

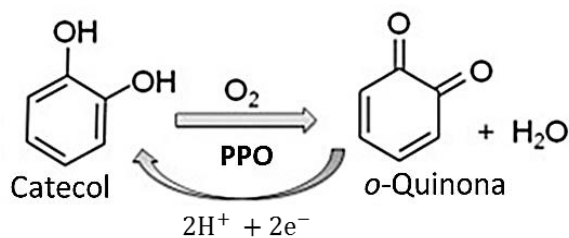
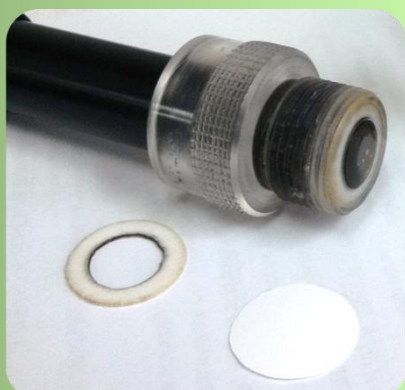


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INGENIERÍA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA

“Desarrollo de biosensores electroquímicos basados en Polifenol oxidasa para la detección de contaminantes ambientales”



TESIS PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta

MARY TRINY BELEÑO CABARCAS

Directores de tesis

DRA. MARGARITA STOYTCHIEVA

DR. ROUMEN ZLATEV

Mexicali, B.C.

2015

Con toda la humildad que de mi corazón pueda emanar, dedico primeramente mi trabajo a Dios, creador de todas las cosas, que me ha dado fortaleza para continuar.

De igual forma dedico esta tesis a mis queridos padres y abuelos en agradecimiento por su gran amor y apoyo incondicional.

A mi hermano Aldair, a mi novio Ricardo y mis dos grandes amigos, Erik y Laura, por estar presentes aportando cosas buenas a mi vida y por los grandes lotes de felicidad que siempre me han causado.

“Los problemas más importantes y urgentes de la tecnología de hoy en día ya no son las satisfacciones de las necesidades primarias o de los deseos arquetípicos, sino de la reparación de los males, daños y perjuicios causados por la tecnología de ayer.”

Dennis Gabor -1979

AGRADECIMIENTOS

Durante estos dos años he conocido y compartido momentos con muchas personas que me han apoyado, no solo en lo académico y científico, sino también en lo personal. A todas ellas, sin dejar a nadie en el olvido, quiero agradecerles su tiempo, sus palabras y su apoyo.

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Gisela Montero, sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación. A su manera, ha sido capaz de ganarse mi lealtad y admiración, así como sentirme en deuda con ella por darme la oportunidad estudiar y conocer México y por todo lo recibido durante el período de tiempo de esta maestría.

Un agradecimiento singular le debo a la Dra. Margarita Stoytcheva, que como directora de este trabajo de tesis, me ha enseñado, orientado, apoyado y corregido en mi labor científica con interés y entrega, y que ha sobrepasado, con mucho todas las expectativas que, como alumna, deposité en su persona.

Al Dr. Roumen Zlatev, codirector de este trabajo de investigación, por sus enseñanzas, sugerencias y por todas las pláticas divertidas que ha tenido conmigo.

Cariñosamente quiero darle las gracias a nuestra querida amiga y maestra Beatriz Jaramillo, por todas las enseñanzas que nos brindó desde el inicio de nuestra carrera con amor, valor y coraje.

Agradezco al Instituto de Ingeniería bajo la dirección del Dr. Benjamín Valdez y de la Dra. Gisela Montero. Al consejo de ciencia y tecnología (Conacyt) por la beca, a la UABC y a la Dra. Mónica y a la Dra. María del Socorro.

De manera muy especial quiero darle las gracias a mi novio Ricardo, por ser alguien muy especial en mi vida que, con su apoyo constante y amor, ha sido mi amigo y compañero inseparable. Gracias por estar a mi lado, y por todos aquellos trasnochos en el laboratorio para hacerme compañía cuando necesitaba terminar algún trabajo. Este logro de cierto modo también es tuyo y ahí estaré para ser testigo de los tuyos.

Gracias a la Dra. Lydia Toscano, mi amiga y mi madre mexicana, por su ayuda, compañía, por recibirnos en su casa como miembros de su familia, y por prestarnos su laboratorio las veces que fuera necesario. Ya hemos perdido la cuenta de las veces que nos ha demostrado que podemos contar con usted.

Hay dos amigos a los que les debo mucho, Erik y Laura: Muchas gracias por los buenos momentos compartidos mis queridos amigos y también por toda su ayuda que siempre me brindaron, por abrirnos las puertas su casa y de su familia y, sin duda durante estos dos años llegaron a ser personas que quedan en el recuerdo y en el corazón.

A toda mi familia, padres, hermanos, tíos y primos por todo su apoyo y cariño a lo largo de mi vida, y porque a pesar de la distancia siempre me han hecho llegar su apoyo, ánimo, alegría, motivación y comprensión durante el desarrollo de esta etapa. A mis amigos, Hernán, Adolfo, María y Julieth, que a pesar de llevar mucho tiempo lejos siguen siendo muy buenos amigos.

Agradezco a los profesores de la comisión evaluadora por sus pertinentes observaciones, y a todas aquellas personas que, de una u otra forma contribuyeron y facilitaron la realización de esta tesis. Agradezco a mis compañeros de laboratorio por los momentos compartidos y por la amable colaboración cada vez que la solicité.

Finalmente, agradezco a los funcionarios del instituto de ingeniería por su amabilidad, colaboración y también por contribuir a amenizar las jornadas de trabajo.

RESUMEN

La rápida industrialización ha dado lugar a innumerables accidentes que han contaminado los recursos terrestres, atmosféricos y acuáticos con materiales tóxicos y otros contaminantes, amenazando a las personas, animales y ecosistemas con graves riesgos para la salud. Los fenoles o compuestos fenólicos son contaminantes importantes de origen natural y antropogénico generados durante la producción de colorantes, productos químicos, textiles, resinas, y plásticos, así como durante los procesos de conservación de la madera, y refinado de petróleo. Por su parte también se tienen los herbicidas triazínicos utilizados ampliamente en la agricultura moderna con el fin de mantener y alcanzar una alta producción en los cultivos. Estas sustancias y sus metabolitos son persistentes en el medio ambiente y están incluidas en la lista de la EPA de contaminantes prioritarios, por lo tanto es importante el continuo control y el seguimiento de sus residuos. Los métodos comúnmente utilizados para la cuantificación de estas sustancias incluyen diversas técnicas cromatográficas y espectroscópicas, sin embargo, esos métodos requieren personal calificado, reactivos y equipos de laboratorio costosos, largos tiempos de extracción, preconcentración y limpieza de la muestra. