTRUMENTOS

- **Amperometría**

Los estudios electroquímicos de los biosensores basados en OPH se realizaron por medio de un analizador electroquímico modelo 440A (CH Instruments Inc., Bee Cave, TX EE.UU.), y una celda de electrólisis de tipo convencional de 10 mL (Figura 20). Un alambre de Pt se utilizó como electrodo auxiliar y uno de Ag, AgCl/KCl(sat) como referencia. Un electrodo de carbón vítreo (GCE, Tokay GC 20, 3 mm de diámetro) se desempeñó como electrodo de trabajo.

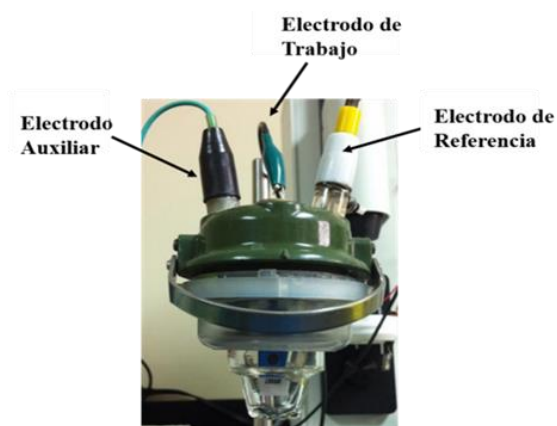


Figura 20. Celda electroquímica

La celda electroquímica en la que se realizó la electrodeposición del quitosano fue construida en el laboratorio y tiene un volumen de 2 mL (Figura 21).



Figura 21. Montaje para electrodeposición

- **UV-Visible**

La espectrofotometría de absorción UV-VIS se utilizó con el fin de determinar la actividad enzimática de la OPH tanto libre como inmovilizada.



Figura 22. Espectrofotómetro UV-Visible Evolution 60S Thermo Scientific.

- **Ultrasonido**

Se utilizó un dispersor ultrasónico para preparación de dispersiones con nanomateriales en líquidos, con el fin de romper los aglomerados de partículas y obtener las mezclas homogéneas.



Figura 23. Dispersor ultrasónico UP200S

- **Microscopía electrónica de barrido**

Se utilizó la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM) para investigar la microestructura y la morfología de las superficies de los electrodos modificados con los

diferentes depósitos nanoestructurados. Se trabajó con un equipo JEOL JSM-6010PLUS/LV, el cual fue operado como una tensión de aceleración de 15 kV y un vacío de 50 Pa.



Figura 24. Microscopio electrónico de exploración JEOL JSM-6010PLUS/LV.

1. FTIR

La espectrofotometría infrarroja IR se utilizó para la caracterización de las membranas depositados en la superficie del electrodo de GCE. Para el estudio se utilizó un espectrofotómetro Perkin-Elmer Spectrum One en modo ATR en el intervalo de $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$.



Figura 25. Espectrofotómetro Perkin-Elmer Spectrum One.

Otras Medidas

Otros aparatos utilizados han sido un agitador magnético, un pH-metro Hanna HI 99104, calibrado de forma usual con disoluciones reguladoras de pH 4.00 y 7.00 a $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$, un baño de ultrasónico Marca Branson modelo CPN-952. Todos los volúmenes se midieron con micropipetas automáticas de precisión 10 μL , 25 μL y 50 μL .

3. 2 REACTIVOS

▪ Preparación de disoluciones

Los reactivos utilizados en este trabajo: paraoxón-etilo, *p*-nitrofenol, atrazina, clorofos y quitosano (peso molecular medio) fueron de grado reactivo analítico y se adquirieron de Sigma (México D.F., México). Se prepararon soluciones stock de paraoxón (10 mmol L⁻¹), *p*-NP (50 mmol L⁻¹) y clorofos (10 mmol L⁻¹) en agua desionizada, mientras que la solución stock de atrazina (10 mmol L⁻¹) se preparó en metanol. Las soluciones con concentraciones más bajas se prepararon por dilución de estas. El quitosano 0.2% m/v se obtuvo por disolución de la sustancia en CH₃COOH 0.1 mol L⁻¹. Todos los experimentos fueron realizados en disolución tampón fosfato (PBS) 0.1 mol L⁻¹ pH 8.5, preparada disolviendo las cantidades adecuadas de las sales K₂HPO₄ y KH₂PO₄. El valor de pH elegido corresponde al pH óptimo de la enzima OPH.

Las nanopartículas ZrO₂ con tamaño de partícula <80 nm y los nanotubos de carbono de paredes múltiples funcionalizados con COOH con un diámetro de 20 a 30 nm y longitud de 10 a 30 micras fueron proporcionados por Intelligent Materials Pvt. Ltd. (Dera, Bassi, Punjab, India). Las nanopartículas de hidroxiapatita con tamaño de partícula <200 nm se adquirieron de Sigma aldrich.

En este trabajo se utilizó como fuente de enzima el producto de descontaminación DEFENZTM130BG (Genencor, Internacional, Inc., Palo Alto, EE.UU.). Contiene la OPH purificada y obtenida de *Flavobacterium*. Como la preparación comercial DEFENZTM 130BG está certificada, la caracterización de la enzima en este trabajo se limitará únicamente a

la determinación de su actividad que podría alterarse durante el almacenamiento. La preparación granulada se muestra en la Figura 26.



Figura 26. Gránulos de DEFENZ™ 130BG

Los componentes de un gránulo de enzima se muestran en la Figura 27. Este ejemplo particular es de un gránulo que se usa en detergentes. La capa interna es el núcleo, que puede estar compuesto de almidón, sacarosa, alcohol polivinílico (PVA) o de otros materiales. Sirve de soporte para la enzima y proporciona resistencia mecánica. La capa enzimática se compone de enzima mezclada con PVA. En los EE.UU. y México, una capa de barrera de sulfato de amonio se utiliza para eliminar el cloro del agua de lavado. Por último, la capa externa de TiO₂, PVA y un tensoactivo proporciona estabilidad y color.

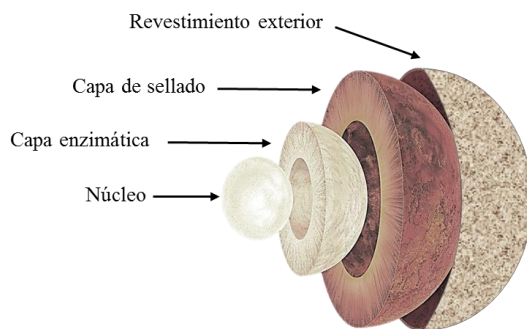


Figura 27. Composición del gránulo de DEFENZ™ 130BG.

3.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

A continuación se describen detalladamente cada una de las etapas implicadas en la preparación de los biosensores enzimáticos. Asimismo, se comentan las técnicas empleadas para la caracterización de los mismos. Finalmente se describe el procedimiento de medida en muestras sintéticas así como el método de referencia empleado para su validación.

▪ Evaluación de la actividad de la enzima OPH

La organofosforo-hidrolasa (EC 3.1.8.1) se encuentra entre las enzimas más utilizadas en la degradación de los agentes neurotóxicos y pesticidas organofosforados [197]. Es una metaloproteína con dos iones Zn^{2+} presentes. La información más reciente sobre la estructura cristalina de la proteína indica que su forma activa es un homodímero [198]. La OPH tiene un perfil de pH amplio (pH 8-10) con una actividad óptima a pH de 8.5 y temperatura de 50 °C.

La respuesta amperométrica de los biosensores compósitos de OPH depende de la actividad de la enzima inmovilizada en la superficie del electrodo. La actividad de la enzima OPH se evaluó por medidas espectrofotométricas por medio de un espectrofotómetro UV-VIS Evolución Thermo Scientific 605 y usando *p*-NP 10 mmol L⁻¹ como sustrato. La enzima OPH fue extraída del producto de descontaminación DEFENZ™ 130BG. El producto granulado contiene 2.0% m/m de proteína se disolvió en agua desionizada, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La dispersión con 100 mg/ml se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. Una alícuota del sobrenadante resultante se utilizó para los ensayos espectrofotométricos.

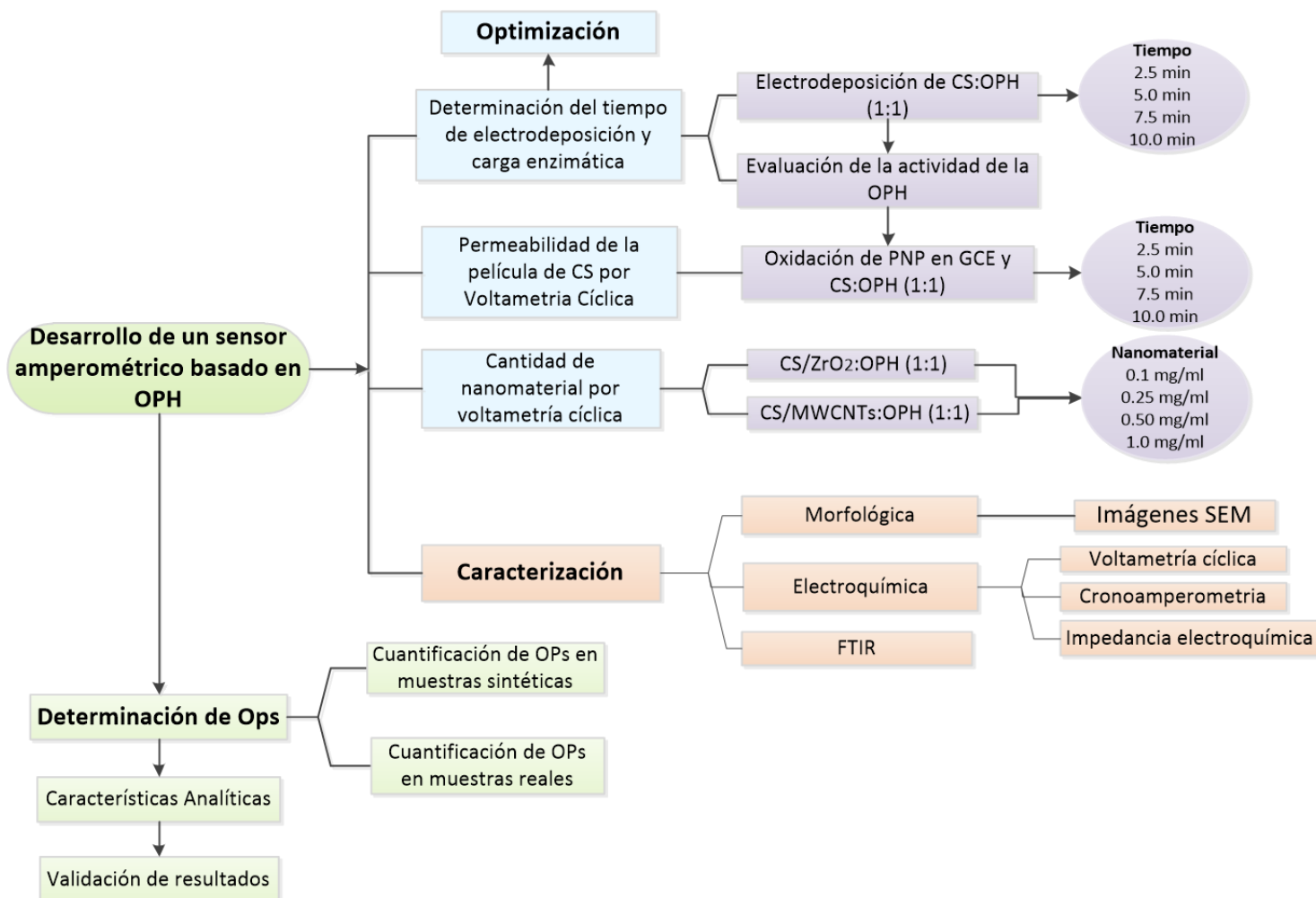
La actividad enzimática de la enzima inmovilizada se estimó midiendo el incremento de absorbancia a 400 nm de la solución del *p*-NP formado durante la hidrólisis del paraoxón. El cambio de absorbancia se produce cuando se introduce el electrodo modificado con OPH en una cubeta espectrofotométrica durante 1.0 minuto en 990 µL de una disolución agitada de tampón fosfato 0.1 mol L⁻¹ de pH 8.5 y 10 µL de sustrato paraoxón 10 mmol mL⁻¹. La respuesta obtenida es directamente proporcional a la cantidad de enzima activa en la

superficie del biosensor. La unidad de actividad enzimática (U) se definió como el aumento de la absorbancia de 0.001 por minuto a $\lambda=400$ nm bajo las condiciones de ensayo a pH 8.5 y 25°C en una mezcla de reacción de 1 ml que contiene paraoxón.

La actividad de la enzima se midió en la enzima libre y en la inmovilizada en cantidades equivalentes, considerándose la actividad de la OPH libre el 100%. Para el ensayo con la enzima libre se agregaron 980 μL de solución PBS 0.1 mol L^{-1} , pH 8.5.0, 10 μL solución enzimática OPH 100 mg ml^{-1} y 40 μL de sustrato paraoxón 10 mmol mL^{-1} en una cubeta espectrofotométrica.

3.3.1 PREPARACION DE BIOSENSORES NANOESTRUCTURADOS CON NANOTUBOS DE CARBONO DE PARED MULTIPLE Y NANOPARTICULAS DE OXIDO DE CIRCONIO

El diagrama de bloques siguiente ilustra el trabajo experimental planeado:



▪ Preparación de dispersiones para electrodeposición

Inicialmente, se preparó una solución de CS 0.2% m/v por disolución de la sustancia en CH_3COOH 0.1 mol L^{-1} y se sometió a ultrasonido por 30 min para acelerar el proceso de disolución. Luego, se prepararon dispersiones de CS con nanomateriales (MWCNTs y ZrO_2), añadiendo una determinada cantidad de nanomaterial en 1 ml de hidrogel CS 0.2% m/v y

fueron sonicadas por 10 minutos a 800 watt a temperatura ambiente. A continuación, se añadió una cantidad de solución enzimática (100 mg ml^{-1}) a cada una de las dispersiones nanocompuestas (enzima: dispersión 1:1), para obtener finalmente 4 dispersiones para la electrodeposición: (I) CS:OPH, (II) CS/ZrO₂:OPH, (III) CS/MWCNTs:OPH, (IV) CS/MWCNTs-ZrO₂:OPH.

▪ **Pretratamiento del electrodo de carbón vítreo**

Antes de llevar a cabo cada modificación de la superficie electródica, fue necesario aplicar un pretratamiento de limpieza para obtener una superficie “limpia” y reproducible. Para ello, el electrodo fue sucesivamente pulido con papel de lija abrasivo durante 1 minuto, lavado con agua destilada y desengrasado con etanol.

▪ **Modificación del electrodo**

Una vez aplicado al electrodo el pretratamiento de limpieza anterior, se procedió a la modificación de la superficie electródica, siguiendo las etapas que se describen a continuación:

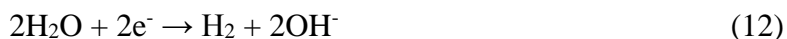
Después de que el electrodo limpio se secó al aire, se realizó la modificación del electrodo por electrodeposición en su superficie por una película biocompuesta, utilizando las siguientes dispersiones de deposición: (I) CS:OPH, (II) CS/ZrO₂:OPH, (III) CS/MWCNTs:OPH y (IV) CS/ZrO₂-MWCNTs:OPH. La electrodeposición del quitosano se llevó a cabo mediante la aplicación de un potencial constante de -3.0 V durante varios intervalos de tiempo (2.5; 5.0; 7.5 y 10 min).

El proceso de electrodeposición del quitosano se basa en tres etapas [199]:

1.- Protonación en solución ácida: etapa en la cual, el grupo amino presente en la unidad básica de quitosano es cargado positivamente con los iones H^+ presentes en la solución ácida en la cual se encuentra disuelto.



2.- Reacción catódica: reacción de reducción de las moléculas de H_2O sobre la superficie del cátodo para producir evolución de hidrógeno y grupos OH^- , los cuales aumentan el pH alrededor del cátodo.



3.-Neutralización del quitosano cargado positivamente.



El quitosano se vuelve insoluble cuando el pH es superior a su pKa (6.3). Como resultado, el hidrogel de quitosano incorporado con OPH, MWCNTs y ZrO_2 se electrodeposita localmente sobre la superficie del cátodo. Después de la deposición el electrodo modificado se retiró de la solución y fue lavado bajo tensión repetidamente con agua destilada para eliminar las partículas no unidas.

Después de dejar secar al aire, el electrodo modificado se mantuvo en vapor de en una disolución de glutaraldehído (GA) al 25% durante 15 min a temperatura ambiente, para llevar a cabo la reticulación del CS, que evita en gran medida la pérdida de enzima aumentando la estabilidad del biosensor. El exceso de glutaraldehído se eliminó por lavado del electrodo modificado en PBS pH 8.5, a 750 rpm durante 30 minutos. Por último, los sensores resultantes fueron almacenados en seco a $4.0\text{ }^\circ\text{C}$ hasta realizar los análisis posteriores. La ilustración esquemática del procedimiento de paso a paso de la fabricación de los sensores se muestra en la figura 28. Para los ensayos de permeabilidad de la película de CS, y determinación de las cantidades óptimas de nanomateriales, fue necesario la modificación del electrodo con las dispersiones antes mencionadas y albúmina de suero bovino (BSA) 1 mg mL^{-1} en lugar de OPH, en una relación (1:1) dispersión: BSA.

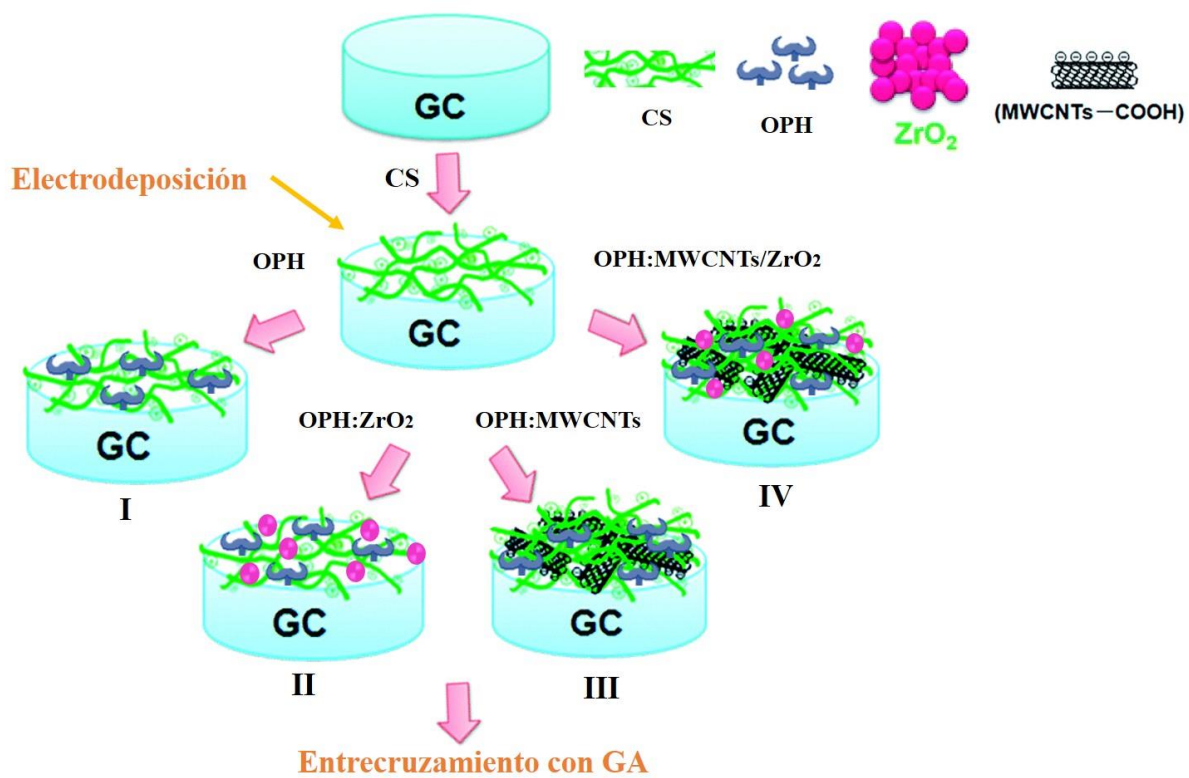


Figura 28. Ilustración esquemática de la modificación de los electrodos mediante electrodeposición de CS con diversos nanomateriales.

3.3.2 PREPARACION DE BIOSENSORES NANOESTRUCTURADOS CON NANOTUBOS DE CARBONO DE PARED MULTIPLE Y NANOPARTICULAS DE HIDROXIAPATITA

Para la preparación de estos sensores se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito con en el inciso 3.2.1 reemplazando las nanopartículas de ZrO_2 por las nanopartículas de HA.

▪ Modificación del electrodo

La modificación de la superficie del transductor electroquímico se realizó en un solo paso por electrodeposición simultánea de las mezclas: CS/HA y CS/MWCNT-HA con la enzima OPH, mezclados en una proporción de 1: 1. La electrodeposición se llevó a cabo aplicando un potencial constante de -3 V vs Ag, AgCl/KCl sat durante 5 min. Después de dejar secar al aire, el electrodo modificado se mantuvo en vapor de en una disolución de glutaraldehído al 25% durante 15 min a temperatura ambiente, para llevar a cabo la reticulación del CS. El exceso de glutaraldehído se eliminó por lavado del electrodo modificado en PBS pH 8.5, a 750 rpm durante 30 minutos. Por último, los sensores resultantes fueron almacenados en seco a $4.0\text{ }^\circ\text{C}$ hasta realizar los análisis posteriores. La superficie del electrodo modificado se puede ver en la figura 29. Se aplicó la misma técnica para la preparación de electrodos, modificada con una mezcla de CS y albúmina de suero bovino (BSA, 1 mg mL^{-1}), en lugar de OPH. Estos sensores fueron utilizados para las mediciones no enzimáticas.

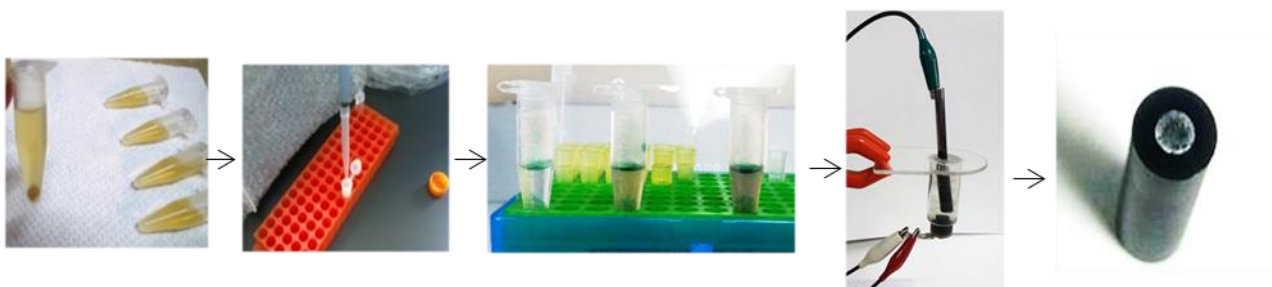


Figura 29. Esquema de modificación del electrodo por electrodeposición.

3.3.3 TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS DE ANÁLISIS

Las técnicas empleadas durante el desarrollo de este trabajo han sido voltamperometría cíclica, cronoamperometría, impedancia electroquímica y amperometría.

Voltamperometría cíclica

Las curvas de intensidad-potencial realizadas para comprobar el comportamiento de los electrodos con los diferentes depósitos nanoestructurados, se obtuvieron sumergiendo los electrodos en la disolución reguladora correspondiente y midiendo la respuesta voltamperométrica a una velocidad de barrido de 0.1V s^{-1} . Posteriormente se midió la respuesta voltamperométrica del electrodo en la misma disolución reguladora en presencia de una determinada concentración del analíto con la disolución en reposo.

▪ **Cronoamperometría**

Se ha determinado el área electroquímica y la constante de velocidad catalítica para cada uno de los electrodos modificados mediante cronoamperometría empleando disoluciones de *p*-NP de diferentes concentraciones (0.0, 0.05 y 0.1 mM) en una celda en solución PBS 0.1 mol L^{-1} . Se registró, en cada caso, el amperograma obtenido a un potencial constante de -0.40 V .

▪ **Impedancia electroquímica**

Se seleccionó la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) como una técnica de elección para la evaluación de las propiedades de transferencia de electrones de los electrodos modificados. Para la obtención de los espectros de impedancia se sumergió el electrodo de trabajo, el de referencia y el auxiliar en una celda que contenía una mezcla (1:1) de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ y $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1.0 mmol L^{-1} (Sigma) en solución PBS 0.1 mol L^{-1} . Las medidas se han realizado aplicando una tensión de modulación de 10 mV y un potencial de $+0.20\text{ V}$ vs Ag, AgCl/KCl(sat). La impedancia se ha medido en el intervalo de frecuencia comprendido entre 10^{-1} Hz a 10^5 Hz . Así, con fines comparativos, se han obtenido los espectros de impedancia del electrodo de carbono vítreo, así como de las superficies modificadas con CS,

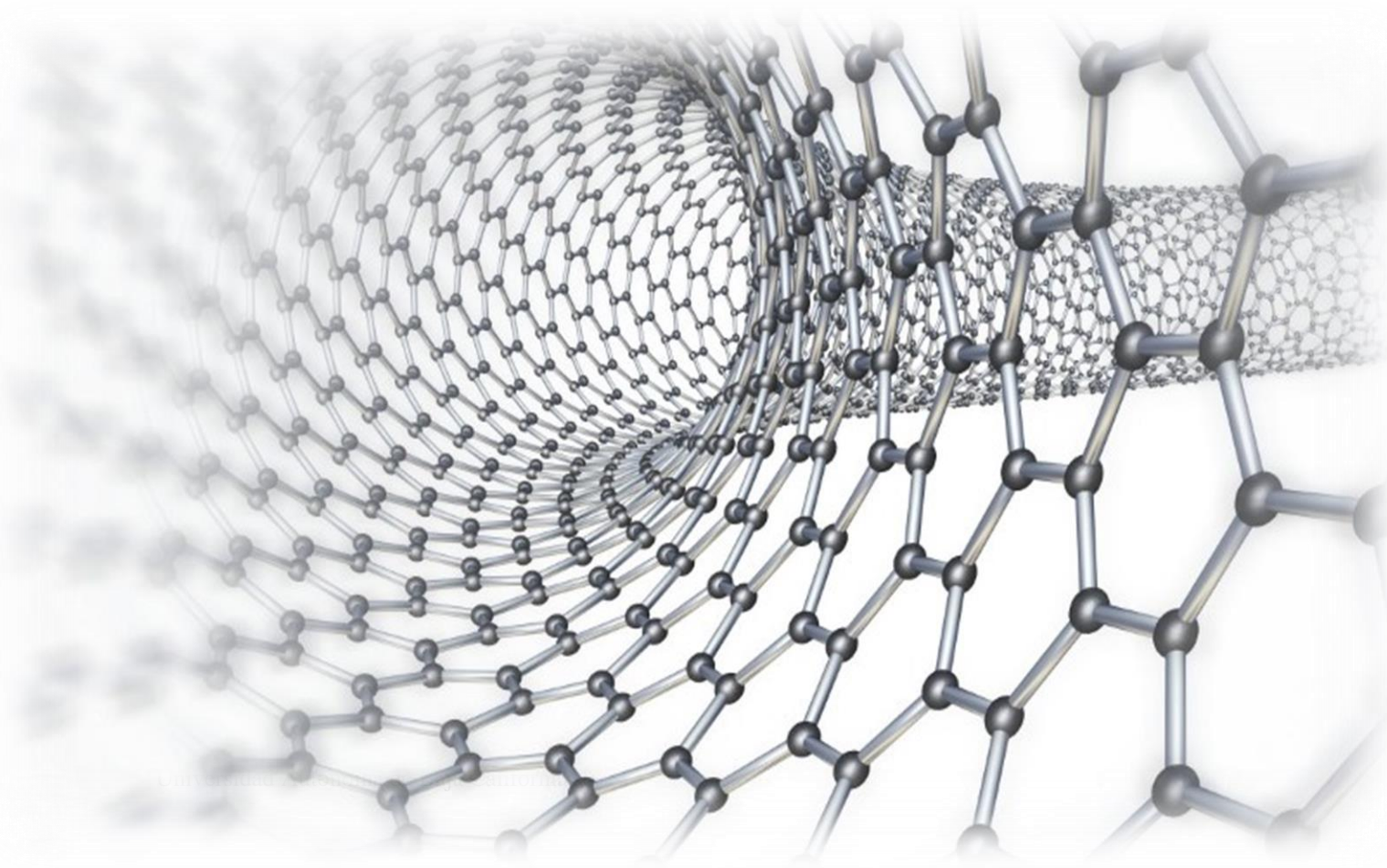
nanopartículas de ZrO_2 , MWCNTs, y OPH. Los experimentos de espectroscopia de impedancia electroquímica se han realizado por medio de un analizador electroquímico modelo 440A CH Instruments Inc., los EEUU).

▪ **Amperometría para la determinación de OPs**

La determinación de paraoxón (como modelo de OPs) se realiza mediante amperometría en disoluciones agitadas, aplicando el potencial deseado. Para ello, el biosensor desarrollado se sumerge en la celda electroquímica que contiene 10 mL de la disolución tampón PBS 0.1 mol L^{-1} , de pH 8.5 y se aplica un potencial de +1.0 V vs. Ag, AgCl/KCl sat, (potencia de oxidación de *p*-NP) agitando la disolución a velocidad constante. En estas condiciones, cuando la corriente de medida se estabiliza, se añade con ayuda de una micropipeta, el volumen deseado de la disolución patrón de paraoxón, monitorizándose la intensidad de corriente de la oxidación del *p*-NP liberado por la enzima luego de la hidrólisis de paraoxón, la cual se relaciona con la concentración de paraoxón. A continuación, se siguen añadiendo alícuotas de la disolución patrón paraoxón y se sigue registrando la corriente de oxidación hasta que se alcanza el estado estacionario. Entre una medida y otra no es necesario aplicar ningún tratamiento al biosensor.

4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



En este trabajo se han desarrollado diferentes configuraciones de biosensores enzimáticos, basados en electrodos modificados por medio de la electrodeposición de quitosano con nanomateriales. A continuación se discuten los aspectos más relevantes de los resultados obtenidos, con los biosensor de OPH utilizando diferentes superficies modificadas CS, MWCNTs, ZrO₂NPs, y HANPs para la determinación de pesticidas organofosforados.

4.1 BIOSENSORES NANOESTRUCTURADOS CON NANOTUBOS DE CARBONO DE PARED MULTIPLE Y NANOPARTICULAS DE OXIDO DE CIRCONIO

4.1.1 OPTIMIZACIÓN DE LAS PELÍCULAS BIOCAMPUESTAS

La inmovilización de la enzima OPH por atrapamiento en hidrogel con diferentes nanomateriales se llevó a cabo mediante la técnica de electrodeposición de CS sobre la superficie de un electrodo de carbón vítreo. Con el fin de seleccionar la composición óptima de la película enzimática, se realizaron estudios mediante técnicas analíticas voltamperometría cíclica y espectrofotometría UV-visible. Los parámetros estudiados fueron: efecto del tiempo de deposición, permeabilidad y cantidad de nanomateriales atrapados en la biopelícula de quitosano.

4.1.1.1 Tiempo de electrodeposición y carga enzimática

En primer lugar se optimizó el tiempo de electrodeposición, parámetro que afecta directamente la cantidad de enzima inmovilizada. Este experimento se realizó variando el tiempo de electrodeposición (2,5 min, 5 min, 7,5 min y 10 min) y los resultados se muestran en la figura 30A. Como era de esperar, la actividad de la enzima inmovilizada (evaluada espectrofotométricamente al medir la tasa de hidrólisis de paraoxón), aumentó inicialmente, con el aumento del tiempo de deposición de 2.5 min a 5 min, con valores de 41.7 U y 82.6 U, respectivamente. Este hecho sugiere que el aumento del tiempo de deposición favorece la inmovilización de una mayor cantidad de enzima sobre la superficie del electrodo. Por el contrario, los tiempos de deposición prolongados (7,5 minutos y 10 minutos) llevaron a una disminución significativa de la actividad de la enzima (57,3 U y 38,3 U, respectivamente).

La disminución de la actividad enzimática observada, podría atribuirse a la aparición de restricciones difusionales. Dado que el aumento del tiempo de electrodeposición puede originar la formación de multicapas enzimáticas sobre la superficie electródica (como se demuestra en la Figura 30B), donde una buena porción de enzimas no tenga capacidad de transformar el analito debido a problemas estéricos. Como se muestra en la figura 30A, la máxima actividad de la enzima fue obtenida con 5 minutos, por lo cual este valor fue considerado como óptimo.

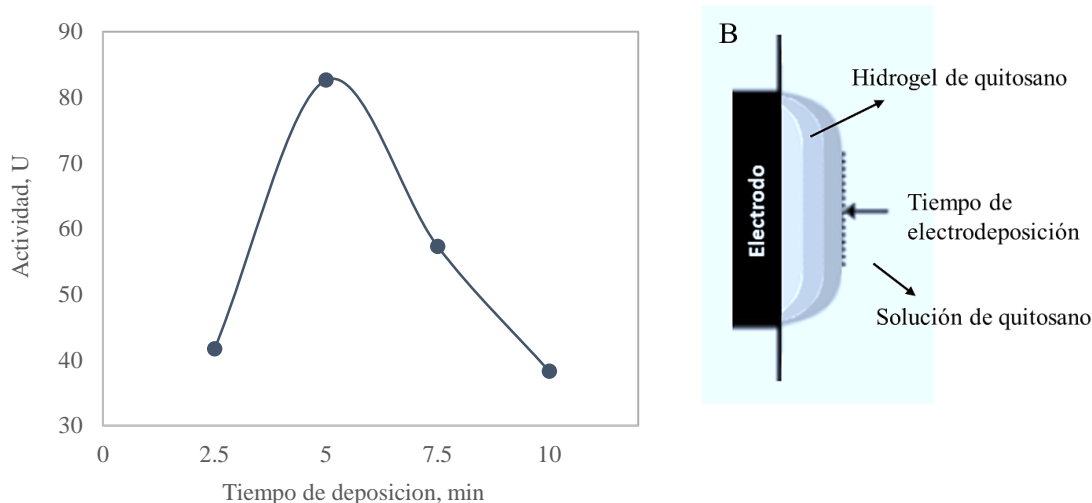


Figura 30. A) Comportamiento de la actividad de OPH en función del tiempo de electrodeposición de CS a 2.5, 5.0, 7.5 y 10 min. (B) ilustración del incremento del grosor de la película con CS:OPH con el tiempo de electrodeposición.

4.1.1.2 Determinación de la permeabilidad del recubrimiento electródico

La permeabilidad de la película de quitosano electrodepositada se evaluó mediante el estudio del comportamiento electroquímico de *p*-NP, utilizando un electrodo de GCE modificado con CS/BSA. Se utilizó *p*-NP como sustancia electroactiva para realizar las mediciones electroquímicas, ya que es el producto de la hidrólisis de pesticida paraoxón catalizada por OPH.

Los voltamogramas cíclicos registrados para la oxidación de *p*-NP con el electrodo CGE y el electrodo modificado con CS:BSA con los distintos tiempos de electrodeposición de película, se muestran en la Figura 31A. Se observó una disminución evidente de la corriente

de pico para la oxidación de *p*-NP con el incremento del tiempo de electrodeposición. Esta disminución demuestra claramente que la difusión de *p*-NP a través de la película es obstaculizada, debido a la reducción de la permeabilidad de la biopelícula, por el aumento de su espesor.

La permeabilidad de la biopelícula se expresó como la relación de la corriente de pico anódico (I_p) para la oxidación de *p*-NP con el CGE y con el CGE modificado con CS/BSA (I_p/I_{p0}). En la Figura 31B puede observarse una disminución importante de esta relación con el aumento del tiempo de electrodeposición para la formación de la película con 7.5 min y 10.0 min. Estos datos concuerdan con los resultados de la actividad enzimática. Por lo tanto, los ensayos posteriores para la construcción de electrodos enzimáticos se realizaron aplicando un tiempo de electrodeposición de 5 min, ya que presentó una relación intermedia de permeabilidad.

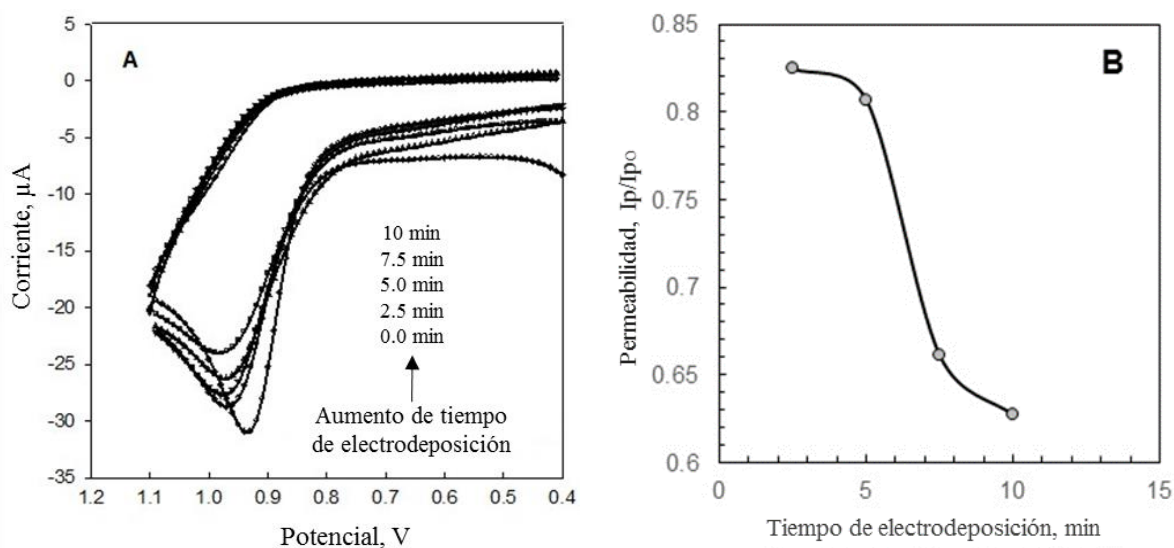


Figura 31. A) Voltamogramas cíclicos de *p*-NP 1 mmol L^{-1} con el GCE y con el GCE modificado con CS:BSA, aplicando un tiempo de electrodeposición de CS de 2.5, 5.0, 7.5 y 10 min. (B) Comportamiento de la permeabilidad de película CS:BSA en función del tiempo de electrodeposición.

4.1.1.3 Cantidad óptima de Nanomateriales

Otro factor relevante que afecta el desempeño de los biosensores es la cantidad de nanomaterial atrapado en el quitosano. El efecto de la carga de ZrO_2NPs y de los MWCNTs se investigó por voltametría cíclica mediante la oxidación de $p\text{-NP}$ 0.1 mmol L^{-1} en tampón PBS 0.1 mol L^{-1} . La respuesta de los electrodos modificados se evaluó variando la cantidad de ZrO_2NPs y de los MWCNTs con las concentraciones de 0.1, 0.25, 0.5 y 1 mg mL^{-1} para cada uno de los electrodos de carbón vítreo con CS/ ZrO_2 :BSA, CS/MWCNTs:BSA, y CS/MWCNTs- ZrO_2 :BSA. Las curvas voltametría cíclica registradas de la oxidación de $p\text{-NP}$ para el electrodo y los electrodos modificados con las mezclas CS/ ZrO_2 :BSA, CS/MWCNTs:BSA se muestran en la figuras 32 y 33 respectivamente.

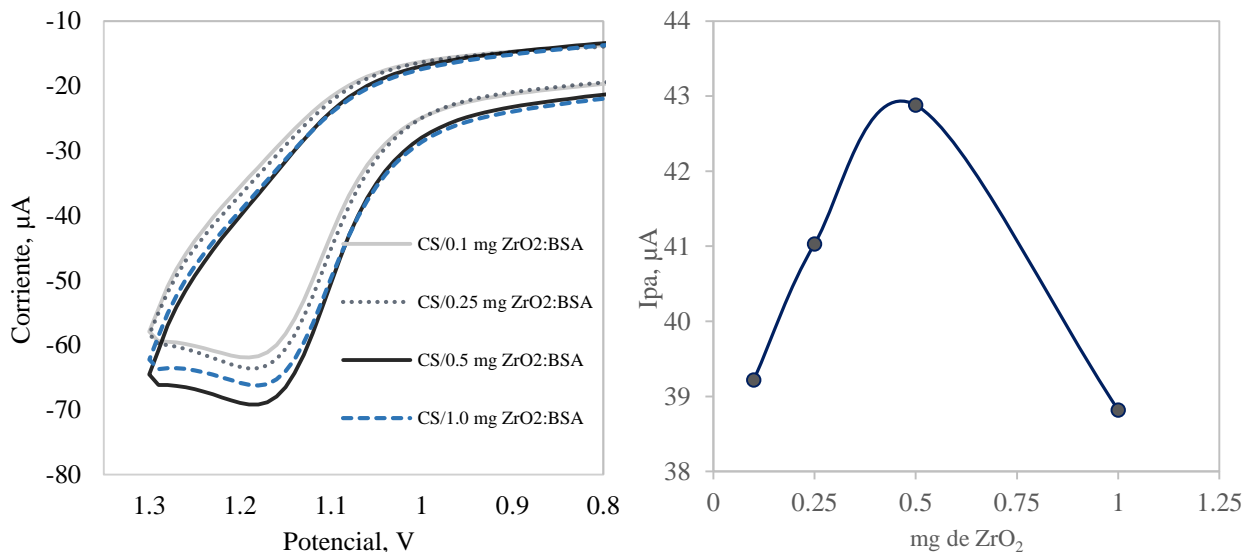


Figura 32. A) Voltamogramas cíclicos de 0.1 mmol L^{-1} $p\text{-NP}$ en PBS 0.1 mol L^{-1} , pH 8.5 de GCE por electrodeposición de 5 min de CS/ ZrO_2 :BSA con 0.1, 0.25, 0.5 y 1 mg mL^{-1} de ZrO_2 . B) Comportamiento de las corrientes de pico anódico para las nanopartículas de ZrO_2 .

Se previó que la respuesta del sensor aumentaría con el aumento de la cantidad del nanomaterial, debido al aumento en el área de superficie de GCE y su actividad electrocatalítica, así como a la mejora de la electroconductividad de las películas de nanocompuestas de quitosano [200]. Se observó un incremento de la corriente pico anódico de $p\text{-NP}$ para un aumento de la concentración de ZrO_2NPs hasta 0.5 mg mL^{-1} y para un aumento de la concentración de MWCNTs hasta 0.25 mg mL^{-1} .

El aumento adicional de la cantidad de nanomateriales condujo a una disminución de la corriente de pico anódico dada la aparición de impedimentos de difusión y de transferencia de electrones por la cantidad excesiva de nanomateriales, según lo informado por otros autores [200, 201].

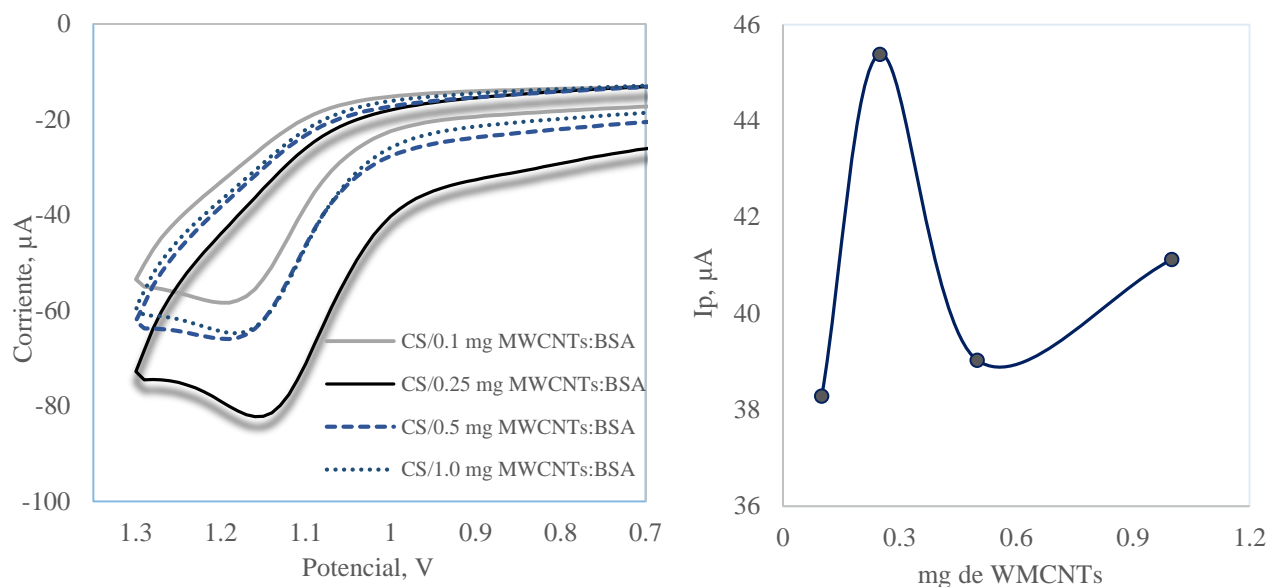


Figura 33. A) Voltamogramas cíclicos de 0.1 mmol L^{-1} p-NP en PBS 0.1 mol L^{-1} , pH 8.5 de GCE modificado por electrodeposición de 5 min de CS/MWCNTs:BSA con 0.1, 0.25, 0.5 y 1 mg mL^{-1} de MWCNTs. B) Comportamiento de las corrientes de pico anódico para las nanopartículas de MWCNTs.

Por otra parte, un mayor contenido de nanopartículas no genera un aumento en la intensidad de respuesta analítica de los electrodos, lo cual puede estar asociado a una menor estabilidad de la interfaz sensora, provocando el desprendimiento de estas nanopartículas de la superficie del electrodo. Por lo tanto, la carga óptima de las películas nanocompuestas de quitosano aplicados para la fabricación de los sensores con las mezclas CS/ZrO₂:BSA, CS/MWCNTs:BSA y CS/MWCNTs-ZrO₂:BSA fueron 0.5 mg mL^{-1} de ZrO₂ y 0.25 mg mL^{-1} de MWCNTs, respectivamente.

4.1.1.4 Caracterización electroquímica de los electrodos modificados con nanomateriales

Los estudios realizados en este apartado están encaminados a caracterizar y la composición del recubrimiento de la superficie electródica con las mezclas y en condiciones optimizadas: CS:BSA, CS/(0.5mg ml⁻¹)ZrO₂:BSA, CS/(0.25mg ml⁻¹)MWCNTs:BSA y CS/(0.5mg ml⁻¹)ZrO₂-(0.5mg ml⁻¹)MWCNTs:BSA. Para ello, se realizaron estudios electroquímicos con voltametría cíclica, cronoamperometría e impedancia electroquímica. Los resultados obtenidos se comparan con los correspondientes a la misma superficie en ausencia de las mezclas de quitosano con nanomateriales, con objeto de poner de manifiesto las diferencias y las ventajas del diseño basado en el empleo de nanopartículas.

a. Caracterización por Voltametría cíclica

La caracterización electroquímica de los electrodos modificados se logró registrando y analizando sus respuestas por voltametría cíclica a la oxidación de *p*-NP. En la Figura 34, se recogen los voltamperogramas cíclicos registradas de la oxidación de *p*-NP correspondientes con GCE y del GCE modificado con las cuatro mezclas; CS:BSA, CS/(0.5mg ml⁻¹)ZrO₂:BSA, CS/(0.25mg ml⁻¹)MWCNTs:BSA y CS/(0.5mg ml⁻¹)ZrO₂-(0.5mg ml⁻¹)MWCNTs:BSA, sumergidos en una disolución de *p*-NP 0.1 mmol L⁻¹ en tampón PBS 0.1 mol L⁻¹ y a una velocidad de barrido de potencial de 0.1V s⁻¹. Cada experimento se realizó por triplicado.

Las curvas voltamétricas registradas, demostraron que la modificación de los electrodos provocó un cambio de potencial de pico anódico (E_{pa}) que varió de 10 mV con CS/BSA a 40 mV para CS-ZrO₂-MWCNTs/BSA, en comparación con el potencial de pico de la oxidación de *p*-NP con el ECG sin modificación. El desplazamiento de los potenciales de pico anódico fue positivo, lo que indica que la oxidación de *p*-NP en electrodos modificados requirió mayores sobrepotenciales, aumentando en el orden: CS:BSA, CS/(0.5mg ml⁻¹)ZrO₂:BSA, CS/(0.25mg ml⁻¹)MWCNTs:BSA y CS/(0.5mg ml⁻¹)ZrO₂-(0.5mg ml⁻¹)MWCNTs:BSA.

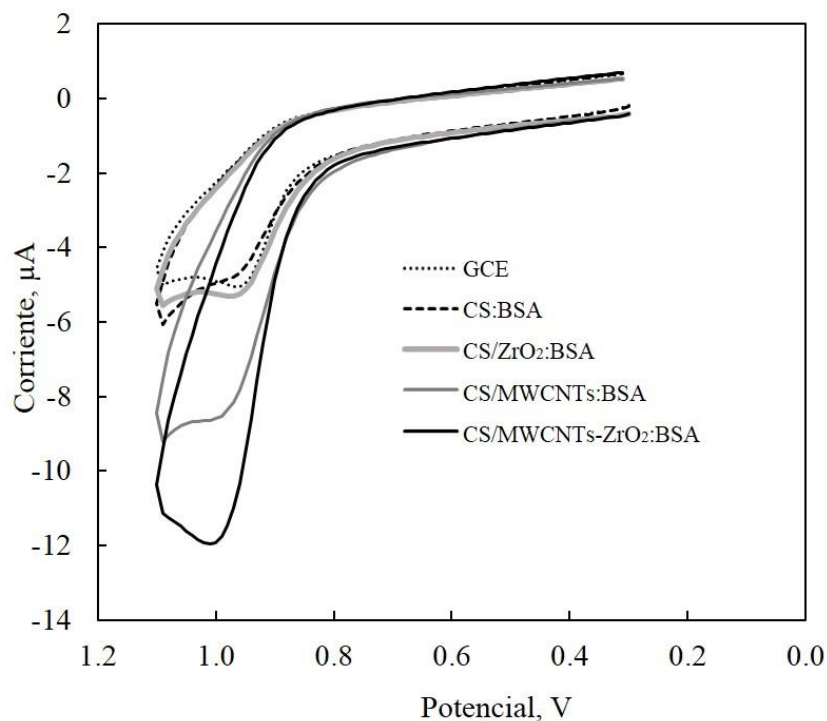


Figura 34. Voltamogramas cíclicos de 0.1 mmol L^{-1} *p*-NP en PBS 0.1 mol L^{-1} , pH 8.5 con ECG y ECG modificado con: CS/BSA, CS- 0.5 mg ZrO_2 /BSA, CS- 0.25 mg MWCNTs /BSA y CS- 0.50 mg ZrO_2 - 0.25 mg MWCNTs /BSA.

La modificación de electrodos resultó también en un cambio de corriente pico anódico (I_{pa}) (datos mostrados en la tabla 6), es decir, disminuyó con la aplicación de CS/BSA, y mostró claramente un aumento con la aplicación de CS/BSA, CS- ZrO_2 /BSA, CS/MWCNTs:BSA y CS/ ZrO_2 -MWCNTs:BSA en comparación con el GCE sin modificación.

La disminución de corriente con CS:BSA se atribuyó al incremento de la resistencia de la película y la aparición de impedimentos de difusión y de transferencia de electrones por la cantidad excesiva de nanomateriales, según lo informado por otros autores Qui et al. (2008) y Demirkol et al. (2011) [200, 201]. El aumento de la corriente de pico anódico de *p*-NP podría atribuirse al aumento de la superficie activa de los electrodos modificados y a la mayor capacidad catalítica por la presencia de los nanomateriales ZrO_2 NPs y MWCNTs [202].

Tabla 6. Valores promedios de corriente de pico anódico (I_{pa}) de *p*-NP con GCE y con los electrodos modificados: CS/BSA, CS/ZrO₂:BSA, CS/MWCNTs:BSA y CS/ZrO₂-MWCNTs:BSA.

Electrodo	I _{pa} (μA)
GCE	3.95
CS:BSA	2.24
CS/0.5 mg ZrO ₂ :BSA	4.32
CS/0.25 mg MWCNTs: BSA	7.85
CS/0.25 mg MWCNTs-0.5 mg ZrO ₂ :BSA	10.05

b. Caracterización por cronoamperometría: área electroquímica y constante de velocidad catalítica

El área electroquímica o área activa de un electrodo compuesto no corresponde en principio al área geométrica, puesto que la superficie está compuesta por material aislante y material conductor. Dependiendo de la proporción y distribución de ambos materiales en la superficie, el área activa será diferente.

El cálculo del área electroquímica activa de los electrodos se ha llevado a cabo mediante cronoamperometría, empleando una disolución de *p*-NP 0.1 mmol L⁻¹ en tampón PBS 0.1 mol L⁻¹, sin agitación y aplicando un salto de potencial de 0.6 a 1.0 V. La variación de la corriente con el tiempo viene dada por la ecuación de Cottrell.

La ecuación de Cottrell es derivada de la segunda ley de Fick de difusión, y predice la variación de la corriente con el tiempo, cuando un potencial es aplicado bajo condiciones de grandes sobrepotenciales. Esta ecuación es limitada a procesos de deposición controlados por difusión del complejo iónico sobre la superficie del electrodo. El sobrepotencial en el cual la reacción ocurre debe ser lo suficientemente grande para asegurar el rápido decrecimiento de la especie electroactiva (C*) en la superficie del electrodo, tal que el proceso sea controlado por el gradiente de concentración entre el seno de la solución y la superficie del electrodo [203].

$$I(t) = \frac{nFAD_{Ox}^{1/2}C^*}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad (14)$$

Donde;

I = corriente, (A).

n = número de transferencia de electrones.

F = constante de Faraday, (96 485 C mol⁻¹).

A = área geométrica del electrodo, (cm²).

C* = concentración de *p*-NP, (mol ml⁻¹).

D = coeficiente de difusión *p*-NP, (9.16x10⁻⁶ cm² s⁻¹) [204].

t = tiempo transcurrido, (s).

Los datos obtenidos por cronoamperometría fueron utilizados para calcular los valores de las áreas activa de los electrodos, a partir de la pendiente de la representación de la intensidad de corriente frente a la inversa de la raíz cuadrada del tiempo.

Los cronoamperogramas correspondientes a disoluciones de *p*-NP de diferente concentración empleando el electrodo modificado con CS/MWCNTs-ZrO₂:BSA son presentadas en la figura 35. Asimismo, se muestran las representaciones de la corriente en función de la inversa de la raíz cuadrada del tiempo.

La cronoamperometría también se empleó para evaluar la constante de velocidad catalítica (*kh*), para la reacción entre el *p*-NP y la los electrodos modificados acuerdo con el método de Galus (1976) [205], a partir de la pendiente de las gráficas I_C/I_L frente a t^{1/2} (Figura 35 B), descritas por la siguiente ecuación:

$$\frac{I_C}{I_L} = \sqrt{\pi k_h C t} \quad (15)$$

Donde;

I_C = corriente catalítica de la oxidación de *p*-NP en los electrodos modificados, (A).

I_L = corriente limitante ausencia de *p*-NP, (A).

k = constante de velocidad catalítica, (mol L⁻¹ s⁻¹).

C = concentración de *p*-NP, (mol L⁻¹).

t = tiempo transcurrido, (s).

Donde I_C es la corriente catalítica de la oxidación de *p*-NP en los electrodos modificados en A, I_L es la corriente limitante ausencia de *p*-NP en amperios, k es la constante de velocidad catalítica (mol L⁻¹ s⁻¹), C es la concentración de *p*-NP (mol L⁻¹), y t es el tiempo transcurrido (s).

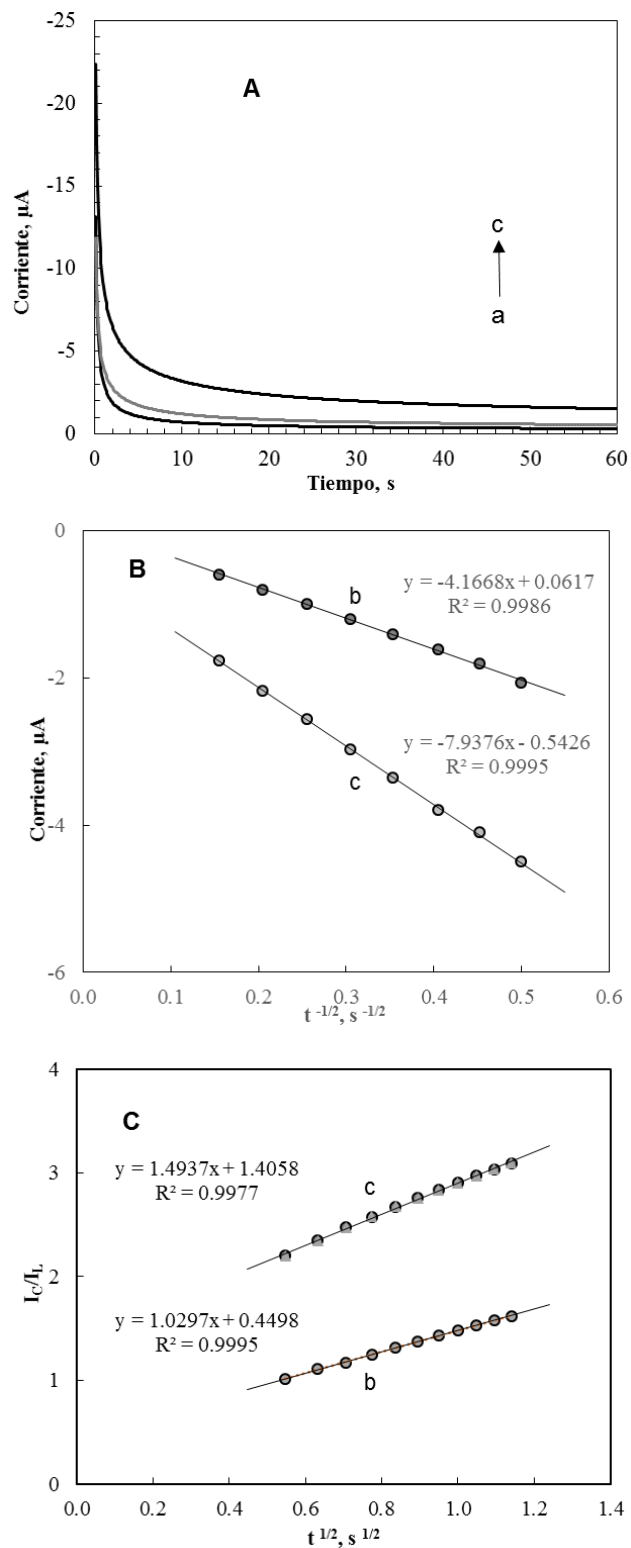


Figura 35. (A) Cronoamperogramas obtenidos con el GCE modificado con CS/MWCNTs-ZrO₂:BSA en PBS 0.1 mol L⁻¹, pH 8.5. Potencial de 400 mV. Concentración de p-NP: (a) 0 mmol L⁻¹; (b) 0.05 mmol L⁻¹; (c) 0.1 mmol L⁻¹. (B) Gráficas de Cottrell y (C) gráficas I_c/I_c vs. $t^{1/2}$ derivadas de los cronoamperogramas.

La constante de velocidad del proceso catalítico k_h , se puede calcular con la ecuación 15. A partir de la pendiente de las gráficas I_c/I_L frente a $t^{1/2}$, el valor de k_h puede calcularse simplemente para una concentración dada de sustrato (Figura 35C). Los valores promedios calculados de la constante de velocidad del proceso catalítico para la oxidación de *p*-NP se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Valores promedios del área electroquímicamente y k_h de la oxidación de *p*-NP para el GCE modificado y sin modificación.

Electrodo	Área Activa, mm ²	Constante de velocidad Catalítica, L mol ⁻¹ s ⁻¹
GCE	19.65	1.79 x10 ³
CS:BSA	14.93	1.72 x10 ³
CS/ZrO ₂ :BSA	22.66	1.84 x10 ³
CS/MWCNTs:BSA	24.38	5.02 x10 ³
CS/MWCNTs-ZrO ₂ :BSA	24.65	7.12 x10 ³

Los datos presentados en la Tabla 7 demuestran que el atrapamiento de nanopartículas de ZrO₂ y MWCNTs en la película de quitosano produjo un aumento de 1.52 y 1.63 veces del área activa de los electrodos CS/ZrO₂:BSA y CS/MWCNTs:BSA respectivamente, en comparación con la superficie electroactiva del electrodo de carbón vítreo modificado solo con CS.

La modificación adicional de la CS-MWCNTs con nanopartículas de ZrO₂ no resultó en un aumento significativo de la superficie electroactiva de la GCE. Sin embargo, dio como resultado una importante mejora de la capacidad catalítica del CGE modificado con CS-ZrO₂-MWCNTs:BSA, observándose un aumento de 4.14, 3.87 y 1.41 veces de la constante de velocidad catalítica de la oxidación de *p*-NP comparado CS/BSA, CS/ZrO₂ y CS/MWCNTs, respectivamente. Estos datos revelan la acción sinérgica de las nanopartículas de ZrO₂ y los MWCNTs como mediadores de transferencia de electrones [206].

c. Caracterización de las superficies electrónicas mediante espectroscopía de impedancia electroquímica

La espectroscopia de impedancia electroquímica es una técnica de gran utilidad para investigar las características superficiales de electrodos modificados. En este trabajo se empleó esta técnica para estudiar las propiedades de transferencia de electrones de los electrodos modificados con cuatro películas bionanocompuestas: CS:OPH, CS/ZrO₂:OPH, CS/MWCNTs:OPH y CS/ZrO₂-MWCNTs:OPH. Para ello, se registraron los espectros de impedancias de los electrodos correspondientes, empleando distintas proporciones los nanomateriales. En la figura 36, se presentan los diagramas de Nyquist obtenidos empleando los electrodos modificados con las biopelículas electrodepositadas.

En la Tabla 8 se recogen los valores de la resistencia a la transferencia de carga correspondientes a los diagramas de Nyquist. Como puede observarse, a medida que se van incorporando diferentes nanomateriales a la superficie electrónica, va disminuyendo el diámetro del semicírculo (R_{ct}) que aparece en la zona de altas frecuencias del diagrama de Nyquist.

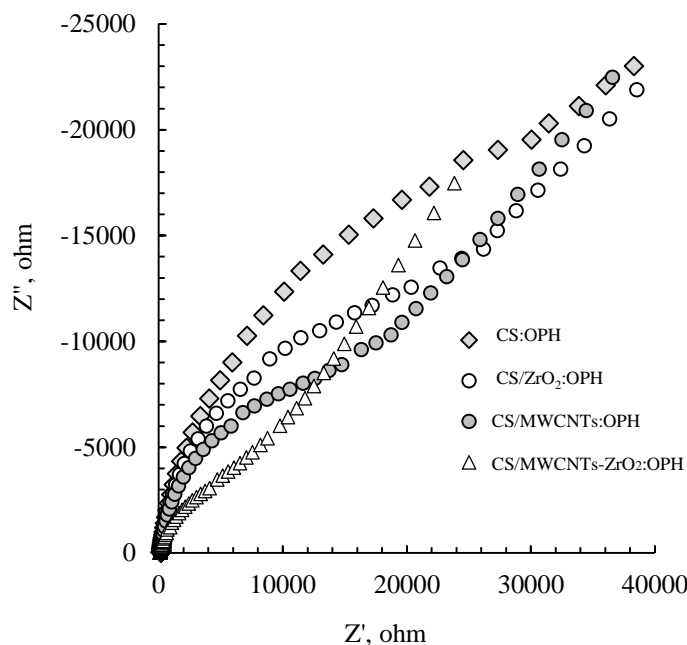


Figura 36. Diagramas de Nyquist de sensores: CS:OPH/GCE, CS/ZrO₂:OPH/GCE, CS/MWCNTs:OPH/GCE y CS/MWCNTs-ZrO₂:OPH/GCE, medidas realizadas en medio Fe(CN)₆^{4-/3-} (1:1) 1.0 mmol L⁻¹ en PBS (0.1 mol L⁻¹, pH 8.5).

Esta disminución de R_{ct} indica la mejora sistemática de la eficiencia en el proceso de transferencia de electrones en los electrodos. Este efecto se atribuye a las propiedades electrocatalíticas de los nanomateriales, así como a la mejora de la conductividad de la película de quitosano en presencia de ZrO_2 y/o MWCNTs. Estos resultados obtenidos mediante espectroscopia electroquímica de impedancia concuerdan cualitativamente con los observados utilizando voltamperometría cíclica, donde se obtiene una importante mejora de la sensibilidad cuando se incorpora el nanomaterial a la matriz.

Tabla 8. Comparación de la resistencia a la transferencia de carga de los diferentes electrodos modificados.

Electrodo	R_{ct}, Ω
CS:OPH	14.8×10^2
CS/ ZrO_2 :OPH	11.2×10^2
CS/MWCNTs:OPH	7.2×10^2
CS/MWCNTs- ZrO_2 :OPH	6.6×10^2

4.1.1.5. Caracterización superficial de los electrodos mediante SEM

La figura 37 muestra las micrografías SEM a 1000x de aumento, de cada uno de los electrodos modificados películas bionanocompuestas: (I) CS:OPH, (II) CS/ ZrO_2 :OPH y (III) CS/MWCNTs:OPH y (IV) CS/MWCNTs- ZrO_2 :OPH.

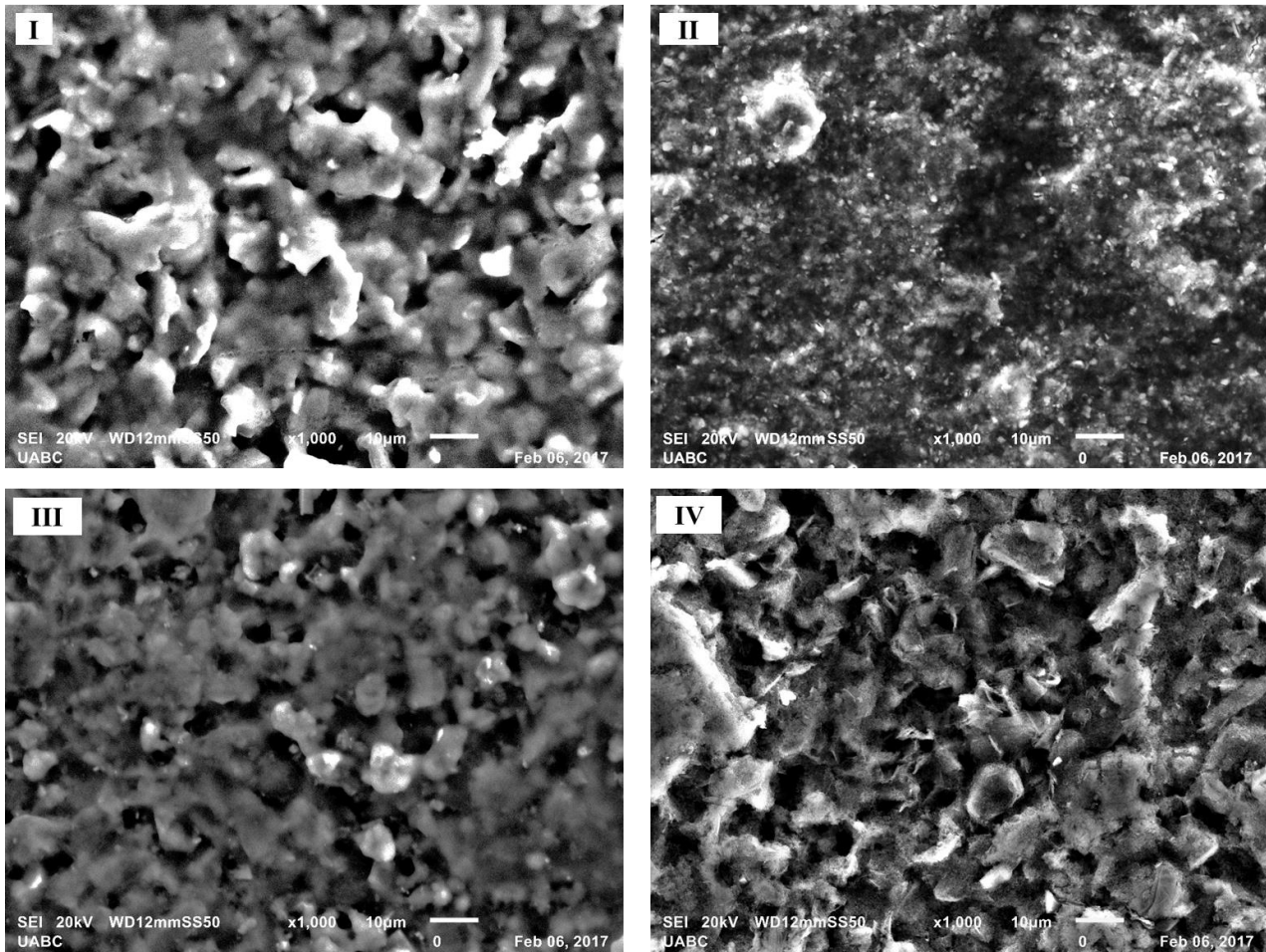


Figura 37. Imágenes SEM de las (I) CS:OPH/GCE, (II) CS/ZrO₂:OPH/GCE, (III) CS/MWCNTs:OPH/GCE y (IV) CS/MWCNTs-ZrO₂:OPH/GCE con un aumento de 1000X, voltaje de aceleración de 20.0 kV y resolución de 10 µm.

La imagen SEM 37.I, muestra que la superficie del GCE modificado con CS:OPH es muy porosa y abierta, y presenta formas globulares, que indican la efectiva inmovilización de la enzima. La incorporación de nanopartículas de ZrO₂ (figura II) en las películas de CS provocó cambios en la morfología, como el aplanamiento y suavizado de la superficie de la película debido a la dispersión homogénea de las nanopartículas de ZrO₂. La distribución regular de ZrO₂ se debe a las interacciones electrostáticas entre el CS catiónico y las nanopartículas de ZrO₂ cargadas superficialmente.

La figura 37.III presenta la superficie de GCE modificada con CS/MWCNTs:OPH. La película porosa tiene una gran área de superficie y se puede observar la distribución homogénea de los MWCNTs en forma de pequeños paquetes y como estructuras tubulares

formando una red tridimensional, esto se puede explicar debido a la envoltura de los nanotubos con las cadenas de CS y el acoplamiento covalente de los nanotubos carboxilados con los grupos amina libres del quitosano.

La imagen IV muestra que las películas preparadas con CS/MWCNTs-ZrO₂:OPH presentan una estructura de capas corrugadas y superpuestas, también se observa una mayor rugosidad de las superficies reforzadas con nanomateriales, en comparación con la que solo fue modificada con quitosano (figura 37.I). Esto indica las mejoras en las propiedades mecánicas y en la permeabilidad del recubrimiento electródico. Estas biopelículas electrodepositadas híbridas y homogéneas con características reproducibles, superficie aumentada y actividad catalítica mejorada son adecuadas para el desarrollo de sensores electroquímicos.

4.1.1.6. Espectros Infrarrojo de electrodos modificados

Para investigar la naturaleza química de las películas enzimáticas electrodepositadas se llevó a cabo una caracterización mediante espectrofotometría de absorción en el infrarrojo. Este estudio se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.1. Los espectros de Infrarrojo por Transformadas de Fourier (FTIR) de CS, OPH, ZrO₂ y MWCNTs-COOH, así como de las mezclas CS:OPH, CS/ZrO₂:OPH, CS/MWCNTs:OPH y CS/MWCNTs-ZrO₂:OPH se describen a continuación.

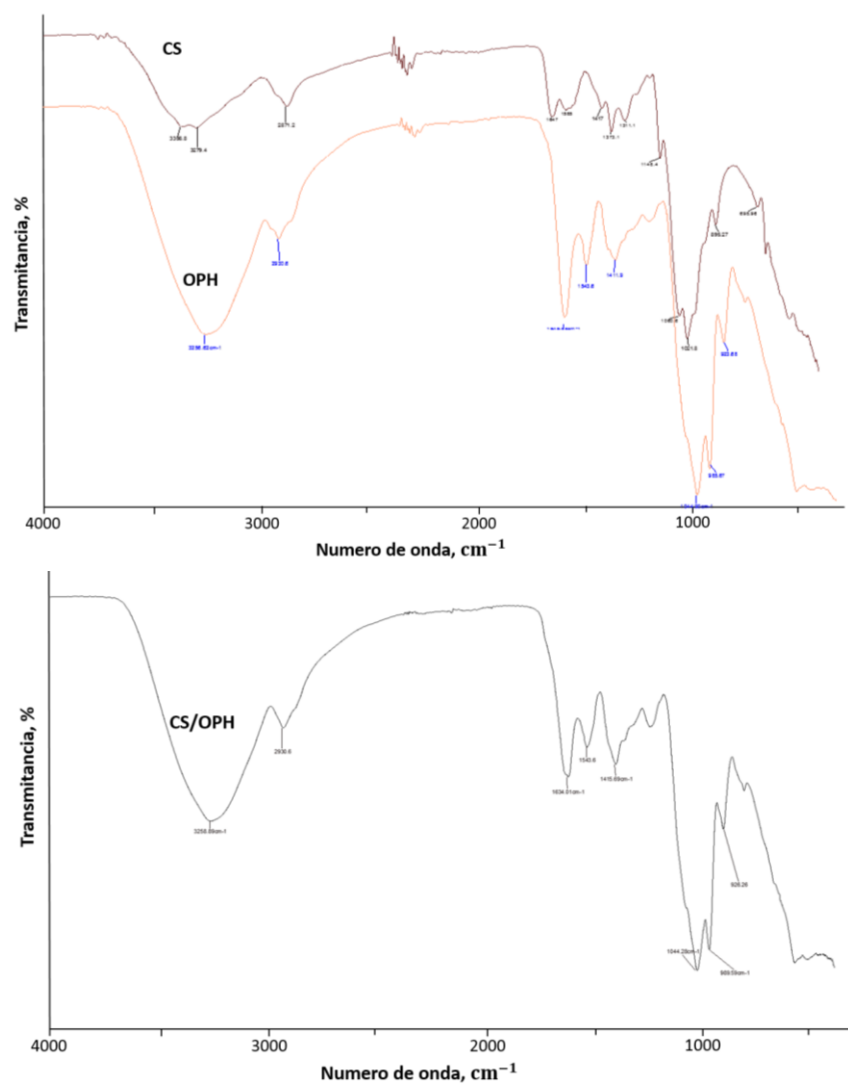


Figura 38. Espectros de FTIR de OPH, CS y mezcla CS/OPH.

En el espectro FTIR del CS se observan las bandas de los grupos funcionales característicos de la molécula de quitosano, una banda con dos picos sobresalientes, uno a 3.356 cm^{-1} que corresponde a los grupos -OH del polímero y otra a 3279.4 cm^{-1} por la vibración simétrica del enlace del grupo -NH . La banda 1583 cm^{-1} es característica del grupo -NH_2 , a 1417 cm^{-1} corresponde al grupo CH_2 , en 1317 cm^{-1} corresponde al -CH y deformación del C-CH_3 , a 2871.2 cm^{-1} corresponde al grupo -CH , a 1153 cm^{-1} es característica de la tensión del asimétrica el grupo C-O-C , a 1031 cm^{-1} corresponde a las vibraciones del esqueleto propias de su estructura, y por último a 896.27 cm^{-1} la tensión -CH de los grupos anoméricos [207].

El espectro de la enzima OPH muestra bandas de estiramiento del grupo C-O a 1044.90 cm^{-1} . Los picos a 3256.6 y 2930.6 cm^{-1} se pueden atribuir al estiramiento de los enlaces O-H y C-H, respectivamente. Los picos de absorción ubicados en 1643.5, 1543 y 1411 cm^{-1} se deben a estiramiento aislado de C=C, torsión del grupo $-\text{CH}_2$ y flexión del enlace C-H respectivamente. El espectro de la mezcla CS/OPH se muestra de forma similar al espectro de OPH, con los mismos picos de absorción. Este indica que la enzima esta efectivamente inmovilizada en la película de CS.

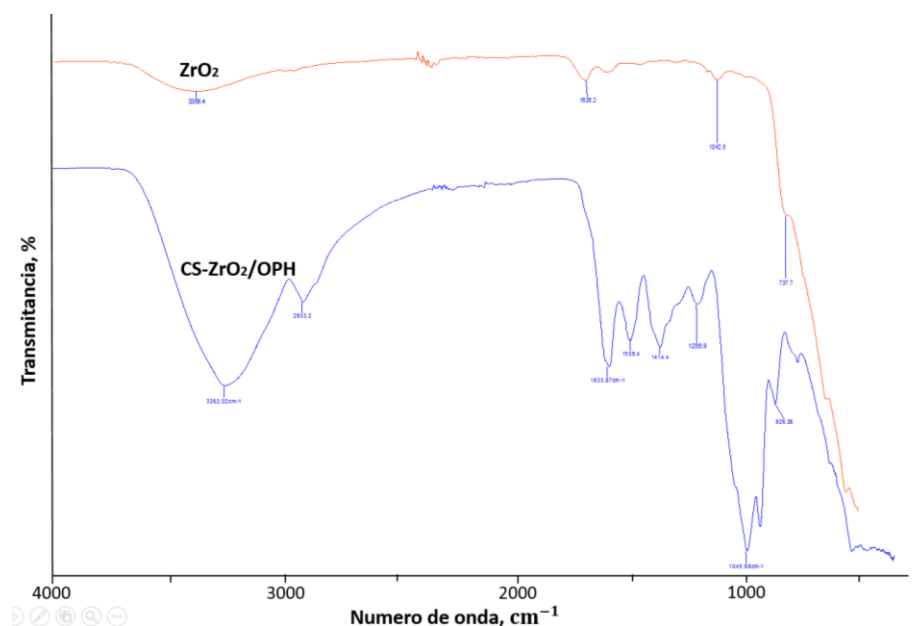


Figura 39. Espectros de FTIR de ZrO_2 y mezcla CS- ZrO_2 /OPH

En el espectro del ZrO_2 se observa un pico a 516.0 cm^{-1} que corresponde a la vibración simétrica del enlace Zr-O. Las señales ubicadas a 737.7 y a 1042.5 cm^{-1} corresponden a la vibración de los estiramientos de los grupos Zr-O-Zr y que caracteriza al óxido de circonio cristalino. También se observa una absorción ancha de absorción localizada en 3339 cm^{-1} asignada a la frecuencia de estiramiento de los enlaces O-H de las diferentes especies presentes en el sólido y del pico situado en 1626 cm^{-1} se atribuye a vibraciones de flexión de tipo tijera de los protones del agua absorbida físicamente.

El espectro de la mezcla CS- ZrO_2 /OPH muestra una absorción intensa a 1045.68 cm^{-1} del estiramiento del grupo C-O, a 3262.02 y 2933.2 cm^{-1} atribuidos al estiramiento de los enlaces O-H y C-H propios del quitosano. También se distinguen los picos 1643.5, 1543 y 1411 cm^{-1} por el estiramiento de C=C, torsión del grupo $-\text{CH}_2$ y flexión del enlace C-H,

respectivamente, son picos característicos de la enzima OPH. La absorción por la vibración de tensión del C-N del quitosano cambió de 1372 a 1414 cm^{-1} . Esto muestra que podría haber interacción molecular entre la enzima y algunos sitios de la matriz.

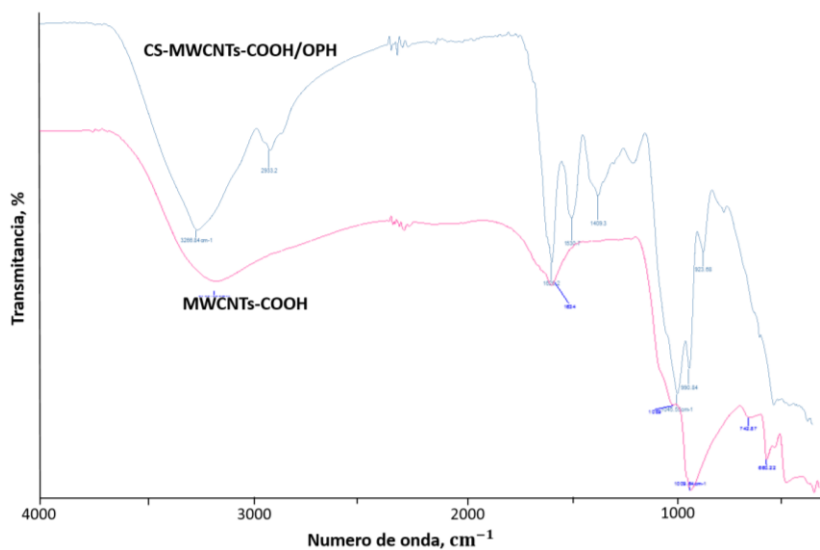


Figura 40. Espectros de FTIR de MWCNTs-COOH y mezcla CS-MWCNTs-COOH/OPH.

A partir del espectro FTIR del MWCNTs-COOH se observa un pico a 1084 cm^{-1} y una absorción intensa centrada cerca de 1010 cm^{-1} para el estiramiento del grupo C-O. El pico a 1634 cm^{-1} corresponde al estiramiento del enlace C=C. La absorción ancha centrada en 3000 cm^{-1} corresponden a la vibración del estiramiento de O-H, el pico a 1635 cm^{-1} la vibración del enlace C=C conjugado del anillo de benceno y un pequeño pico de absorción a 2320 cm^{-1} característico del componente de grafitico de los MWCNTs.

El espectro de la mezcla CS-MWCNTs/OPH muestra un pico de absorción cerca de 1530 cm^{-1} característico del componente grafitico de los MWCNTs y a 1045.55 cm^{-1} una absorción intensa del estiramiento del grupo C-O del grupo carboxilo. Los picos a 3266.84 y 2933.2 cm^{-1} se pueden atribuir al estiramiento de los enlaces O-H y C-H, presentes en la enzima. Se observa también un pico de absorción pronunciado a 1624 cm^{-1} debido a la unión de los grupos -COOH de los MWCNTs con grupos $-\text{NH}_2$ del quitosano [208].

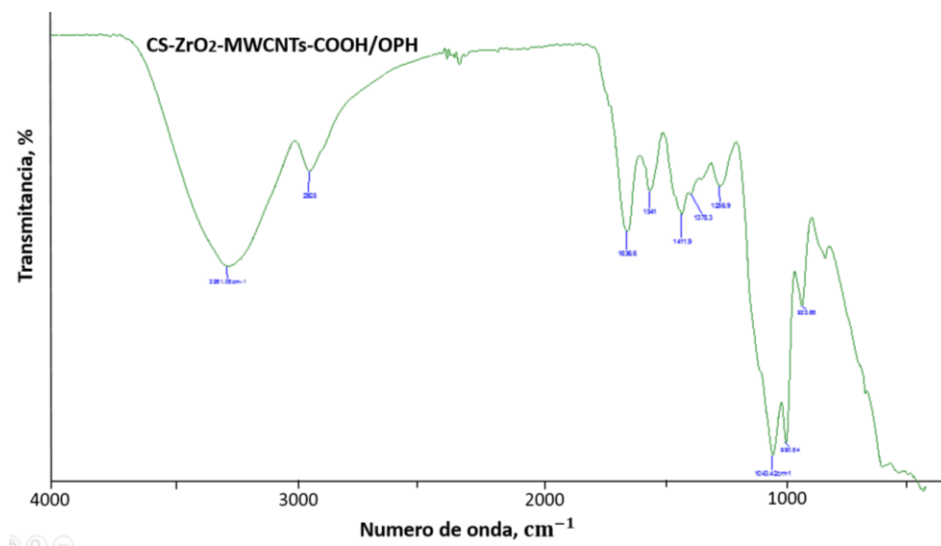


Figura 41. Espectro de FTIR de mezcla CS-MWCNTs-ZrO₂-COOH/OPH

El espectro de la mezcla bionanocompuesta CS-MWCNTs-COOH-ZrO₂/OPH muestra una absorción intensa del estiramiento del C-O del grupo carboxilo a 1043.42 cm⁻¹. La unión enzimática (OPH) está indicada por la aparición de bandas de absorción adicionales a 1637 y 1541 cm⁻¹, la primera debido al estiramiento del C=O del grupo -COOH de MWCNTs, y la segunda se debe a la torsión del enlace NH₂ del grupo amino del quitosano. Además, se observó una banda ancha alrededor de 3200 cm⁻¹ que se atribuye al enlace amida presente en OPH

4.1.2 Caracterización analítica de los Biosensores para la determinación de Paraoxón

La determinación de pesticidas organofosforados aplicando los electrodos enzimáticos modificados con nanocompuestos implica: (i) la hidrólisis catalizada por OPH del pesticida y (ii) la detección amperométrica del *p*-nitrofenol generado enzimáticamente. El paraoxón fue seleccionado como pesticida modelo para evaluar las prestaciones analíticas de los sensores. Las mediciones amperométricas se realizaron midiendo el aumento de la corriente de oxidación del *p*-NP, generada tras adiciones sucesivas de paraoxón en 10 mL de disolución PBS 0.1 mol L⁻¹ aplicando un potencial constante de +1.0 V frente a Ag, AgCl/KCl_{sat}, teniendo en cuenta el potencial de la oxidación de *p*-NP.

4.1.2.1 Curva de calibración, rango lineal y sensibilidad

La determinación de paraoxón por los biosensores desarrollados se llevó a cabo en condiciones experimentales óptimas, realizando mediciones amperométricas. La respuesta de los sensores se resume en la tabla 9.

Tabla 9. Características de calibración de los biosensores frente a la determinación de paraoxón

Electrodo	LOD, $\mu\text{mol L}^{-1}$	LOQ, $\mu\text{mol L}^{-1}$	Sensitivity, $\text{nA } \mu\text{mol L}^{-1}$	Linear range, $\mu\text{mol L}^{-1}$
CS/OPH	0.20	0.66	4.50	5.0-40
CS-ZrO ₂ /OPH	0.10	0.33	12.40	5.0-40
CS-MWCNTs/OPH	0.03	0.09	27.30	5.0-40
CS-MWCNTs-ZrO ₂ /OPH	0.02	0.03	33.12	5.0-40

El análisis de los datos amperométricos nos permitió determinar las características de calibración de los biosensores desarrollados. El límite de detección (LOD) se calculó de acuerdo con el criterio de la relación señal/ruido=3. El límite de cuantificación (LOQ) se definió como 3.3xLOD.

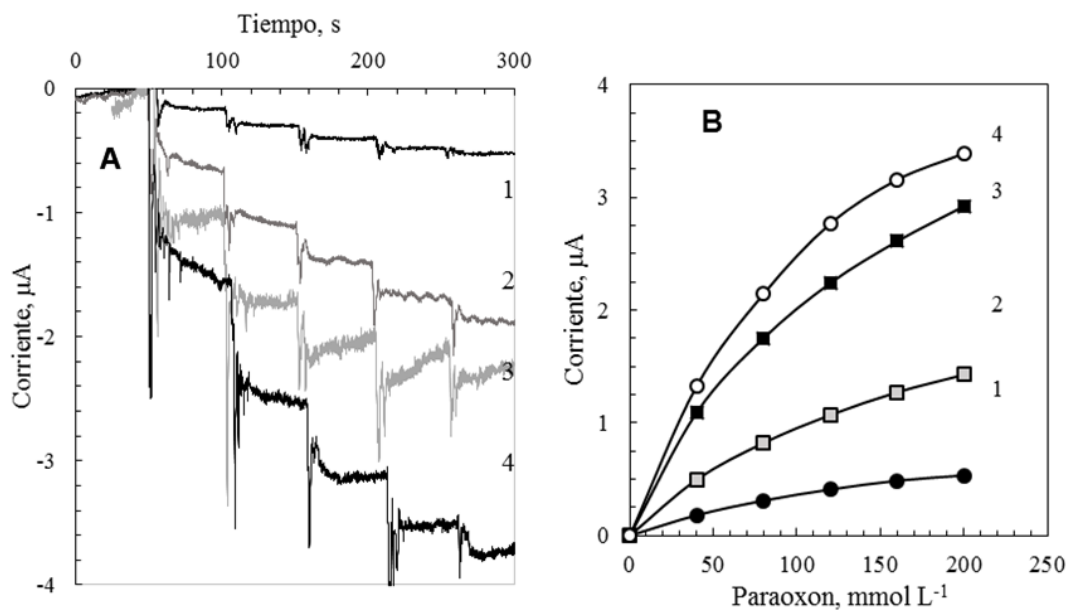


Figura 42. Respuestas amperométricas de los biosensores de nanocompuestos de quitosano a concentraciones crecientes de paraoxón (A) y las correspondientes gráficas de calibración (B). 0.1 mol L^{-1} PBS, pH 8.5; $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

La pendiente de las curvas de calibración dentro del intervalo de concentración lineal determinó la sensibilidad de las determinaciones. Las respuestas amperométricas de los biosensores al paraoxón y las correspondientes gráficas de calibración se muestran en la Figura 46. La sensibilidad de las determinaciones aumentó con el aumento de la superficie activa y la capacidad catalítica de los electrodos enzimáticos modificados con nanomateriales. Los mejores resultados, en términos de alta sensibilidad y bajo límite de detección, se lograron aplicando los sensores CS-MWCNTs/OPH y CS-ZrO₂-MWCNTs/OPH.

En la Tabla 10 se han resumido las características analíticas de algunos métodos recientes para la determinación de paraoxón basados en biosensores electroquímicos de OPH empleando métodos de inmovilización de OPH con algunos nanomateriales. Los resultados presentados en dicha tabla, evidencia que pocos sensores electroquímicos basados OPH reportados en la literatura hasta ahora son capaces de alcanzar LODs como los alcanzados en el presente trabajo. Los excelentes resultados analíticos de los sensores CS/MWCNTs:OPH/EGC y CS/ZrO₂-MWCNTs:OPH/EGC se atribuyeron a las propiedades de los nanomateriales seleccionados, así como a la biocompatibilidad de la matriz de inmovilización enzimática y al apropiado procedimiento de inmovilización enzimática, lo que contribuyó a la preservación de la actividad de la OPH.

Tabla 10. Rendimientos analíticos de los sensores basados en OPH para la determinación de paraoxón.

Electrodo	LOD, $\mu\text{mol L}^{-1}$	Sensibilidad, $\text{nA L } \mu\text{mol}^{-1}$	Rango lineal, $\mu\text{mol L}^{-1}$	Ref.
SWCNT/GCE	0.15	25.00	0.25-4.0	[174]
fMS/GCE	0.4	-	-	[176]
CS/GCE	2.0	22.2	5-82	[180]
SWCNT/GCE	0.01	2.40	0.5-8.5	[183]
Pasta de carbono	0.02	12.00	0.02-0.18	[209]
MC/CB/GCE	0.12	198.00	0.2-8.0	[210]
MWCNT/GCE	0.31	25.95	0.5-2.0	[211]
Pasta de carbono	0.90	1.45	4.6-46.0	[212]
CS-MWCNTs-ZrO ₂ /OPH	0.02	33.12	5.0-40	Este trabajo

Nota: CB, negro de carbono; MC, carbono mesoporoso; fMS, sílice mesoporosa funcionalizada; SWCNT, nanotubos de carbono de pared simple; MWCNTs, nanotubos de carbono de pared múltiple.

4.1.2.2 Reproducibilidad en la fabricación del biosensor

La reproducibilidad del proceso de fabricación de los biosensores CS/ZrO₂:OPH/GCE, CS/MWCNTs:OPH/GCE, y CS/ZrO₂-MWCNTs:OPH/GCE, caracterizada por la desviación estándar relativa (RSD), fue determinada a partir de la comparación de las respuestas amperométricas obtenidas por medida de 40 μmol L⁻¹ en días diferentes, empleando 10 biosensores distintos fabricados de la misma manera.

Los resultados obtenidos proporcionan una RSD en el intervalo de 2.5-4.0% para 5 mediciones y aumentaron hasta 6.5% para diez mediciones. La disminución de la precisión de los análisis se atribuyó al ensuciamiento superficial del electrodo, debido a la polimerización de los productos oxidativos de *p*-NP, como se describe en [180] por Stoytcheva, et al (2014). Sin embargo, estos valores, inferiores al 10%, reflejan la buena reproducibilidad y precisión del proceso de construcción de los biosensores enzimáticos.

Por otra parte, en el estudio de la repetibilidad, todas las condiciones se mantuvieron idénticas, realizando 3 mediciones de la misma disolución de sustrato con el mismo biosensor en mismo día. EL biosensor CS/MWCNTs-HA:OPH/GCE tuvo repetibilidad satisfactoria con una RSD <3.0%, en comparación con el biosensor sin nanomateriales CS:OPH/GCE (4.54%, para n=3), sujeto al lento ensuciamiento de la superficie del electrodo.

4.1.2.3 Interferencias

Para este estudio se seleccionaron 2 compuestos químicos con potencial efecto interferente sobre la medida del biosensor: un pesticida del grupo triazinas como la atrazina (200 μmol L⁻¹) y un pesticidas organofosforado sin sustituyentes de *p*-nitrofenol como el clorofos (200 μmol L⁻¹). Para ello se realizaron mediciones amperométricas a muestras de paraoxón de concentración 40 μmol L⁻¹, en ausencia y presencia de los potenciales compuestos interferentes.

Como resultado de estos experimentos se observó que los pesticidas atrazina y clorofos, evaluados como posibles agentes interferentes no afectaron la señal amperométrica del biosensor, aun cuando su concentración en la celda electroquímica fuera 5 veces superior a

la de paraoxón. La falta de tales interferencias demuestra que los sensores desarrollados basados en OPH son útiles para la determinación selectiva de pesticidas organofosforados con sustituyente *p*-nitrofenol (paraoxón, paratión, fenitrotión, etc.). En contraste con los sensores basados en colinesterasas para la determinación de los OPs, incapaces de distinguir las subclases de los OPs.

4.1.2.4 Estabilidad de almacenamiento

Para determinar la estabilidad de almacenamiento del biosensor CS/MWCNTs-ZrO₂:OPH/GCE se prepararon 3 electrodos según el protocolo descrito. Estos electrodos fueron almacenados en oscuridad, en condiciones de sequedad, y fueron periódicamente evaluados mediante la determinación de su respuesta amperométrica frente a 40 μmol L⁻¹ de paraoxón

La estabilidad de almacenamiento del sensor CS/MWCNTs-ZrO₂:OPH/GCE (mantenido seco a 4°C), se evaluó midiendo su respuesta de corriente a 40 μmol L⁻¹ de paraoxón y se comparó con la estabilidad de almacenamiento del sensor CS:OPH/GCE, como se muestra en la Figura 43. La disminución de la respuesta de corriente similar de ambos sensores se atribuyó a la pérdida de actividad enzimática, debido a las propiedades inherentes del producto de descontaminación DEFENZ™ 130BG utilizado como fuente de OPH. Las enzimas de la línea DEFENZ™ 130BG tienen un período de actividad en disolución acuosa de sólo 8 horas. La estabilidad de almacenamiento extendida de los biosensores desarrollados se atribuyó a la biocompatibilidad de la matriz de inmovilización de enzimas y al microambiente favorable, lo que contribuyó a la retención de la actividad enzimática.

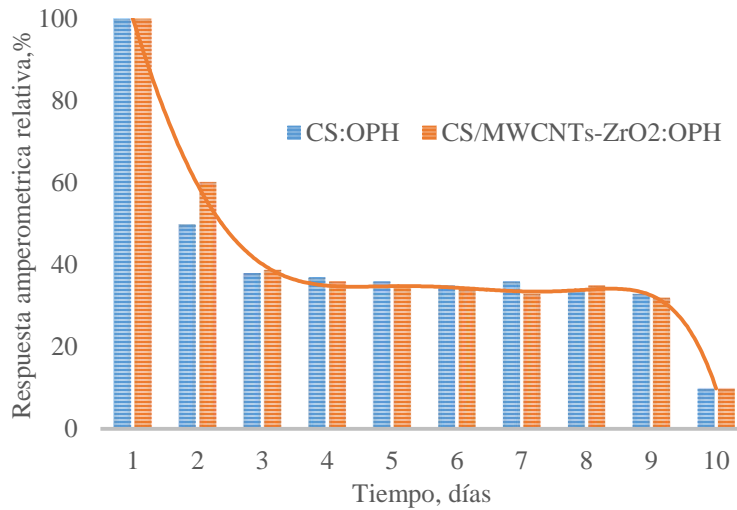


Figura 43. Estabilidad de almacenamiento de los sensores CS:OPH y CS/ZrO₂-MWCNTs:OPH.

4.1.2.5 Aplicación a matrices reales

El electrodo modificado con CS/ZrO₂-MWCNTs:OPH se aplicó para la determinación de OPs en agua de riego, recolectada de los canales del valle de Mexicali (Baja California, México). Las muestras se filtraron y luego se les añadió paraoxón para obtener una concentración de 20.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ en celda, esta concentración corresponde la a mitad del rango de concentración de trabajo y podría considerarse como el punto de concentración con mayor precisión. La recuperación se calculó como la relación entre el valor medio de la concentración de paraoxón encontrado y el paraoxón añadido [213] los experimentos se realizaron por triplicado. Se obtuvo una recuperación promedio de 99.2%, que demostró la buena exactitud de las determinaciones.

4.2 BIOSENSORES NANOESTRUCTURADOS CON NANOTUBOS DE CARBONO DE PARED MULTIPLE Y NANOPARTICULAS DE HIDROXIAPATITA PARA LA DETERMINACIÓN PARAOXÓN

El diseño de los biosensores enzimáticos consideró el empleo de electrodos de carbón vítreo modificados por medio de electrodeposición de quitosano con nanotubos de carbono y nanopartículas de hidroxapatita atrapados en la matriz polimérica.

4.2.1. Optimización de las condiciones experimentales de ensamblaje del electrodo

Una vez establecidos el tiempo de electrodeposición de las películas bionanocompuestas y la actividad enzimática de la OPH inmovilizada como se describió en los incisos 4.1.1.1 y 4.1.1.2. El siguiente parámetro a considerar fue la posibilidad de emplear electrodos de carbón vitrificado modificados con nanopartículas de HA y MWCNTs atrapados quitosano, como interface de transducción. Para ello se prepararon electrodos con este diseño, así como electrodos control sin modificación.

4.2.1.1 Cantidad optima de Nanomaterial

La electrodeposición de las películas bionanocompuestas se llevó a cabo, como se mencionó anteriormente, mediante la aplicación de un potencial constante (-3.0 V frente a Ag, AgCl/KClsat) durante un período de 5 min.

La respuesta de los electrodos modificados se evaluó variando la cantidad de las nanopartículas de HA en con las concentraciones 1.0, 2.5, 5.0 y 10 mg mL⁻¹, en el hidrogel de quitosano. El efecto de la carga de HANPs se investigó por voltametría cíclica mediante la oxidación de *p*-NP 0.1 mmol L⁻¹. Las curvas de voltametría cíclica registradas de la oxidación de *p*-NP para los electrodos modificados con las mezcla CS/HA:BSA se muestran en la figuras 44a y 44b respectivamente. En la figura 44a, se observa la influencia del contenido de HANPs sobre la respuesta analítica de los electrodos. La respuesta de los electrodos aumento con el aumento de la cantidad de nanopartículas depositadas, alcanzándose una máxima corriente de pico anódico con el electrodo construido con 5 mg

mL⁻¹ de HANPs. El aumento de la cantidad de HANPs mayor a 5 mg mL⁻¹ dio como resultado una disminución de la respuesta de los biosensores. De acuerdo con estos resultados se empleó una concentración de 5 mg mL⁻¹ HANPs para la preparación de los electrodos a utilizar en experimentos posteriores.

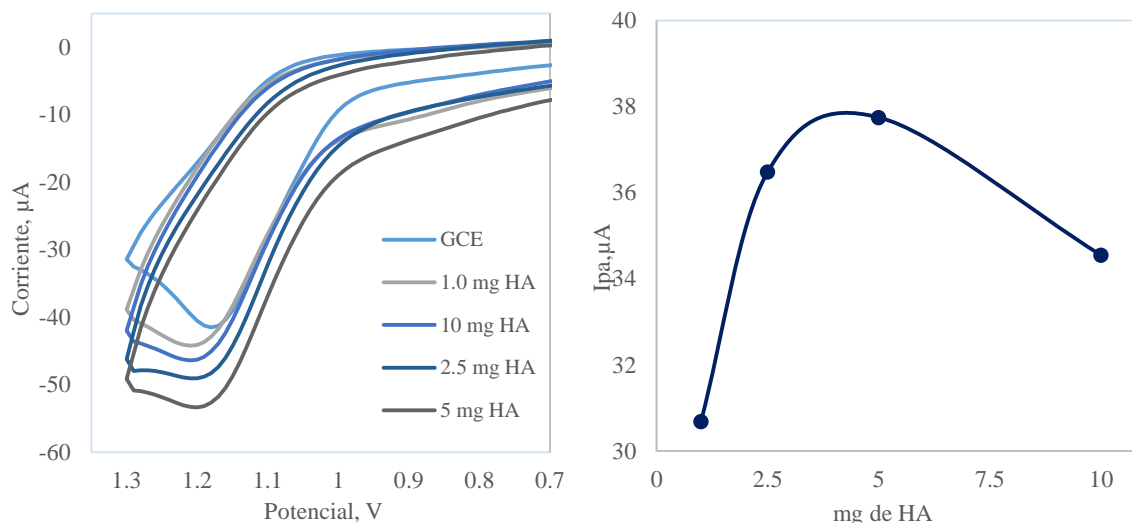


Figura 44. Voltamogramas cíclicos de 0.1 mmol L⁻¹ p-NP en PBS 0.1 mol L⁻¹, pH 8.5 de electrodo de carbón vítreo modificado por electrodeposición de 5 min, CS/HA:BSA (1.0, 2.5, 5.0, y 10 mg mL⁻¹ de hidroxiapatita). B) Comportamiento de las corrientes de pico anódico para las nanopartículas de hidroxiapatita.

También, se estudió el efecto de la cantidad de los MWCNTs (0.1, 0.25, 0.5 y 1.0 mg mL⁻¹) y de las nanopartículas de HA (1.0, 2.5, 5.0 y 10 mg mL⁻¹) incluidos en la mezcla de quitosano tomando como variable de respuesta la señal amperométrica de los electrodos frente a concentraciones crecientes de paraoxón (incremento de concentración: 40 μmol L⁻¹), empleado un potencial de trabajo de +1.0 V vs. Ag, AgCl/KCl_{sat}, en las siguientes condiciones: PBS 0.1 mol L⁻¹, pH 8.5 y 25 °C.

En la figura 45 se muestra la influencia de la cantidad de nanomateriales sobre sensibilidad de las determinaciones amperométricas de paraoxón utilizando los biosensores construidos. Se apuntó a que el aumento de la carga de los nanomateriales contribuiría a mejorar la sensibilidad de la cuantificación de paraoxón, debido al aumento del área de superficie activa de los electrodos y de la actividad electrocatalítica. La intensidad de corriente anódica medida aumento con el aumento de la cantidad de nanomateriales, alcanzando un valor máximo de respuesta analítica en los electrodos construidos con las

concentraciones de 0.25 y 5 mg mL⁻¹ para los MWCNTs y las HANPs. Estos resultados obtenidos coinciden con los resultados obtenidos por medio de voltametría cíclica. Este hecho permite sugerir que se necesita un grado óptimo de cobertura del electrodo con MWCNTs y HANPs para la formación de interacciones estables entre dichos nanomateriales.

Asimismo, se comprobó que la respuesta de los biosensores no aumento con un mayor contenido de MWCNTs. Lo que sugiere que una vez alcanzado el grado óptimo de cobertura de los electrodos con los MWCNTs, un posterior enriquecimiento de la película con este material no mejora su interacción con las nanopartículas de HA. Por tal motivo, se empleó una cantidad de 0.25 mg mL⁻¹ MWCNTs y 5 mg mL⁻¹ HANPs para el recubrimiento de los electrodos preparados para experimentos posteriores.

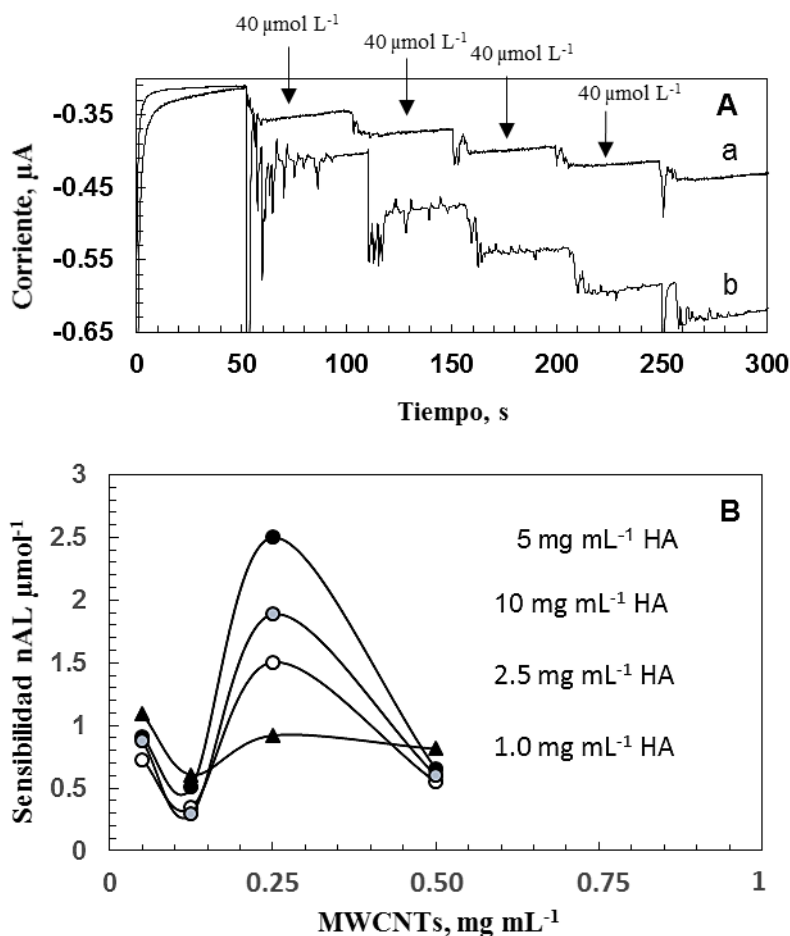


Figura 45. (A) Respuestas amperométricas de los biosensores frente a paraoxón (a) CS/MWCNTs(0.25 mgmL⁻¹)-HA(1.0 mgmL⁻¹):OPH (b) CS/MWCNTs(0.25 mgmL⁻¹)-HA(5.0 mgmL⁻¹):OPH. (B) Variación de la sensibilidad de la determinación amperométrica de paraoxón en función de la composición de la mezcla de quitosano.

4.2.2 Caracterización electroquímica de los electrodos modificados

La caracterización electroquímica de los electrodos modificados se realizó por medio de voltametría cíclica y cronoamperometría como se describió anteriormente en el apartado 4.1.1.4 y los resultados obtenidos con CS:BSA fueron comparados con la mezcla que contiene los dos nanomateriales MWCNTs y HANPs (en sus cantidades óptimas encontradas experimentalmente) CS/HA:BSA, CS/MWCNTs:BSA y CS/MWCNTs-HA/BSA.

a. Caracterización por Voltametría cíclica

Los voltamogramas cíclicos registrados con las siguientes condiciones de operación: 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ *p*-NP, velocidad de barrido 0.1 V s^{-1} PBS 0.1 mol L^{-1} , pH 8.5 y 25 °C, se muestran en la Figura 46.

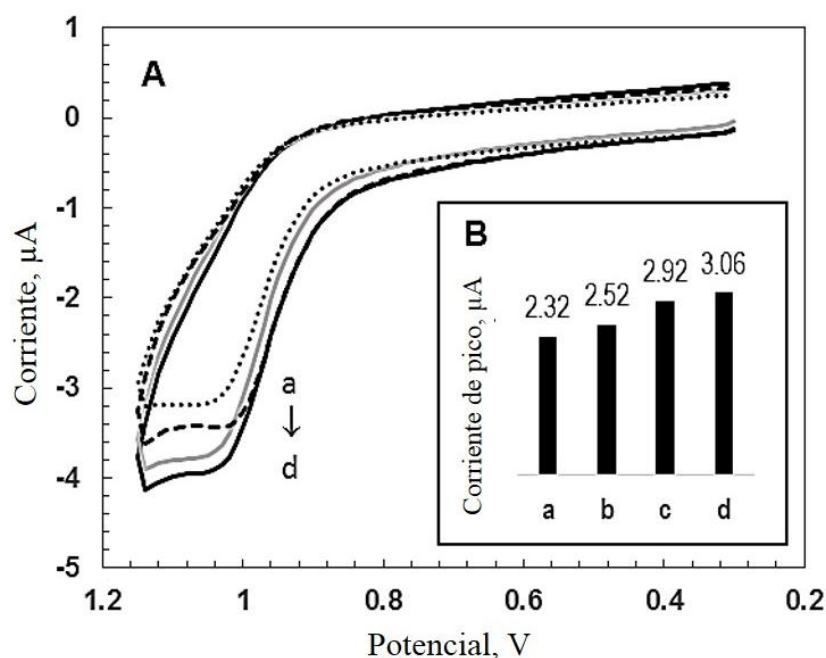


Figura 46. (A) voltamogramas cíclicos de los GCE modificados frente a la oxidación del *p*-NP. (B) Valor de la corriente de pico de oxidación de *p*-NP con los electrodos modificados: (a) CS/BSA, (b) CS/HA:BSA (c) CS/MWCNTs:BSA (d) CS/MWCNTs-HA/BSA.

La Figura 46A demuestra que el comportamiento electroquímico de *p*-NP en el rango de potencial seleccionado (+0.3 V a +1.15 V vs. Ag, AgCl/KCl_{sat}) aplicando varios electrodos

modificados fue idéntico. Por lo tanto, el pico anódico registrado se atribuyó a la oxidación irreversible de *p*-NP. Sin embargo, se observó un ligero cambio de potencial de pico de la oxidación de *p*-NP del electrodo modificado por la mezcla CS/BSA (+1.04 V vs Ag, AgCl/KCl_{sat}). Asimismo se muestra claramente que la presencia de nanopartículas de HA favorece la oxidación de la *p*-NP a un potencial más bajo (+1.03 V frente a Ag, AgCl/KCl_{sat}), mientras que la modificación GCE del nanocompuesto CS/MWCNTs:BSA causó un pequeño aumento de potencial máximo (+1.05 V vs. Ag, AgCl/KCl_{sat}). La modificación de los electrodos utilizando diversas mezclas de quitosano también resultó en un aumento de 1.09, 1.26 y 1.32 veces en la corriente de pico de la oxidación del *p*-NP de los electrodos GCE modificados con CS/HA:BSA, CS/MWCNTs:BSA y CS/MWCNTs-HA:BSA, respectivamente; en comparación con la corriente de pico anódico, registrada con CS:BSA (Figura 43B). Este aumento se atribuyó al aumento de la superficie electroactiva de los electrodos modificados con las mezclas bionanocompuestas y al aumento de su actividad catalítica, como lo confirman los datos presentados en la Tabla 11.

b. Caracterización por cronoamperometría: área electroquímica y constante de velocidad catalítica

En la figura 44A se recogen los cronoamperogramas registrados con el electrodo modificado con CS/MWCNTs-HA:BSA en disoluciones de *p*-NP de diferente concentración (0, 0.05 y 0.1 mmol L⁻¹) en tampón PBS 0.1 mol L⁻¹, sin agitación y aplicando un salto de potencial de 0.6 a 1.0 V.

Los datos obtenidos por cronoamperometría fueron utilizados para calcular los valores de las áreas activa de los electrodos por la ecuación de Cottrell como se indicó en el inciso 4.1.1.4; a partir de la pendiente de la representación de la intensidad de corriente frente a la inversa de la raíz cuadrada del tiempo (figura 47B). Del mismo modo se calcularon valores promedios de las áreas de los demás electrodos. Estos valores son mostrados en la tabla 11.

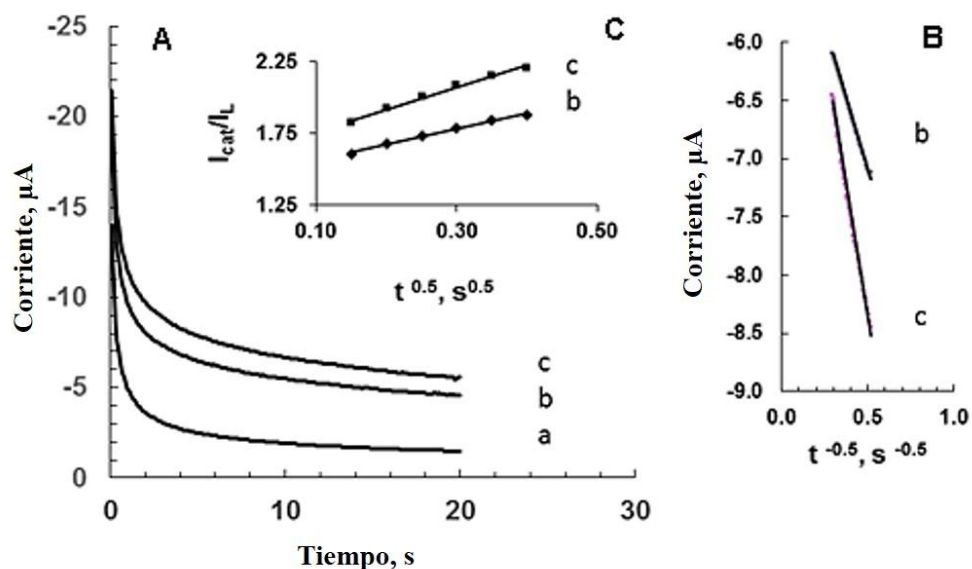


Figura 47. (A) Cronoamperogramas obtenidos con CS/MWCNTs-HA:BSA; Concentración de *p*-NP: (a) 0 mmol L⁻¹; (b) 0.05 mmol L⁻¹; (c) 0.1 mmol L⁻¹. (B) Gráficos de Cottrell derivados de los cronoamperogramas. (C) Gráficos I_c / I_L vs. $t_{1/2}$ derivados de los cronoamperogramas.

Del mismo modo, la cronoamperometría también se empleó para evaluar la constante de velocidad catalítica kh , para la reacción entre el *p*-NP y los electrodos modificados acuerdo con el método de Galus (1976) [205], a partir de la pendiente de las gráficas I_c/I_L frente a $t_{1/2}$ (Figura 47B), descritas por la ecuación descrita en el inciso 4.1.1.4.

Los datos presentados en la Tabla 11, demuestran que el electrodo de GCE modificado con CS/MWCNTs-HA/BSA exhibió mayor actividad catalítica y mayor área de superficie electroactiva en comparación con los electrodos GCE modificadas por CS:BSA y CS/HA:BSA, lo que se atribuye a la acción sinérgica de los componentes individuales. Sin embargo, el área electroquímica de electrodo con CS/MWCNTs-Ha:BSA fue menor en comparación con la modificada con CS/MWCNTs:BSA.

Tabla 11. Valores promedios del área electroquímicamente activa y de la constante de velocidad catalítica de la oxidación de *p*-NP para los electrodos de carbón vítreo modificados.

Electrodo	Área (mm ²)	Constante de velocidad Catalítica, L mol ⁻¹ s ⁻¹
GCE	19.65	1.79 x10 ³
CS:BSA	14.93	1.72 x10 ³
CS/HA:BSA	18.63	6.94 x10 ³
CS/MWCNTs:BSA	24.38	5.02 x10 ³
CS/MWCNTs-HA:BSA	23.02	7.75 x10 ³

4.2.3 Caracterización superficial de los electrodos mediante SEM

La figura 48 muestra las micrografías SEM a 1000 X de aumento, de cada uno de los electrodos modificados con películas bionanocompuestas: (I) CS:OPH, (II) CS/HA:OPH y (III) CS/MWCNTs:OPH y (IV) CS/MWCNTs-HA:OPH.

La imagen SEM 48 I, de la superficie del GCE modificado con CS:OPH, que no contiene nanomateriales, muestra una morfología similar a la de una hoja arrugada, la superficie es muy porosa y abierta, y presenta formas globulares que corresponden a la enzima OPH. La incorporación de nanopartículas de HA (figura 48 II) en las películas de CS provocó cambios en la morfología, como el aplanamiento y suavizado de la superficie, así como una disminución de la porosidad de la película, debido a la dispersión uniforme de las nanopartículas de HA, las cuales se aprecian claramente como diminutos puntos blancos, distribuidas al azar por toda la capa del bionanocompuesto sobre el electrodo de carbón vitrificado.

La figura 48 III presenta la superficie de GCE modificada con CS/MWCNTs:OPH. La película porosa tiene una gran área de superficie y se puede observar la distribución homogénea de los MWCNTs en forma de pequeños paquetes y como estructuras tubulares formando una red tridimensional, esto se puede explicar debido a la envoltura de los nanotubos con las cadenas de CS y el acoplamiento covalente de los nanotubos carboxilados con los grupos amina libres del quitosano.

Como se muestra en la figura 48 III de la película preparada con CS/MWCNTs:OPH, mostró una morfología de láminas ligeramente plegadas, las cuales forman nanoestructuras tridimensionales voluminosas. Sobre estas estructuras laminares se aprecian claramente las nanopartículas HA, las cuales se encuentran distribuidas al azar por toda la capa del bionanocompuesto de quitosano.

Es claramente evidente a partir de estos resultados que las nanopartículas de HA y los MWCNTs, se incorporaron uniformemente en las películas electrodepositadas del quitosano. El excelente rendimiento de los bionocompuestos se atribuyó a las excelentes propiedades del quitosano como agente dispersante para los de los nanomateriales seleccionados, así como a la apropiada técnica de electrodeposición.

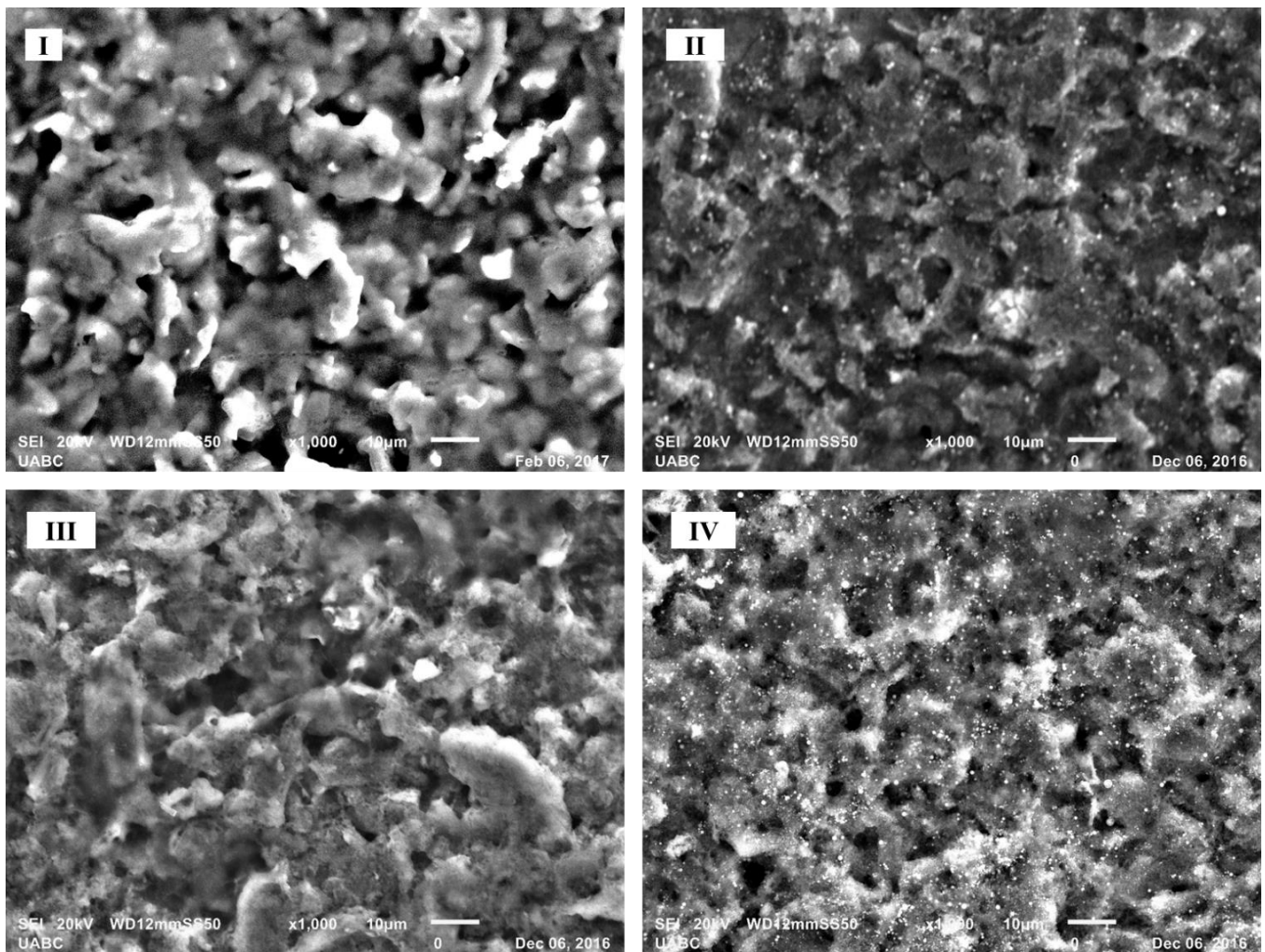


Figura 48. Imágenes SEM de las películas electrodepositadas de CS:OPH, CS/HA:OPH, CS/MWCNTs:OPH y CS/MWCNTs-HA:OPH.

4.2.4 Espectros de FTIR de electrodos modificados

En la figura 49 se representa el espectro de infrarrojo de la hidroxiapatita. En él se pueden observar las bandas características del grupo fosfato, correspondientes a las vibraciones de estiramiento de los enlaces P-O a 1021, 959, 599, 564 cm^{-1} . Los números de onda 1422.9 y 1461 cm^{-1} corresponden a pequeñas cantidades de CO_3^{2-} que se forman en la mezcla de reacciona partir del CO_2 absorbido durante la síntesis de HA a condiciones atmosféricas.

El espectro de la mezcla CS-HA/OPH, muestra una absorción intensa del estiramiento del C-O del grupo carboxilo a 1043.42 cm^{-1} . Los picos a 3261.08 y 2928 cm^{-1} se pueden atribuir al estiramiento de los enlaces O-H y C-H, respectivamente. Los picos de absorción ubicados en 1636.6 , 1541 y 1411 cm^{-1} se deben a estiramiento aislado de C=C, torsión del grupo $-\text{CH}_2$ y flexión del enlace C-H respectivamente.

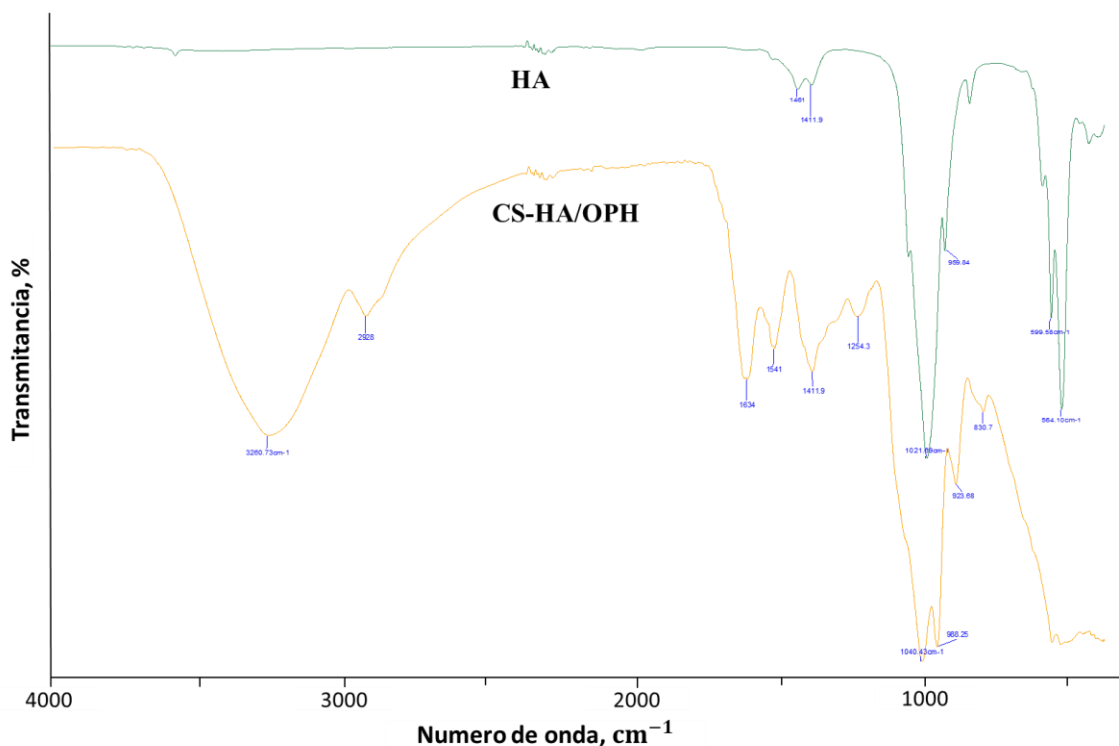


Figura 49. Espectros de FTIR de HAPNs y mezcla CS-HA/OPH.

Por otro lado, el espectro de la mezcla CS/MWCNTs-COOH-HA/OPH en la figura 50, muestra una absorción intensa del estiramiento del C-O del grupo carboxilo a 1012.06 cm^{-1} . Los picos a 3270 y 2928 cm^{-1} se pueden atribuir al estiramiento de los enlaces O-H y C-H, respectivamente. La banda de absorción de intensidad media, relativas a la vibración del grupo amino a una frecuencia entre $1650\text{-}1560\text{ cm}^{-1}$. Los picos de absorción ubicados en 1541 y 1411 cm^{-1} se deben a la torsión del grupo $-\text{CH}_2$ y flexión del enlace C-H. También se pueden observar las bandas características del grupo fosfato, correspondientes a las vibraciones de estiramiento de los enlaces P-O a 1041.43 , 923.08 , 830.13 cm^{-1} .

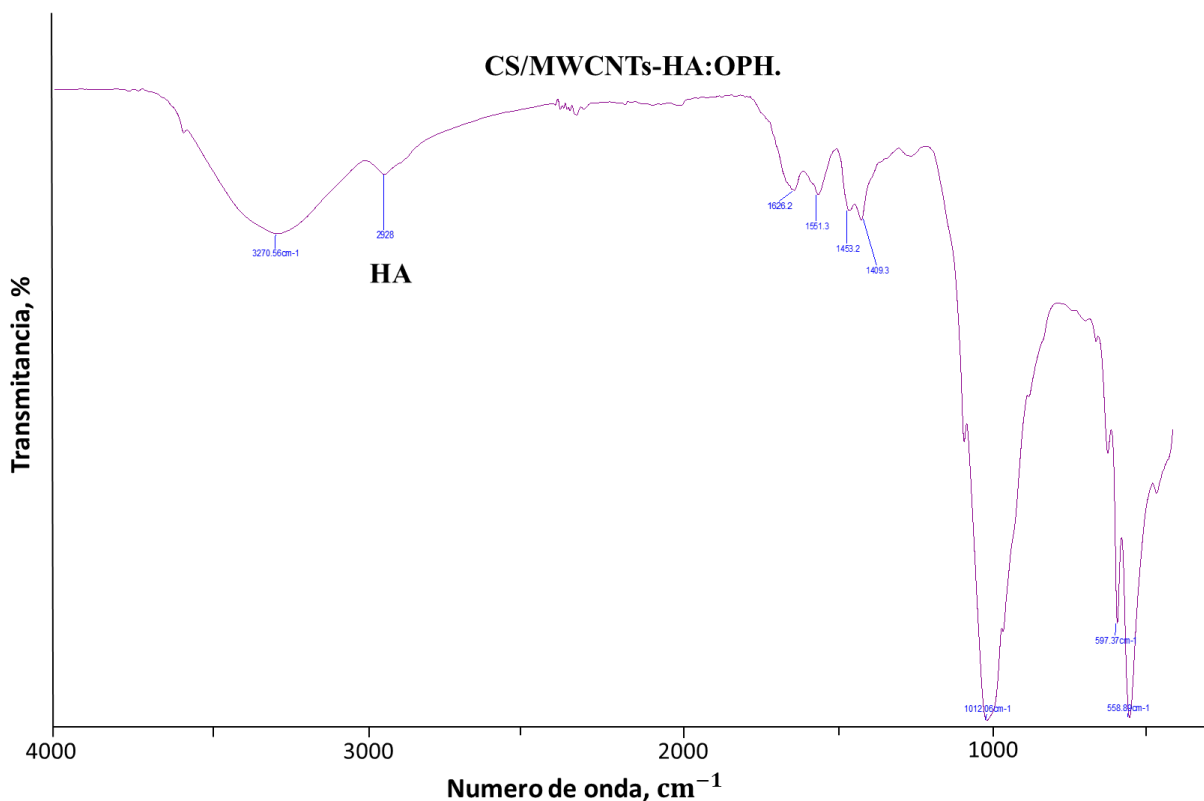


Figura 50. Espectros de FTIR de la mezcla CS/MWCNTs-HA/OPH.

4.2.5 Caracterización analítica del sensor CS/MWCNTs-HA/OPH para la determinación de Paraoxón

4.2.5.1 Curva de calibración y rango lineal

Las determinaciones de paraoxón aplicando la mezcla optima CS-MWCNTs(0.25 mgmL⁻¹)-HA(5.0 mgmL⁻¹)/OPH se realizó midiendo el aumento de la corriente de oxidación del *p*-NP, generada tras adiciones sucesivas de paraoxón en 10 mL de disolución PBS 0.1 mol L⁻¹ en el rango de 20-180 µmol L⁻¹. Las gráficas y curvas de calibración correspondientes se presentan en la figura 51.

Las mediciones amperométricas se realizaron a un potencial constante de +1.1 V vs. Ag, AgCl/KCl sat para asegurar una alta tasa de oxidación de *p*-NP. El biosensor exhibió una respuesta rápida y sensible al cambio de la concentración de paraoxón lo cual probó el buen comportamiento electrocatalítico del electrodo enzimático de OPH. El tiempo de respuesta

fue menos de 15 s. En la curva de calibración la corriente aumenta a medida que la concentración de paraoxón aumenta y la corriente alcanza un valor de saturación a una concentración de paraoxón alta, lo que sugiere que los sitios activos de las unidades de enzima están saturados a esos niveles de paraoxón. En un rango de concentración de 5 a 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$, el electrodo proporciona una respuesta lineal a paraoxón.

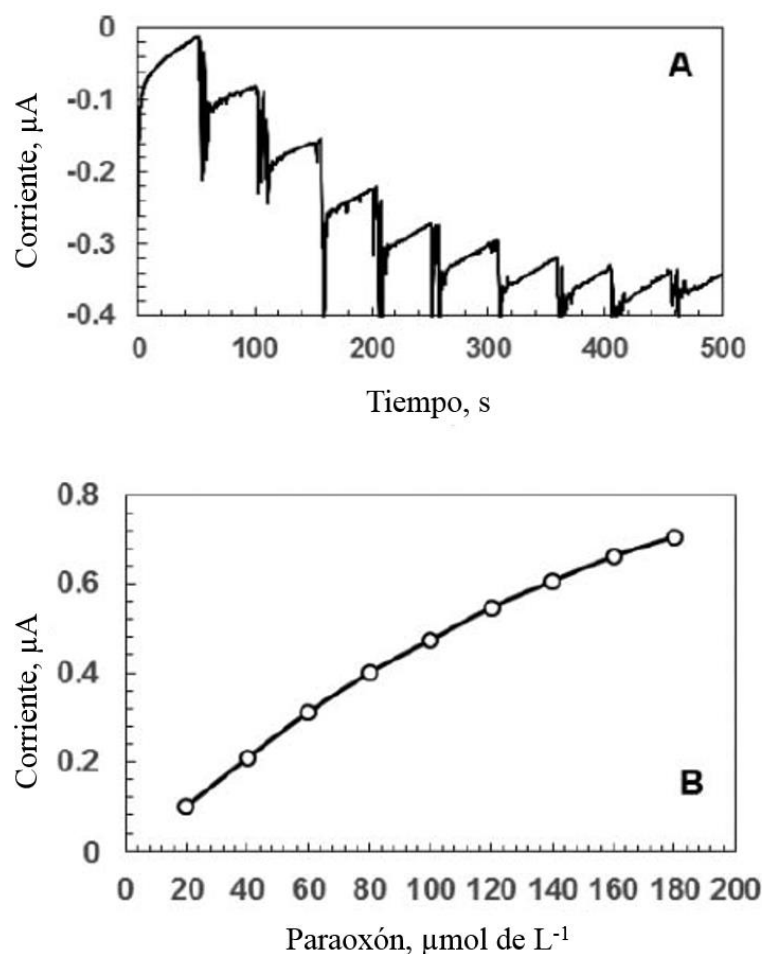


Figura 51. (A) Respuestas amperométricas del electrodo modificado con CS-MWCNT-HA/OPH a concentraciones crecientes de paraoxón ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) (B) la gráfica de calibración correspondiente.

La sensibilidad de la determinación, es decir, la pendiente de la gráfica de calibración dentro del rango de concentración lineal, se fue de $5.10 \text{ nA L } \mu\text{mol}^{-1}$. El límite de detección, calculado sobre la base de señal/ruido=3, fue de $0.1 \mu\text{mol L}^{-1}$.

En la Tabla 12 se han resumido las características analíticas de algunos métodos recientes para la determinación de paraoxón basados en biosensores electroquímicos de OPH

empleando métodos de inmovilización enzima con algunos nanomateriales. De esta comparación pueden deducirse conclusiones análogas a las de los biosensor CS/MWCNTs-ZrO₂/GCE. Entre otras, las más importantes son la obtención de un amplio intervalo de linealidad y de un límite de detección comparable a los más bajos encontrados en la bibliografía. Lo que confirma que la modificación del electrodo con el híbrido bionanocompuesto CS-MWCNTs-HA:OPH contribuye a la mejora de su rendimiento analítico.

Tabla 12. Rendimientos analíticos de los sensores basados en OPH para la determinación de paraoxón.

Electrodo	LOD, $\mu\text{mol L}^{-1}$	Sensibilidad, $\text{nA L } \mu\text{mol}^{-1}$	Rango lineal, $\mu\text{mol L}^{-1}$	Ref.
SWCNT/GCE	0.15	25.00	0.25-4.0	[174]
fMS/GCE	0.4	-	-	[176]
CS/GCE	2.0	22.2	5-82	[180]
SWCNT/GCE	0.01	2.40	0.5-8.5	[183]
Pasta de carbono	0.02	12.00	0.02-0.18	[209]
MC/CB/GCE	0.12	198.00	0.2-8.0	[210]
MWCNTs/GCE	0.31	25.95	0.5-2.0	[211]
Pasta de carbono	0.90	1.45	4.6-46.0	[212]
CS/MWCNTs-HA/GCE	0.10	5.10	5.0-80.0	Este trabajo

Nota: CB, negro de carbono; MC, carbono mesoporoso; fMS, sílice mesoporosa funcionalizada; SWCNT, nanotubos de carbono de pared simple; MWCNTs, nanotubos de carbono de pared múltiple.

4.2.5.2 Reproducibilidad en la fabricación del biosensor

La reproducibilidad de las determinaciones, depende de la reproducibilidad de la técnica elegida para la modificación del electrodo. La reproducibilidad, caracterizada por la RSD y evaluada mediante la comparación de los amperogramas obtenidos por medida de $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ en días diferentes, empleando 10 biosensores distintos fabricados de la misma manera.

La RSD de la respuesta de corriente del biosensor CS/MWCNTs-HA:OPH/GCE para cinco determinaciones sucesivas de $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ paraoxón fue 3.78% y para diez mediciones, aumentó hasta 7.29%. La disminución de la RSD con el aumento de análisis se puede atribuir al ensuciamiento superficial del electrodo, debido a la polimerización de los productos oxidativos de *p*-NP. Sin embargo, estos valores, inferiores al 10%, reflejan la buena reproducibilidad del proceso de construcción del biosensor enzimático.

Por otra parte, en el estudio de la repetibilidad, todas las condiciones se mantuvieron idénticas, realizando 3 mediciones de la misma disolución de sustrato con el mismo biosensor en mismo día. El biosensor CS/MWCNTs-HA:OPH/GCE tuvo repetibilidad satisfactoria con una RSD <3.0%, en comparación con el biosensor sin nanomateriales CS:OPH/GCE (4.54%, para n=3), sujeto al lento ensuciamiento de la superficie del electrodo. La capacidad de los CNTs para disminuir los efectos de ensuciamiento de la superficie de los electrodos se comenta en la literatura, pero aún no se entiende completamente [208].

4.2.5.3 Interferencias

Para este estudio se seleccionaron 2 compuestos químicos con potencial efecto interferente sobre la medida del biosensor: un pesticida del grupo triazinas como la atrazina ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$) y un pesticidas organofosforado sin sustituyentes de *p*-nitrofenol como el clorofos ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$). Para ello se realizaron mediciones amperométricas a muestras de paraoxón de concentración $40 \mu\text{mol L}^{-1}$, en ausencia y presencia de los potenciales compuestos interferentes.

Como resultado de estos experimentos se observó que los pesticidas atrazina y clorofos, evaluados como posibles agentes interferentes no afectaron la señal amperométrica del biosensor, aun cuando su concentración en la celda electroquímica fuera 5 veces superior a la de paraoxón, ya que la enzima OPH cataliza específicamente la hidrólisis de los OPs sustituidos con nitrofenilo.

4.2.5.4 Estabilidad de almacenamiento

La estabilidad del biosensor se evaluó mediante el registro periódico de la respuesta obtenida amperométrica con $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de paraoxón, realizando las medidas en el medio de trabajo 0.1 mol L^{-1} PBS, pH 8.5 y 25°C . Entre las mediciones el biosensor se almacenó en seco a 4°C . No se observó disminución evidente de la corriente promedio en la respuesta del biosensor durante el periodo de prueba de 4 días, partir de ese día comienza a disminuir

la corriente promedio en 36% de su valor inicial y se mantuvo estable durante 5 días. En el décimo día, se redujo rápidamente al 10% de su valor inicial. La pérdida de estabilidad se debió evidentemente a las propiedades intrínsecas de la preparación enzimática DEFENZTM 130BG, utilizada en este trabajo vida útil de 8 horas en solución acuosa.

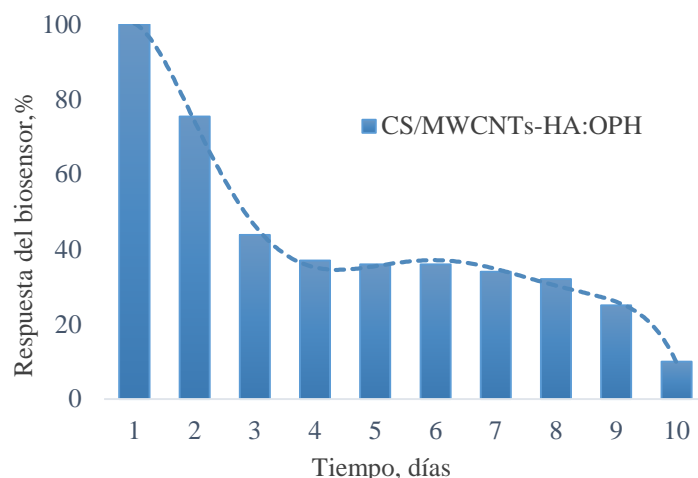


Figura 52. Estabilidad del biosensor de CS-MWCNTs-HA:OPH

La respuesta estable se atribuyó a la buena inmovilización de la enzima en la estructura suave y húmeda del quitosano, además del microambiente favorable proporcionado también por la HA que permitió la preservación actividad de la enzima durante un período más largo.

4.2.5.5 Porcentaje de recuperación

La precisión de las determinaciones se evaluó mediante experimentos de recuperación paraoxón en las muestras de agua del grifo. La recuperación, de acuerdo con las recomendaciones de la IUPAC [213], se estimó calculando la proporción de la concentración de paraoxón encontrada con la del paraoxón agregado en tres niveles diferentes dentro del rango de concentración lineal (20, 40 y 60 mmol L⁻¹). Los resultados obtenidos se incluyen en la Tabla 13. Las altas recuperaciones de paraoxón mostraron resultados satisfactorios con un promedio en el rango de 98.4% a 101.2%, lo que confirma la validez de este nuevo biosensor y demuestran también una ausencia de efectos de la matriz cuando se utiliza el agua del grifo.

Tabla 13. La recuperación de la paraoxón en agua de grifo.

Muestra	Paraoxón agregado $\mu\text{mol L}^{-1}$	Paraoxón encontrado $\mu\text{mol L}^{-1}$	Recuperación %
Agua del grifo	20	20.05	101.2%
	40	40.00	100%
	60	59.00	98.4

5

CONCLUSIONES GENERALES

A partir de los resultados obtenidos y descritos en la Memoria de esta Tesis doctoral se ha llegado a las siguientes conclusiones:

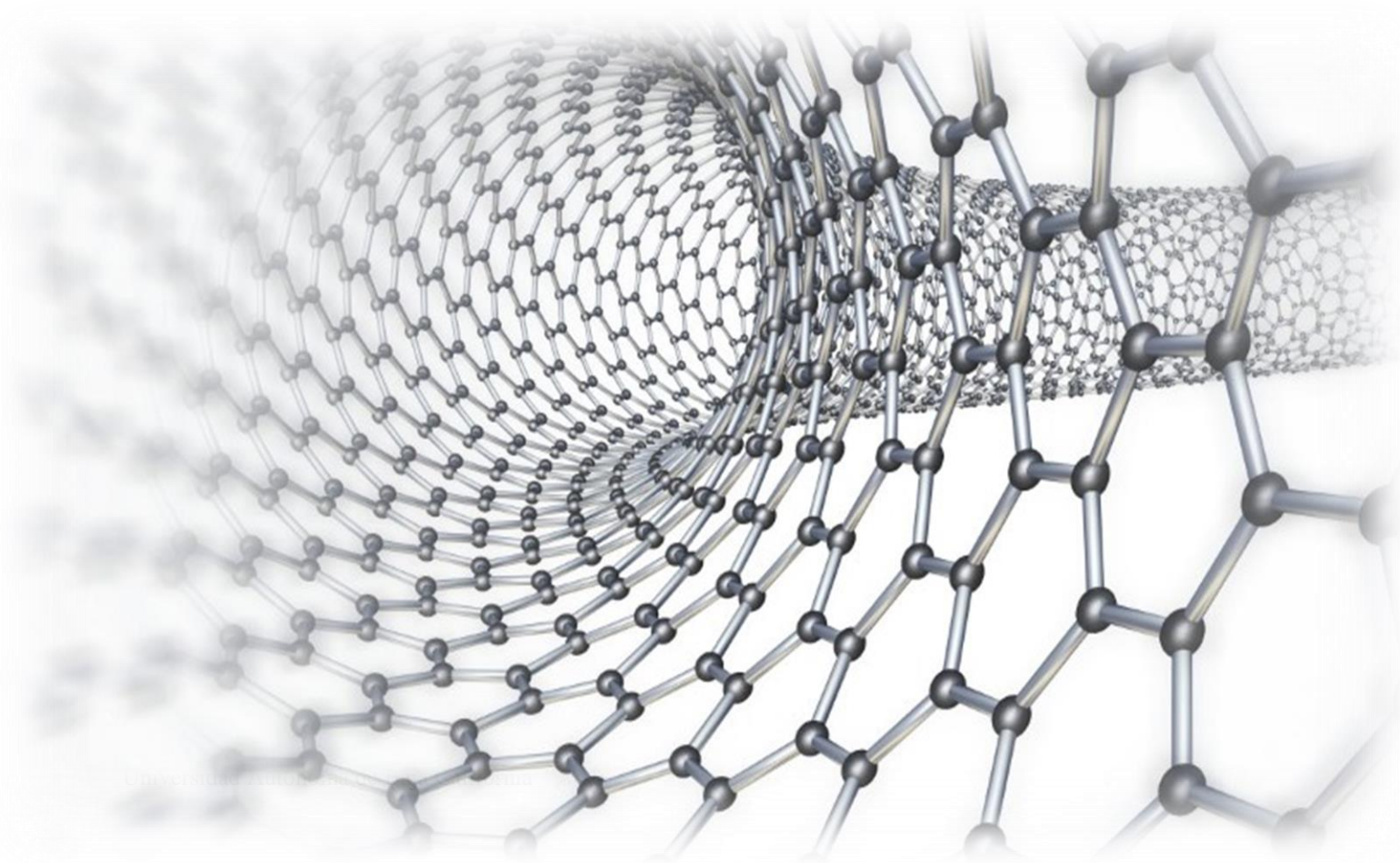
1. La electrodeposición catódica de quitosano sobre GCE con nanomateriales como MWCNTs y las nanopartículas de ZrO_2 son capaces de crear un microambiente muy adecuado para la inmovilización efectiva de la enzima OPH. Esto ha hecho posible el desarrollo de nuevos biosensores amperométricos enzimáticos para la determinación de paraoxón. El biosensor CS/MWCNTs- ZrO_2 :OPH/GCE presenta buenas características analíticas, destacando una elevada sensibilidad y estabilidad, bajo límite de detección, buena estabilidad y un rápido tiempo de respuesta. La utilidad del biosensor desarrollado ha quedado demostrada en el análisis agua de riego, recolectada en canales del valle de Mexicali. La metodología empleada compite favorablemente con las técnicas clásicas, complejas y largas, lo que convierte a este biosensor en una atractiva herramienta analítica para la detección rápida y en campo de pesticidas organofosforados.
2. Asimismo, se prepararon biosensores amperométricos de OPH nanoestructurados con MWCNTs y nanopartículas de hidroxiapatita mediante la estrategia simple y en un solo paso de electrodeposición catódica de quitosano. El efecto sinérgico de los MWCNTs y las nanopartículas de hidroxiapatita mejoró el rendimiento analítico del biosensor CS-MWCNTs-HA/OPH/GCE, comparado con otros métodos analíticos descritos en la literatura. La precisión de las determinaciones del biosensor desarrollado, ha quedado demostrada con los ensayos de recuperación de paraoxón en muestras de agua de grifo. Las altas recuperaciones de paraoxón mostraron resultados satisfactorios con un promedio de 99.8 %, lo que confirma la utilidad de este nuevo biosensor.
3. La caracterización electroquímica de los bionanocompuestos de quitosano sobre el electrodo GCE se llevó a cabo aplicando diversas técnicas voltametría cíclica, cronoamperometría, impedancia electroquímica. Se demostró que tanto su actividad catalítica como el área de superficie activa de los electrodos varían con el contenido de nanomateriales. Los mejores resultados se obtuvieron con las cantidades óptimas encontradas para MWCNTs, ZrO_2 NPs y HANPs fueron 0.25, 0.5 y 5.0 mg mL⁻¹ respectivamente.

-
4. El impacto del uso de nanomateriales de carbono en los sistemas electroquímicos CS-MWCNTs-HA/OPH/GCE y CS/MWCNTs-ZrO₂:OPH/GCE quedó demostrado con el buen desempeño analítico de los biosensores, la mayor capacidad electrocatalítica y área de superficie activa de los electrodos modificados, así como su capacidad para disminuir los efectos de ensuciamiento de la superficie de los electrodos causados por productos poliméricos de oxidación.

 5. Los resultados obtenidos demuestran la utilidad electroanalítica de los biosensores nanoestructurados desarrollados, los cuales mostraron bajos valores de desviación estándar relativa para la repetibilidad de las medidas y la reproducibilidad inter-electrodo, lo que demuestra la fiabilidad de los procesos de fabricación y sugiere la posibilidad de utilizar estos biosensores para la determinación de pesticidas en muestras medioambientales sin necesidad de pretratamiento.

6

REFERENCIAS



-
- [1] OMS. Directrices sobre la gestión de los plaguicidas para la salud pública. [En línea] 2003. [Consultada 30 Agosto 2017]. URL:http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_WHOPES_2003.7_spa.pdf
- [2] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, ed. (1986). «DEFINICIONES PARA LOS FINES DEL CODEX ALIMENTARIUS». Consultado el 22 de marzo de 2016.
- [3] Mulchandani, A., Mulchandani, P., Chen, W., Wang, J., & Chen, L. Amperometric Thick-Film Strip Electrodes for Monitoring Organophosphate Nerve Agents Based on Immobilized Organophosphorus Hydrolase. *Analytical Chemistry*, (1999) 71(11), 2246–2249.
- [4] Mulchandani, P., Mulchandani, A., Kaneva, I., & Chen, W. Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents. 1. Potentiometric enzyme electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, (1999) 14(1), 77–85.
- [5] Muñoz, R.F. Insecticidas organofosforados. Curso de orientación para el buen uso y manejo de las plaguicidas. *Asociación Mexicana de la Industria de Plaguicidas y Fertilizantes*. (1985), 67- 94.
- [6] Eto, M. Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry. *CRC Press. Inc.* Washington, D.C. USA. (1979), 1-4, 159-196.
- [7] Gupta R. Classification and uses of organophosphates and carbamates. In Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds, Gupta RC (ed.). *Academic Press/Elsevier*, Amsterdam. (2006), 5–24.
- [8] Ecobichon D. Efectos tóxicos de los pesticidas. En: Klaassen CD, Watkins JB, editors. Madrid: McGraw-Hill. (2005), 339-53.
- [9] Tsuda T., Kojima M., Harada H., Nakajima A., Aoki S. Accumulation and excretion of fenthion, fenthion sulfoxide and fenthion sulfone by killifish (*Oryzias latipes*). *Comp Biochem Physiol* (1996), 113C(1), 45-9.
- [10] De la Vega M., Martínez L., Macías C. Bioaccumulation of methyl parathion and its toxicology in several species of the freshwater community in Ignacio Ramirez Dam in Mexico. *Ecotoxicol Environ Saf* (1997), 38, 53-62.
- [11] Quin L.D. A guide to organophosphorus chemistry, *Wiley-Interscience*. (2000).
- [12] Corbett J. R., Wright K., Baillie A. C. The biochemical mode of action of pesticides, 2nd ed., Academic press, London. (1984).
- [13] Eto M. Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry, CRS Press, Cleveland. (1974).
- [14] Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización Panamericana de la Salud (OPS), División Salud y Ambiente. Plaguicidas y salud en las Américas, Washington: OMS/OPS, (1993).
- [15] Tang J, Rose RL, Chambers JE. Metabolism of organophosphorus and carbamates pesticides. En: Gupta R, editor. Toxicology of organophosphate & carbamate compounds. New York: Academic Press. (2006), 127-43.

-
- [16] Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización Panamericana de la Salud (OPS), División Salud y Ambiente. Plaguicidas y salud en las Américas, Washington: OMS/OPS, (1993).
- [17] Al-Saleh I A. Pesticides: a review article. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* (1994); 13:151-161.
- [18] Gupta R.C. Organophosphates and carbamates. En: Gupta RC, editor. *Veterinary toxicology: Basic and clinical principles.* New York: Academic Press. (2007), 477-88.
- [19] Maroni M., Colosio C., Ferioli A., Fait A. Organophosphorous pesticides. *Toxicology* (2000) 143:9-37.
- [20] García-Repetto R, Repetto M. Toxicología de los plaguicidas. Ed: Área de Toxicología Univ. De Sevilla, Toxicología de Postgrado. Repetto M. (2003)
- [21] Aldana-Madrid, M. L., Silveira-Gramont, M. I., Zuno-Florian, F. G., & Rodríguez- Olibarría, G. Insecticide Residuality of Mexican Populations Occupationally Exposed. (2013).
- [22] Riviere JE. Dermal absorption/toxicity of organophosphates and carbamates. En: Gupta R, editor. *Toxicology of organophosphate & carbamate compounds.* New York: Academic Press; (2006). p. 209-18.
- [23] Marrs TC, Vale JA. Management of organophosphorus pesticides poisoning. En: Gupta R, editor. *Toxicology of organophosphate & carbamate compounds.* New York: Academic Press; (2006). p. 715-33.
- [24] Corbett, J. R.; Wright, K. & Baillie, A. C. The biochemical mode of action of pesticides, 2nd ed., Academic press, London, ISBN-13: 978-0-12-187860-3, (1984).
- [25] Gupta, R. C. (Ed.) *Toxicology of organophosphate & carbamate compounds*, 1st ed., Elsevier Academic Press London, ISBN-13: 978-0-12-088523-7, (2005).
- [26] Matsumura, F. *Toxicology of insecticides*, Plenum Press, New York. ISBN-10: 0-306-30787-1, (1980).
- [27] Pediatric Environmental Health Specialty Unit (PEHSU). Department of Environmental & Occupational Health Sciences, University of Washington. *Acute Poisoning. Organophosphate Pesticide & Health: A Primer for Health Care Provider.* Retrieved (2007).
- [28] Koepke R., Warner M., Petreas M., Cabria A., Danis R., Hernández M. y Eskenasy B. Serum DDT and DDE levels in pregnant women of Chiapas, Mexico. *Arch Environ Health* (2004) 59, 559-565.
- [29] Paoletti M. y Pimentel D. Environmental risks of pesticides versus genetic engineering for agricultural pest control. *J. Agr. Environ. Ethic.* (2000) 12, 279-303.
- [30] FAO-OMS (2013). Normas Alimentarias. Codex alimentarius. Residuos de plaguicidas en los alimentos y piensos. [en línea]. <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/pesticides/index.html> 15/04/2017.
- [31] Eddleston M., Karaliedde L., Buckley N., Fernando R., Hutchinson G., Isbister G., Konradsen F., Murray D., Piola J.C., Senanayake N., Sheriff R., Singh S., Siwach S.B. y Smit L. (2002). Pesticide poisoning in the developing world -a minimum pesticides list. (2002) 12;360, 1163-7
- [32] Saunders D. S. y Harper C. Pesticides. En *Principles and methods of toxicology* (A.W. Hayes, Ed.). Reven Press. Nueva York, (1994). pp. 389-415.

-
- [33] Repetto M. Toxicología avanzada. Díaz de Santos. Madrid, España. (1995) pp. 636.
- [34] Ayotte P., Giroux S., Dewailly E, Hernández Ávila M., Farías P. Danis R. y Villanueva Díaz C. DDT spraying for malaria control and reproductive function in Mexican men. *Epidemiology*. (2001) 12, 366-367.
- [35] De Jager, C Reduced Seminal Parameters Associated With Environmental DDT Exposure and p,p'-DDE Concentrations in Men in Chiapas, Mexico: A Cross-Sectional Study. *Journal of Andrology*. (2006). 27(1), 16–27.
- [36] Organización Mundial de la Salud (2018). Residuos de plaguicidas en los alimentos. p.<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/pesticide-residues-in-food>. Última vez visitado en 28 de Febrero 2019
- [37] Clark LC, Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann NY Acad Sci*. 1962; 102: 29-45.
- [38] Cammann, K. Biosensors based on ion-selective electrodes. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie*. (1977) 287 (1), 1–9.
- [39] Thevenot D.R., Toth K., Durst R.A., and Wilson, G.S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry*. (1999) 71 (12), 2333–2348
- [40] Gaudin, V. Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin – A comprehensive review. *Biosensors and Bioelectronics* (2017) 90, 363–377.
- [41] Nguyen H., Lee S., Lee U., Fermin C., & Kim M. Immobilized Enzymes in Biosensor Applications. *Materials*. (2019) 12(1), 121.
- [42] MarketsandMarkets, “Biosensors Market by Application (Point of Care, Home Diagnostics, Research Labs, Biodefense, Environmental Monitoring, Food Industry), Product (Wearable, Non-Wearable), Technology (Electrochemical, Piezoelectric, Optical) & Geography - Analysis & Forecast to 2020”. Report Code: SE 3097, (2015).]
- [43] Serna C. L., Zetty A. M., & Ayala A. Use of Enzymatic Biosensors as Quality Indices: A Synopsis of Present and Future Trends in the Food Industry. *Chilean Journal of Agricultural Research*. (2009) 69(2).
- [44] Mehrotra P. Biosensors and their applications - A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. (2016) 6, 153-159.
- [45] Vigneshvar S., Sudhakumari C. C., Senthilkumaran B., & Prakash, H. Recent Advances in Biosensor Technology for Potential Applications – An Overview. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. (2016) 4,11
- [46] Arora P., Sindhu A., Dilbaghi N., Chaudhury A. Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens. *Biosensors and Bioelectronics*. (2011) 28: 1-12.
- [47] Verma N., Bhardwaj A. Biosensor technology for pesticides– a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. (2015) 175: 3093-3119.

-
- [48] Gao Z., Fang Y., Ren J., Ning B., Zhu H., He Y. Studies on biotin–avidin indirect conjugated technology for a piezoelectric DNA sensor. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* (2004) 84,599 – 606.
- [49] Wolfbeis O.S. Fiber-Optic chemical sensors and biosensors. *Anal. Chem.* (2004), 76, 3269-3284.
- [50] Halamek J, Pr ibyl J, Makower A, Skladal P, Scheller FW. Sensitive detection of organophosphates in river water by means of a piezoelectric biosensor. *Anal Bioanal Chem.* (2005) 382 (8): 1904-11.
- [51] Vo-Dinh T., & Cullum, B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry.* (2000) 366(6-7), 540–551.
- [52] Mello, L. D., & Kubota, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry.* (2002) 77(2), 237–256.
- [53] Perumal, V., & Hashim, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *Journal of Applied Biomedicine.* (2014) 12(1), 1–15.
- [54] Copeland, R. A. “Enzymes. A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis”. John Wiley & Sons 2da Edicion. (2000)
- [55] C. Karunakaran R. Rajkumar K. Bhargava. Chapter 1-Introduction to Biosensors. *Biosensors and Bioelectronics.* (2015) pp 1-68.
- [5672] Vaidya, A. M., & Annapure, U. S. Enzymes in Biosensors for Food Quality Assessment. *Enzymes in Food Biotechnology.* (2019) 659–674.
- [57] Vakurov A., Simpson C., Daly C., Gibson T., and Millner, P. Acetylcholinesterase-based biosensor electrodes for organophosphate pesticide detection. *Biosens. Bioelectron.* (2004), 20, 1118–1125.
- [58] Mehrotra P. Biosensors and their applications—A review. *J. Oral Biol. Craniofac. Res.* (2016) 6:153–159.
- [59]: Zhu Y.C., Mei L.P., Ruan Y.F., Zhang N., Zhao W.W., Xu J.J., & Chen H.Y. Enzyme-Based Biosensors and Their Applications. *Advances in Enzyme Technology.* (2019) 201–223.
- [60] “Mecanismo de bloqueo y llave”. Gale Library of Daily Life: Slavery in America, Encyclopedia.com, (2018)
- [61] Ghindilis A.L., Atanasov P., Wilkinst M., Wilkins E. *Biosens. Bioelectron.* (1998)12, 277-286.
- [62] Song K.M., Lee S., Ban C. Aptamers and their biological applications. *Sensors* (2012) 612-631,
- [63] Xu, S., & Mutharasan, R. Cantilever biosensors in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery.* (2009) 4(12), 1237–1251.
- [64] P. Ray, R.R. White Aptamers for targeted drug delivery. *Pharmaceuticals.* (2010) 3, 1761-1778,
- [65] Liu A., Wang K., Weng S., Lei Y., Lin L., Chen W., Lin X., Chen Y. Development of electrochemical DNA biosensors. *Trends Anal. Chem.* (2012) 37, 101-111.

-
- [66] F. Lucarelli, I. Palchetti, G. Marrazza, M. Mascini. Electrochemical DNA biosensor as a screening tool for the detection of toxicants in water and wastewater samples. *Talanta*. (2002)56.
- [67] Quesada C., Claude B., García A.M, del Olmo M., Morin P. *Food Chem.*, (2012)135 (2), 775-779
- [68] Bruggemann K., Haupt L., Yilmaz K., Mosbach J. *Chromatogr.* (2000) 889, 15 – 24
- [69] R. Say, M. Erdem, A. Ersoz, H. Turk, A. Denizli. Biomimetic catalysis of an organophosphate by molecularly surface imprinted polymers. *Appl. Catal. A Gen.*, (2005) 286 221-225.
- [70] S.F. D'Souza. Review Microbial biosensors. *Biosens. Bioelectron.* (2001) 16(6), 337–353
- [71] Mehrvar M., Abdi M. Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors. *Analytical Sciences*. (2004) 20, 1113-1126.
- [72] Whang D., Jin S., Lieber, C. Large-scale hierarchical organization of nanowire arrays for integrated nanosystems. *Nanoletters*. (2003), 3, 1255-1259.
- [73] Vo-Dinh T., & Cullum, B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. (2000) 366(6-7), 540–551
- [74] Janshoff A., Galla H.J., Steinem C. Piezoelectric mass sensing devices as biosensors-an alternative to optical biosensors? *Angew Chem int Ed Engl*, (2000) 39 (22), 4004–4032
- [75] H. Lin, RH Datar. *Rev. Ser. Bench Bedside*. (2006) 27(19) 1.
- [76] Grieshaber D, MacKenzie R, Voeroes J, Reimhult. Electrochemical biosensors—sensor principles and architectures. *Sensors*. (2008) 8(3),1400–1458
- [77] Wang, J. Nanomaterial-based electrochemical biosensors. *Analyst*. (2005)130: 421-426.
- [78] Kurbanoglu S., Zafar M.N., Tasca F., Aslam I., Spadiut O., Leech D., Haltrich D., Gorton L. Amperometric flow injection analysis of glucose and galactose based on engineered pyranose 2-oxidases and osmium polymers for biosensor applications. *Electroanalysis*. (2018) 30, 1496–1504.
- [79] Velasco M.N., Mottram T. Biosensor technology addressing agricultural problems. *Biosyst Eng*. (2003) 84(1):1–12
- [80] Fernández H., Arévalo F.J., Granero A.M., Robledo S.N., Nieto C.H.D., Riberi W.I., Zon M.A. Electrochemical biosensors for the determination of toxic substances related to food safety developed in South America: Mycotoxins and herbicides. *Chemosensors*. (2017) 5, 23
- [81] Murugaiyan S.B., Ramasamy R., Gopal N., Kuzhandaivelu V. Biosensors in clinical chemistry: An overview. *Adv. Biomed. Res*. (2014) 3, 67.
- [82]. Tseng T.-F., Yang Y.-L., Chuang M.-C., Lou S.-L., Galik M., Flechsig G.-U., Wang J. Thermally stable improved first-generation glucose biosensors based on nafion/glucose-oxidase modified heated electrodes. *Electrochem. Commun*. (2009) 11, 1819–1822.

-
- [83]. Mayorga Martinez C.C., Treo E.F., Madrid R.E., Felice C.C. Real-time measurement of glucose using chrono-impedance technique on a second generation biosensor. *Biosens. Bioelectron.* (2011) 29, 200–203.
- [84]. Palmisano F., Zambonin P.G., Centonze D., Quinto M. A disposable, reagentless, third-generation glucose biosensor based on overoxidized poly(pyrrole)/tetrathiafulvalene-tetracyanoquinodimethane composite. *Anal. Chem.* (2002) 74, 5913–5918.
- [85] Tasca F., Ludwig R., Gorton L., Antiochia R. Determination of lactose by a novel third generation biosensor based on a cellobiose dehydrogenase and aryl diazonium modified single wall carbon nanotubes electrode. *Sens. Actuators B Chem.* (2013) 177, 64–69.
- [86] ISO/TS 27687. Nanotechnologiesd-terminology and definitions for nano-objects-nanoparticle, nanofibre and nanoplate. (2008) International Organization for Standardization.
- [87] Edelstein A.S; Cammaratra R.C. Nanomaterials Synthesis Properties and Applications, Second Edition. IOP Publishing. (1998).
- [88] Kaur, N., & Prabhakar, N. Current scenario in organophosphates detection using electrochemical biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* (2017) 92, 62–85.
- [89] Wang, J. Nanomaterial-based electrochemical biosensors. *The Analyst.* (2005) 130(4), 421.
- [90] Wang, J. Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Electroanalysis.* (2005) 17(1), 7–14
- [91] Hayat, A., Catanante, G., & Marty, J. Current Trends in Nanomaterial-Based Amperometric Biosensors. *Sensors.* (2014) 14(12), 23439–23461.
- [92] Yáñez-Sedeño P., Villalonga R., Pingarrón J.M., “Encyclopedia of Analytical Chemistry”, Ed. R.A. Meyers, John Wiley & Sons, Chichester, UK. (2015)
- [93] L. Rassaei, M. Amiri, C.M. Cirtiu, M. Sillanpaa, F. Marken, M.Sillanpaa. Nanoparticles in electrochemical sensors for environmental monitoring. *Trends Anal. Chem.*, (2011) 30, 1704-1715.
- [94] Wang, J. Nanomaterial-based electrochemical biosensors. *The Analyst.* (2005) 130(4), 421.
- [95] Periasamy A.P., Umasankar Y., Chen S.M. Nanomaterials-acetylcholinesterase enzyme matrices for organophosphorus pesticides electrochemical sensors: a review. *Sensors.* (2009) 9, 4034-4055.
- [96] Putzbach, W., Ronkainen, N. J. Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: A review. *Sensors.* (2013) 13: 4811-4840.
- [97] Kumar, S., Ahlawat, W., Kumar, R., Dilbaghi, N. Graphene, carbon nanotubes, zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare. *Biosensors and Bioelectronics.* (2015) 70, 498-503.
- [98] Holzinger, M., Le Goff, A., Cosnier, S. Nanomaterials for biosensing applications: a review. *Frontiers in Chemistry.* (2014) 2: 63.

-
- [99] Yáñez-Sedeño P., Villalonga R., Pingarrón J. MElectroanalytical methods based on hybrid nanomaterials. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. (2015). 1-18.
- [100] Kroto H, Allaf A, Balm S. C60: Buckmin-sterfullerene. *Chem. Rev.* (1991) 1213-1235.
- [101] V. Popov. Carbon nanotubes: properties and application. *Mater. Sci. Eng. R: Rep.*, (2004) 43(3), 61-102
- [102] Iijima S. Helical Microtubules of Graphitic Carbon. *Nature*. (1991) 354, 56-58.
- [103] Kim, J. H., Hong, S.-G., Wee, Y., Hu, S., Kwon, Y., Ha, S., & Kim, J. Enzyme precipitate coating of pyranose oxidase on carbon nanotubes and their electrochemical applications. *Biosensors and Bioelectronics*. (2017) 87, 365–372.
- [104] Liu, Y., Wang, M., Zhao, F., Xu, Z., & Dong, S. The direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensor based on carbon nanotubes/chitosan matrix. *Biosensors and Bioelectronics*. (2005) 21(6), 984–988.
- [105] Balasubramanian, K., Burghard M. Biosensors based on carbon nanotubes *Anal. Bioanal. Chem.*, (2006) 385(3) 452-460
- [106] Vairavapandian D., Vichchulada P., Lay M.D. Preparation and modification of carbon nanotubes:review of recent advances and applications in catalysis and sensing. *Anal. Chim. Acta*. (2008) 626, 119-129.
- [107] Tasis, D., Tagmatarchis, N., Bianco, A., & Prato, M. Chemistry of Carbon Nanotubes. *Chemical Reviews*. (2006) 106(3), 1105–1136.
- [108] Kumar, S., Ahlawat, W., Kumar, R., & Dilbaghi, N. Graphene, carbon nanotubes, zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare. *Biosensors and Bioelectronics*. (2015) 70, 498–503.
- [109] Chen X., Dong S. Sol-gel-derived titanium oxide/copolymer composite based glucose biosensor. *Biosens. Bioelectron*. (2003)18, 999-1004.
- [110] Pundir, S., Chauhan, N., Narang, J., & Pundir, C. S. Amperometric choline biosensor based on multiwalled carbon nanotubes/zirconium oxide nanoparticles electrodeposited on glassy carbon electrode. *Analytical Biochemistry*. (2012) 427(1), 26–32.
- [122] Kanchana, P., & Sekar, C. Development of electrochemical folic acid sensor based on hydroxyapatite nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. (2015) 137, 58–65.
- [112] Yang, Y., Yang, H., Yang, M., liu, Y., Shen, G., & Yu, R. Amperometric glucose biosensor based on a surface treated nanoporous ZrO₂/Chitosan composite film as immobilization matrix. *Analytica Chimica Acta*. (2004) 525(2), 213–220
- [113] Delgado J.A., Morejón L., Martínez S., Gil F.J. Cerámicas de circona para aplicaciones biomédicas. *Biomecánica*. (2003) 11, , pp. 46-52

-
- [1114] Kumari, L., Li, W. Z., Xu, J. M., Leblanc, R., Wang, D. Z., Li, Y., Zhang, J. Controlled hydrothermal synthesis of zirconium oxide nanostructures and their optical properties. *Crystal Growth and Design*. (2009) 9(9), 3874-3880.
- [115] Joo, J., Yu, T., Kim, Y. W., Park, H. M., Wu, F., Zhang, J. Z., & Hyeon, T. Multigram Scale Synthesis and Characterization of Monodisperse Tetragonal Zirconia Nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society*. (2003) 125(21), 6553-6557.
- [116] Jung Y., Kim H., Park J., Park D., Park J.H. Effect of heat-treatment on phase formation and crystallization of sol-gel derived Al₂O₃, ZrO₂-Y₂O₃, and Ta₂O₅ oxide coatings. *Journal of Asian Ceramic Societies*. (2015) 3, 217-220.
- [117] Riquezes G., Liscano S., Jiménez H., Mata A. Influencia de la granulometría en la microestructura de los recubrimientos cerámicos de base zirconia obtenidos por termorociado. *DIP*, (2012) 352-356.
- [118] Dobson, K.D., McQuillan, A.J., An infrared spectroscopic study of carbonate adsorption to zirconium dioxide sol-gel film from aqueous solutions. *Langmuir*. (1997) 13, 3392-3396.
- [119] Pundir, S., Chauhan, N., Narang, J., & Pundir, C. S. Amperometric choline biosensor based on multiwalled carbon nanotubes/zirconium oxide nanoparticles electrodeposited on glassy carbon electrode. *Analytical Biochemistry*. (2012) 427(1), 26-32.
- [120] Liu, S.Q., Xu, J.J., Chen, H.Y. ZrO₂ gel-derived DNA modified electrode and the effect of lanthanide on its electron transfer behavior. *Bioelectrochemistry*. 57, 149-154.
- [121] Bagbi, Y., Sharma, A., Bohidar, H. B., & Solanki, P. R. Immunosensor based on nanocomposite of nanostructured zirconium oxide and gelatin-A. *International Journal of Biological Macromolecules*. (2016) 82, 480-487
- [122] Kumar, S., Kumar, S., Tiwari, S., Srivastava, S., Srivastava, M., Yadav, B. K., ... Malhotra, B. D. Biofunctionalized Nanostructured Zirconia for Biomedical Application: A Smart Approach for Oral Cancer Detection. *Advanced Science*. (2015) 2(8), 1500048
- [123] Yunhui Y., Wang Z., Yang M, Li J., Zheng F., Shen G., Yu R. Electrical detection of deoxyribonucleic acid hybridization based on carbon-nanotubes/nano zirconium dioxide/chitosan-modified electrodes. *Analytica Chimica Acta*. (2007) 584, 268-274.
- [124] Das, M., Sumana, G., Nagarajan, R., & Malhotra, B. D. Zirconia based nucleic acid sensor for Mycobacterium tuberculosis detection. *Applied Physics Letters*. (2010) 96(13), 133703.
- [125] Y. Yuan, S.L. Tang, H. Hong, C.S. Liu, Chin. Synthesis of nano-scaled hydroxyapatite and its anti-tumor activity. *J. Biomed. Eng.* (2005)24, 27-30.
- [126] Y.H. Qin, Y.J. Zhang, X.D. Xu, Direct electrochemistry of cytochrome c at hydroxyapatite modified glassy carbon electrodes. *Acta Chim. Sin.* (2004) 62 860-863.
- [127] M.P. Reddy, A. Venugopal, M. Subrahmanyam Hydroxyapatite photocatalytic degradation of calmagite (an azo dye) in aqueous suspension. *Appl. Catal. B: Environ.*, (2007) 69 164-170

-
- [128] Zhang Q, Chen C, Xie Q, Liu P. Electrodeposition of a biocompatible hydroxyapatite matrix to immobilize glucose oxidase for sensitive glucose biosensing. *Microchim Acta*. (2009) 165, 223–229
- [129] M.P. Mahabole, R.C. Aiyer, C.V. Ramakrishna, B. Sreedhar, R.S. Khairnar. Synthesis, characterization and gas sensing property of hydroxyapatite ceramic. *Bull. Mater. Sci.* (2005) 28, 535–545
- [130] Li, Y., Lv, X., Wu, D., Ma, H., Feng, R., Wang, Y., Wei, Q. Biosensor impreso en pantalla para peróxido de hidrógeno basado en hidroxiapatita modificada con azul de Prusia. *Diario de polímeros y materiales inorgánicos y organometálicos*. (2013) 23(4), 917–922.
- [131] Zhou HL, Wu T, Dong XL, et al. Adsorption mechanism of BMP-7 on hydroxyapatite (001) surfaces. *Biochem Biophys Res Commun*. (2007) 361, 91–96.
- [132] Koev S.T., Dykstra P., Luo X., Rubloff G., Bentley E., Payne G., Ghodssi R. Chitosan: An integrative biomaterial for lab-on-a-chip devices. *Lab Chip*. (2010) 10, 3026–3042.
- [133] Younes, I., Rinaudo, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs*. (2015) 13, 1133–1174.
- [134] Kim, E., Xiong, Y., Cheng, Y., Wu, H.-C., Liu, Y., Morrow, B. Payne, G. Chitosan to Connect Biology to Electronics: Fabricating the Bio-Device Interface and Communicating Across This Interface. *Polymers*. (2014) 7(1), 1–46.
- [135] Pang, X.; Zhitomirsky, I. Electrophoretic deposition of composite hydroxyapatite-chitosan coatings. *Mater. Charact.* (2007) 58, 339–348.
- [136] Wang Y., Geng, Z., Guo M., Chen Y, Guo X., Wang X. Electroaddressing of ZnS quantum dots by codeposition with chitosan to construct fluorescent and patterned device surface. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. (2014) 6, 15510–15515.
- [137] Liu B., Deng Y., Hu X., Gao Z, Sun C. Electrochemical sensing of trichloroacetic acid based on silver nanoparticles doped chitosan hydrogel film prepared with controllable electrodeposition. *Electrochim. Acta* (2012) 76, 410–415.
- [138] Wu G., Bao X., Zhao S., Wu J., Han A., & Ye Q. Analysis of multi-pesticide residues in the foods of animal origin by GC–MS coupled with accelerated solvent extraction and gel permeation chromatography cleanup. *Food Chemistry*. (2011) 126, 646–654
- [139] Pinho G., Neves A. Queiroz M. & Silvério F. Optimization of the liquid–liquid extraction method and low temperature purification (LLE–LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. *Food Control*. (2010) 21, 1307–1311
- [140] Hassan J., Farahani A., Shamsipur M & Damerchili F. Rapid and simple low density miniaturized homogeneous liquid–liquid extraction and gas chromatography/mass spectrometric determination of pesticide residues in sediment. *J. Hazard. Materials*. (2010) 184, 869–871
- [141] Wu C., Liu N., Wu Q., Wang C. & Wang, Z. Application of ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction for the determination of some organophosphorus pesticides in water samples. *Anal. Chim. Acta*. (2010) 679, 56–62

-
- [142] Qu L., Zhang H., Zhu J., Yang G. & Aboul Y. Rapid determination of organophosphorous pesticides in leeks by gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. *Food Chemistry*. (2010) 122, 327–332
- [143] Wang, Y. & Du, R. Simultaneous extraction of trace organophosphorous pesticides from plasma sample by automated solid phase extraction and determination by gas chromatography coupled with pulsed flame photometric detector. *Forensic Science International*. (2010) 198, 70–73
- [144] Zehani N, Dzyadevych S, Kherrat R, Jaffrezic N. Sensitive impedimetric biosensor for direct detection of diazinon based on lipases. *Front Chem*. (2014) 2:44
- [145] Stoytcheva M. & Zlatev R. Organophosphorus pesticides determination by electrochemical biosensors M. Stoytcheva (Ed.), *Pesticides–Strategies for Pesticides Analysis*, InTech, Croatia (2011), pp. 359-372
- [146] Stoytcheva M. & Zlatev R. Recent trends in the development of electrochemical biosensors for organophosphorus pesticides determination M. Aliofkhaezai (Ed.), *Modern Electrochemical Methods in Nano, Surface and Corrosion Science*, InTech, Croatia (2014), pp. 83-97
- [147] Andreescu S., Marty J. Twenty years research in cholinesterase biosensors: from basic research to practical applications. *Biomol. Eng.*, (2006) 23, 1-15
- [148] Masson P. & ockridge O. Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: Catalytic complexities and hysteretic behavior *Arch. Biochem. Biophys.*, (2010) 494, 107-120
- [149] Patel H., Rawtani D., & Agrawal Y. A newly emerging trend of chitosan-based sensing platform for the organophosphate pesticide detection using Acetylcholinesterase-a review. *Trends in Food Science & Technology*. (2019)
- [150] Arduini F, Amine A, Moscone D, Palleschi G. Biosensors based on cholinesterase inhibition for insecticides, nerve agents and aflatoxin B1 detection (review). *Microchim Acta*. (2010) 170:193–214
- [151] Amine A, Arduini F, Moscone D, Palleschi G. Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition. *Biosens Bioelectron*. (2016) 76:180–194
- [152] Andreescu S., Marty J. Twenty years research in cholinesterase biosensors: from basic research to practical applications. *Biomol. Eng.*, (2006) 23, 1-15
- [153] Periasamy AP, Umasankar Y, Chen S. Nanomaterials acetylcholinesterase enzyme matrices for organophosphorus pesticides electrochemical sensors:a review. *Sensors*. (2009)9:4034–4055
- [154] Benilova I, Arkhypova Dzydevych SV, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Soldatkin P. Kinetics of human and horse sera cholinesterases inhibition with solanaceous glycoalkaloids: study by potentiometric biosensor. *Pestic Biochem Phys*. (2006) 86:203–210
- [155] Marty J., Mionetto N., Lacorte S., Barceló D. Validation of an enzymatic biosensor with various liquid chromatographic techniques for determining organophosphorus pesticides and carbaryl in freeze-dried waters. *Anal. Chim. Acta*. (1995) 311(3), 265-271.
- [156] Du D., Asiri A.M., Wang J., Lin Y. Electrochemical biosensors based on nanomaterials for detection of pesticides and explosives A. Street, R. Sustich, J. Duncan, N. Savage (Eds.), *Nanotechnology Applications for Clean Water (Second Edition): Solutions for Improving Water Quality*, Elsevier Inc., United States (2014), pp. 47-62

-
- [156] D. Du, M. Wang, J. Cai, Y. Qin, & A. Zhang, "One-step synthesis of multiwalled carbon nanotubes-gold nanocomposites for fabricating amperometric acetylcholinesterase biosensor," *Sensors and Actuators B*. (2010) 143(2) 524–529.
- [158] Yang Y., Guo M., Yang M., Wang Z., Shen G., & Yu R., "Determination of pesticides in vegetable samples using an acetylcholinesterase biosensor based on nanoparticles ZrO₂/chitosan composite film," *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. (2005) 85(3), 163–175.
- [159] Li Y., Gan Z. Immobilization of acetylcholinesterase on one-dimensional gold nanoparticles for detection of organophosphorous insecticides. *Science China Chemistry*. (2010) 53(4), 820–825.
- [160] Norouzi, M. Pirali M. Ganjali R. & F. Faridbod. A novel acetylcholinesterase biosensor based on chitosan-gold nanoparticles film for determination of monocrotophos using FFT continuous cyclic voltammetry. *International Journal of Electrochemical Science*. (2010) 5(10), 1434–1446.
- [161] Upadhyay S., Rao G., Sharma M., Bhattacharya K., Rao K., & Vijayaraghavan R. Immobilization of acetylcholinesterase-choline oxidase on a gold-platinum bimetallic nanoparticles modified glassy carbon electrode for the sensitive detection of organophosphate pesticides, carbamates and nerve agents. *Biosensors and Bioelectronics*. (2009) 25(4) 832–838.
- [162] Wang K., Li H., Wu J. TiO₂-decorated grapheme nanohybrids for fabricating an amperometric acetylcholinesterase biosensor. *Analyst*. (2011) 136(16) 3349–3354.
- [163] Ion A., Ion I., Culetu A. Acetylcholinesterase voltammetric biosensors based on carbon nanostructure-chitosan composite material for organophosphate pesticides. *Materials Science and Engineering C*. (2010) 30(6), 817–821.
- [164] Chauhan N., Pundir C. An amperometric biosensor based on a cetylcholinesterase immobilized onto iron oxide nanoparticles/multiwalled carbon nanotubes modified gold electrode for measurement of organophosphorus insecticides. *Anal. Chim. Acta*. (2011) 701, 66–74
- [165] Bao J., Huang T., Wang Z., Yang H., Geng X., Xu G., Hou C. 3D Graphene/Copper Oxide Nano-flowers Based Acetylcholinesterase Biosensor for Sensitive Detection of Organophosphate Pesticides. *Sensors and Actuators B: Chemical*. (2018)
- [166] Wang Y., Zhang S., Du D., Shao Y., Li Z., Wang J., Engelhard M. H., Li J., Lin Y. Self assembly of acetylcholinesterase on a gold nanoparticles–graphene nanosheet hybrid for organophosphate pesticide detection using polyelectrolyte as a linker. *Journal of Materials Chemistry*. (2011) 21: 5319-5325.
- [167] Yang Y., Asiri A. M., Du D., Lin Y. Acetylcholinesterase biosensor based on a gold nanoparticle–polypyrrole–reduced graphene oxide nanocomposite modified electrode for the amperometric detection of organophosphorus pesticides. *Analyst*. (2014)139, 3055-3060.
- [168] Ivanov Y., Marinov I., Gabrovska K., Dimcheva N. & Godjevargova T. Amperometric biosensor based on a site-specific immobilization of acetylcholinesterase via affinity bonds on a nanostructured polymer membrane with integrated multiwall carbon nanotubes. *Journal of Molecular Catalysis B*. (2010) 63(3-4), 141–148.
- [169] Du D., Ye X., Cai J., Liu J. & Zhang A. Acetylcholinesterase biosensor design based on carbon nanotube-encapsulated polypyrrole and polyaniline copolymer for amperometric detection of organophosphates. *Biosensors and Bioelectronics*. (2010) 25(11), 2503–2508.

-
- [170] Mulchandani A., Chen W., Mulchandani P., Wang J., Rogers K. Biosensors for direct determination of organophosphate pesticides. *Biosens. Bioelectron.*, (2001) 16, 225-230
- [171] Sogorb M. & Vilanova E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol. Lett.*, (2002) 128, 215-228
- [172] Mulchandani, A., Chen, W., Mulchandani, P., Wang, J., & Rogers, K. R. Biosensors for direct determination of organophosphate pesticides. *Biosensors and Bioelectronics*. (2001) 16(4-5), 225-230.
- [173] Wang, J., Krause, R., Block, K., Musameh, M., Mulchandani, A. & Schöning M. J. Flow injection amperometric detection of OP nerve agents based on an organophosphorus-hydrolase biosensor detector. *Biosensors and Bioelectronics*. (2003) 18(2-3), 255-260.
- [174] Deo, R. P., Wang, J., Block, I., Mulchandani, A., Joshi, K. A., Trojanowicz, M., Lin, Y. Determination of organophosphate pesticides at a carbon nanotube/organophosphorus hydrolase electrochemical biosensor. *Analytica Chimica Acta*. (2005) 530(2), 185-189.
- [175] Zhang, Y., Arugula, M. A., Wales, M., Wild, J., & Simonian, A. L. A novel layer-by-layer assembled multi-enzyme/CNT biosensor for discriminative detection between organophosphorus and non-organophosphorus pesticides. *Biosensors and Bioelectronics*. (2015) 67, 287-295.
- [176] Lei, C., Valenta, M. M., Saripalli, K. P., & Ackerman, E. J. Biosensing Paraoxon in Simulated Environmental Samples by Immobilized Organophosphorus Hydrolase in Functionalized Mesoporous Silica. *Journal of Environment Quality*. (2007) 36(1), 233.
- [177] Mulchandani, P., Chen, W., & Mulchandani, A. Microbial biosensor for direct determination of nitrophenyl-substituted organophosphate nerve agents using genetically engineered *Moraxella* sp. *Analytica Chimica Acta*. (2006) 568(1-2), 217-221.
- [178] Mulchandani, P., Chen, W., y Mulchandani, A. Biosensor de enzima amperométrico de inyección de flujo para la determinación directa de agentes del nervio organofosfato. *Environmental Science & Technology*. (2001) 35 (12), 2562-2565.
- [179] Ferreira, M.; Varela, H.; Toressi, R.; Tremiliosi-Filho, G. Electrode passivation caused by polymerization of different phenolic compounds. *Electrochim. Acta*. (2006) 52(2), 434-442.
- [180] Stoytcheva M., Zlatev R., Gochev V., Velkova Z. & Montero G. Amperometric biosensor precision improvement: application to organophosphorus pesticide determination. *Anal. Methods*. (2014) 6, 8232-8238.
- [181] Stoytcheva M., Gochev V., Velkova Z. Electrochemical biosensors for direct determination of organophosphorus pesticides: a review. *Curr. Anal. Chem.*, (2016)12, 37-42.
- [182] Liu, S., Yuan, L., Yue, X., Zheng, Z., & Tang, Z. Recent Advances in Nanosensors for Organophosphate Pesticide Detection. *Advanced Powder Technology*. (2008) 19(5), 419-441.
- [183] Pedrosa, V.A.; Paliwal, S.; Balasubramanian, S.; Nepal, D.; Davis, V.; Wild, J.; Ramanculo, E.; Simonian, A. Enhanced stability of enzyme organophosphate hydrolase interfaced on the carbon nanotubes. *Coll. Surf. B: Biointerface*. (2010), 77, 69-74.
- [184] Deo R., Wang J., Block I., Mulchandani A., Joshi K., Trojanowicz M., Scholz F., Chen W., Lin Y. Determination of organophosphate pesticides at a carbon nanotube/organophosphorus hydrolase electrochemical biosensor *Anal. Chim. Acta*. (2005) 530, 185-189.

-
- [185] Bao J., Hou C., Huo D., Dong Q., Ma X., Sun X. Lei Y. Biosensor electroquímico sensible y selectivo basado en ELP-OPH/BSA/TiO₂NFs/AuNPs para la determinación de pesticidas organofosforados con sustituyente nitrofenilo. *Diario de la Sociedad Electroquímica*. (2016)164(2), G17-G22.
- [186] Trojanowicz, M., Mulchandani, A., & Mascini, M. Carbon Nanotubes-Modified Screen-Printed Electrodes for Chemical Sensors and Biosensors. *Analytical Letters*. (2004) 37(15), 3185–3204.
- [187] Zhao Y., Zhang S., Ma J., Leng KL. & Labuda J. Determination of Carbamate Pesticide Methomyl Using Acetylcholinesterase / MWNTs-Chitosan Modified Glassy 997 Carbon Electrode. *Sensing in electroanalysis*. (2012)7,283–292.
- [188] Devadas, B., Rajkumar, M., Chen, S.-M., & Yeh, P.-C. A novel voltammetric p-nitrophenol sensor based on ZrO₂ nanoparticles incorporated into a multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Anal. Methods*. (2014) 6(13), 4686–4691.
- [189] Zhou, J., Deng, C., Si, S. & Wang, S. Zirconia electrodeposited on a self-assembled monolayer on a gold electrode for sensitive determination of parathion. *Microchimica Acta*. (2010) 172(1-2), 207–215.
- [190] Zhu N., Zhang A., Wang Q., He P., Fang Y. Electrochemical detection of DNA hybridization using methylene blue and electro-deposited zirconia thin films on gold electrodes. *Anal. Chim. Acta*. (2004) 510 163–168.
- [191] Liu G., Lin Y., Electrochemical sensor for organophosphate pesticides and nerve agents using zirconia nanoparticles as selective sorbents. *Anal. Chem*. (2005) 77, 5894–5901
- [192] Wang M., & Li Z. Nano-composite ZrO₂/Au film electrode for voltammetric detection of parathion. *Sensors and Actuators B: Chemical*. (2008) 133(2), 607–612.
- [193] Yin H, Zhou Y, Ai S. Electrochemical oxidative determination of 4-nitrophenol based on a glassy carbon electrode modified with a hydroxyapatite nanopowder. *Microchim Acta*. (2010) 169, 87–92.
- [194] Kim E., Xiong Y., Cheng Y., Wu H., Liu Y., Morrow B. Payne G. Chitosan to Connect Biology to Electronics: Fabricating the Bio-Device Interface and Communicating Across This Interface. *Polymers*. (2014) 7(1), 1–46.
- [195] Sengiz C, Congur G, Eksin E. Multiwalled carbon nanotubes-chitosan modified single-use biosensors for electrochemical monitoring of drug-DNA interactions. *Electroanalysis*. (2015) 27,1855–1863.
- [196] Pighinelli L, Kucharska M. Chitosan-hydroxyapatite composites. *Carbohydr Polym*. (2013) 93,256–262.
- [197] Dumas D. P., Caldwell S. R., Wild J. R., Raushel F. Purification and properties of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *J. Biol. Chem.*, (1989) 264, 19659-19665.
- [198] Benning M. M., Kuo J. M., Raushel F. M., Holden H. M. Three-dimensional structure of phosphotriesterase: an enzyme capable of detoxifying organophosphate nerve agents. *Biochem.*, (1994) 33, 15001.
- [199] Peña D., Estupiñán H., Córdoba E.M, Martínez R., Vásquez C. Chitosan/calcium phosphate coating obtained by electrodeposition on titanium alloy. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*. (2010) 54, 15-23.

-
- [200] Qiu J., Xie H., Liang, R. Preparation of porous chitosan/carbon nanotubes film modified electrode for biosensor application. *Microchim. Acta.* (2008), 162, 57–64.
- [201] Demirkol D.O. & Timur. S. Chitosan matrices modified with carbon nanotubes for use in mediated microbial biosensing. *Microchim Acta.* (2011), 173, 537–542.
- [202] Kang X., Mai Z., Zou X., Cai P., Mo J. Glucose biosensors based on platinum nanoparticles-deposited carbon nanotubes in sol–gel chitosan/silica hybrid. *Talanta.* (2008), 74, 879–886.
- [203] Bard J. & Faulkner L. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed.; Wiley: New York, 2001.
- [204] Niesner R. & Heintz A. Diffusion coefficients of aromatics in aqueous solution. *J. Chem. Eng. Data.* (2000) 45, 1121-1124.
- [205] Galus Z. *Fundamentals of Electrochemical Analysis*. Ellis Horwood: New York, 1976.
- [206] Das M., Dhand C., Sumana G., Srivastava A., Nagarajan R., Nain L., Iwamoto M., Manaka T., Malhotra B. Electrophoretic fabrication of chitosan-zirconium-oxide nanobiocomposite platform for nucleic acid detection. *Biomacromolecules.* (2011) 12(3), 540–547.
- [207] Maza I., Hernandez C. Caracterización de quitosano para su aplicación como bioabsorbente de metales. *Revista de la facultad de ciencias de UNI, REVCUNI.* (2007) 11, 1-5
- [208] Pundir S., Chauhan N., Narang J., & Pundir C. S. Amperometric choline biosensor based on multiwalled carbon nanotubes/zirconium oxide nanoparticles electrodeposited on glassy carbon electrode. *Analytical Biochemistry.* (2012)427(1), 26–32.
- [209] Chough S.H., Mulchandani A., Mulchandani P., Chen W., Wang J., Rogers K. Organophosphorus hydrolase-based amperometric sensor: modulation of sensitivity and substrate selectivity. *Electroanalysis.* (2002) 14(4), 274-276.
- [210] Lee J., Park J., Min K, et al. A novel organophosphorus hydrolase-based biosensor using mesoporous carbons and carbon black for the detection of organophosphate nerve agents. *Biosens Bioelectron.* (2010) 25,1566–1570.
- [211] Laothanachareon T., Champreda V., Sritongkham P., Somasundrum M., Surareungchai W., Cross-linked enzyme crystals of organophosphate hydrolase for electrochemical detection of organophosphorus compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* (2008) 24, 3049-3055.
- [212] Wang J., Chen L., Mulchandani A., Mulchandani P., Chen W., Remote biosensor for in-situ monitoring of organophosphate nerve agents. *Electroanalysis.* (1999) 11(12), 866-869.
- [213] Harmonized Guidelines for the use of recovery information in analytical measurements. IUPAC/ISO/AOAC INTERNATIONAL/EURACHEM. Technical report, 1996.
- [214] Kumar CSSR, editor. *Nanomaterials for biosensors*. Weinheim: Wiley-VCH; 2007.

ANEXO A

PUBLICACIONES

▪ Capítulos de libro

M. T. Beleño, M. Stoytcheva, R. Zlatev, G. Montero, R. Torres and L. Toscano. Fenitrothion: structural features, applications, toxicity mechanisms and effects of exposure on human health: A Review. Nova Science Publishers. 2016. Pp. 92-104. ISBN: 978-1-63485-450-4.

▪ Artículos indexados

M. T. Beleño, M. Stoytcheva, R. Zlatev, G. Montero, Z. Velkova & V. Gochev. Chitosan Nanocomposite Modified OPH-Based Amperometric Sensor for Organophosphorus Pesticides Determination. 2017. Current Analytical Chemistry, 75-82, 14(1).

OTROS PRODUCTOS

Mary Triny Beleño Cabarcas, Margarita Stilianova Stoytcheva, Roumen Koytchev Zlatev, Gisela Montero Alpírez. Biosensor nanoestructurado para la determinación de paraoxón. XXXVIII encuentro nacional de la AMIDIQ. Ixtapa Zihuatanejo, Gro., México, del 9 al 12 de mayo 2017. pp.126-133. ISBN: 978-607-95593-5-9.

Beleño Mary Triny, Stoytcheva Margarita, Zlatev Roumen, Montero Gisela, Valdés Benjamín, Torres Ricardo. Nuevo biosensor incorporado con MWCNTS e hidroxiapatita para la determinación de paraoxón. XXI Congreso internacional en ciencias agrícolas. Biotecnología y desarrollo sustentable: retos y oportunidades en el área agrícola 25 y 26 Octubre 2018. pp. 143-148. ISBN: 978-84-947996-6-2.

Chapter 3

**FENITROTHION: STRUCTURAL FEATURES,
APPLICATIONS, TOXICITY MECHANISMS
AND EFFECTS OF EXPOSURE ON HUMAN
HEALTH - A REVIEW**

***M. T. Beleño¹, M. Stoytcheva¹, R. Zlatev¹,
G. Montero¹, R. Torres¹ and L. Toscano²***

¹Autonomous University of Baja California,
Engineering Institute,
Mexicali, Mexico

²Technological Institute of Mexicali,
Mexicali, Mexico

ABSTRACT

Fenitrothion is a broad spectrum organophosphate pesticide used in agricultural production for insects and mollusks control in various crops. It is used in public health programs and domestic hygiene as well (for malaria and dengue control) due to its high toxicity to insects and low persistence in the environment. However, fenitrothion is highly toxic to human health, as well as for the animals, and causes serious environmental problems. Like other organophosphorus compounds, fenitrothion affects the nerve impulses transmission. It also inhibits irreversibly the acetylcholinesterase, an enzyme present in vertebrates and insects catalyzing very efficiently the hydrolysis of the

RESEARCH ARTICLE

Chitosan Nanocomposite Modified OPH-Based Amperometric Sensor for Organophosphorus Pesticides Determination

Mary Triny Beleño Cabarcas^a, Margarita Stoytcheva^{a,*}, Roumen Zlatev^a, Gisela Montero^a, Zdravka Velkova^b and Velizar Gochev^c

^aInstituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, México; ^bDep. Chemical Sciences, Faculty of Pharmacy, Medical University of Plovdiv, Plovdiv, Bulgaria; ^cDep. Biochemistry and Microbiology, Faculty of Biology, Plovdiv University "P. Hilendarski", Plovdiv, Bulgaria

Abstract: Background: The high acute toxicity of the organophosphorus pesticides (OPs) imposes the development of simple, rapid, sensitive, and reasonably priced analytical methods for their in situ determination. The electrochemical biosensors-based techniques for OPs determination complete with these requirements.

Objective: The objective of this work was the development of an amperometric biosensor with improved analytical performances for the direct organophosphorus pesticides determination, applying a novel chitosan-based bionanocomposite for glassy carbon electrode (GCE) modification.

Method: The bionanocomposite sensing platform was created by a simple, one-step electrodeposition onto the surface of the GCE of chitosan-entrapped carbon nanotubes (CS-CNTs), ZrO₂ nanoparticles, and organophosphorus hydrolase (OPH). The electrochemical and analytical characterization of the modified electrodes was achieved by recording and analysing their CV, chronoamperometric, and amperometric responses.

Results: The electroactive surface area of the CS-CNT-ZrO₂-modified GCE (22.66 mm²), and its catalytic activity toward the electrochemical oxidation of p-nitrophenol, which is the product of the OPH-catalyzed hydrolysis of the nitrophenyl substituted OPs (catalytic rate constant $1.84 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) were increased. The synergistic action of the CNTs and the ZrO₂ nanoparticles also led to the improvement in the biosensor's analytical performances in comparison to the performances of the CS/OPH, CS-ZrO₂/OPH, and CS-CNT/OPH modified GCEs; paraoxon was quantified with a sensitivity as high as 33.1 nA L μmol⁻¹, dynamic concentration range extended up to 40 μmol L⁻¹, and LOD as low as 20 nmol L⁻¹. The determination was not affected by the presence of triazine pesticides and OPs without nitrophenyl substituents. The developed biosensor was applied for paraoxon determination in spiked samples of irrigation water with a satisfactory accuracy.

Conclusion: An amperometric biosensor for OPs determination was developed using a novel bionanocomposite for GCE modification. The synergistic action of the individual components converted it in a high performant platform for the direct, sensitive, and selective paraoxon determination.

ARTICLE HISTORY

Received: December 23, 2016
Revised: February 10, 2017
Accepted: February 12, 2017

DOI:
10.2174/15734110136661703070944
12

Keywords: chitosan bionanocomposite, CNT, ZrO₂, organophosphorus hydrolase, paraoxon.

1. INTRODUCTION

The organophosphorus pesticides (OPs) are organophosphates compounds, which include the synthetic esters, amides, and thiolderivatives of the phosphoric, phosphonic, phosphorothioic, and phosphonothioic acids [1-4]. The benefits of the OPs application in the modern agricultural practice are associated with their effectiveness, broad target

spectrum, rapid biodegradation, and low bioaccumulation [5]. The risks they pose are due to their high acute toxicity [4, 6, 7], which imposes the development of simple, rapid, sensitive, and reasonably priced analytical methods for their in situ determination. The electrochemical biosensors-based techniques for OPs determination complete with these requirements [8-11], in contrast to the currently used off-site, sophisticated, time-consuming, and expensive chromatographic methods [10, 12, 13].

The electrochemical biosensors for OPs quantification are mainly amperometric. They involve two sensing mechanisms: (i) OPs hydrolysis catalyzed by the enzyme organo-

*Address correspondence to this author at the Instituto de Ingeniería, Autonomous University of Baja California, Blvd. B. Juárez y calle de la Normal s/n, 21280 Mexicali, Mexico; Tel/Fax: +52-686-5664150; E-mail: margarita.stoytcheva@uabc.edu.mx

Nuevo Biosensor Incorporado Con MWCNTS E Hidroxiapatita Para La Determinación De Paraoxón

Beleño Cabarcas Mary Triny, Stoytcheva Stilianova Margarita, Koytchev Zlatev Roumen, Montero Alpírez Gisela, Valdés Salas Benjamín, Torres Ramos Ricardo

Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Blvd. Benito Juárez y calle de la Normal S/N, Mexicali, Baja California, 21280, México matribeca1504@hotmail.com

Resumen

Se desarrolló un biosensor amperométrico basado en organofosforado hidrolasa (OPH) para la determinación directa y sensible de paraoxón. La enzima OPH fue inmovilizada sobre un electrodo de carbón vítreo (GCE) mediante la electrodeposición de quitosano (CS) con nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNTs) y nanopartículas de hidroxiapatita (HA). Se estudiaron varios parámetros como la carga de MWCNTs y HA y el área electroquímica activa del sensor. También, se evaluaron las características analíticas de cada uno de los biosensores. La sensibilidad de las determinaciones se aumentó considerablemente, gracias al aumento de la superficie activa y a la capacidad catalítica de los biosensores por la incorporación de MWCNTs y HA. Los mejores resultados fueron obtenidos aplicando el biosensor con la mezcla CS/MWCNTs-HA:OPH. Bajo las condiciones experimentales óptimas, el límite de detección alcanzado fue $0.1 \mu\text{mol L}^{-1}$ y la sensibilidad $5.10 \text{ nA L } \mu\text{mol}^{-1}$.

Palabras Clave: organofosforado hidrolasa, paraoxón, MWCNTs, HA, biosensor.

Abstract

An amperometric biosensor based on OPH was developed for the direct and sensitive determination of paraoxon. The OPH enzyme was immobilized on a glassy carbon electrode by the electrodeposition of CS with MWCNTs and HA. The effect of the loading of MWCNTs-HA and the active electrochemical area of the sensor was studied. Also, the analytical characteristics of each of the biosensors were evaluated. The sensitivity of the determinations was considerably increased, thanks to the increase of the active surface area and the catalytic capacity of the biosensors due to the incorporation of MWCNTs and HA. The best results were obtained by applying the biosensor with the mixture CS/MWCNTs-HA: OPH. Under the optimal experimental conditions, the detection limit reached was $0.1 \mu\text{mol L}^{-1}$ and the sensitivity $5.10 \text{ nA L } \mu\text{mol}^{-1}$.

Key words: organophosphate hydrolase, paraoxon, MWCNTs, HA, biosensor.

1. Introducción

Los compuestos organofosforados (OPs) son ampliamente utilizados como pesticidas, insecticidas y agentes de guerra química. Algunos son extremadamente tóxicos para los

BIOSENSOR NANOESTRUCTURADO PARA LA DETERMINACIÓN DE PARAOXÓN

Mary Triny Beleño, Margarita Stoytcheva, Roumen Zlatev, Gisela Montero
Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Blvd. Benito Juárez y calle de la Normal
S/N 21280 Mexicali, Baja California, México. matribeca1504@hotmail.com

Resumen

Se desarrolló un biosensor amperométrico basado en organofosforado hidrolasa (OPH) para la determinación directa y sensible de paraoxón. La enzima fue inmovilizada sobre un electrodo de carbón vítreo mediante la electrodeposición de quitosano (CS) con nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNTs) y nanopartículas de óxido de circonio (ZrO_2). Se estudiaron los efectos de la composición de la película enzimática, y efecto del tiempo de deposición. Se evaluaron las características analíticas de cada uno de los biosensores. La sensibilidad de las determinaciones se aumentó considerablemente, gracias al aumento de la superficie activa y a la capacidad catalítica de los biosensores por la incorporación de MWCNTs y ZrO_2 . Los mejores resultados fueron obtenidos aplicando el biosensor CS/MWCNTs:OPH y bajo las condiciones experimentales óptimas el límite de detección $0.03 \mu\text{mol L}^{-1}$ y la sensibilidad de $27.30 \text{ nA}/\mu\text{mol L}^{-1}$.

Palabras claves: organofosforado hidrolasa, paraoxón, biosensor.

Introducción

Los pesticidas organofosforados (PO) son un grupo de sustancias muy utilizadas en la agricultura por su actividad insecticida, nematocida, fungicida y herbicida. Pero, su uso no controlado y su alta toxicidad han causado problemas ambientales y de salud en vertebrados y especies no objetivo [1]. Su toxicidad se basa en la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE), enzima que se encuentra en las células nerviosas de vertebrados e insectos y cuya desactivación paraliza el sistema nervioso [2]. Por lo anterior, es de gran importancia el desarrollo de métodos precisos y sensibles para la cuantificación rápida y segura de residuos PO en los alimentos y el medio ambiente.

Los métodos analíticos comunes para la detección de PO, incluyen la cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta resolución, electroforesis capilar, etc. Estas técnicas son sensibles y selectivas pero, son costosas, requieren expertos para realizar los análisis, consumen mucho tiempo y vastas cantidades de disolventes orgánicos para la extracción de los PO [3, 4]. En contraste a estos métodos, los biosensores electroquímicos son atractivos para estos fines, dada su sencillez, sensibilidad, rapidez, y bajo costo de fabricación. Los biosensores amperométricos basados en la inmovilización de OPH y AChE en electrodos de carbono han sido los más utilizados. Los biosensores basados en OPH, se ha aplicado en lugar de AChE en la determinación de PO [5]. La enzima OPH tiene amplia especificidad de sustrato y es capaz de hidrolizar un gran número PO, como paraoxón, paratión, cumafos, diazinón, Dursban, etc. Su mecanismo de detección basado en el seguimiento de los productos de hidrólisis de los PO catalizado por OPH, es más simple, más directo, presenta mayor selectividad de los compuestos diana y tiempos de respuesta más rápidos que los basados en la inhibición de las AChE, que responde a todo tipo de PO [6]. Sin embargo, la

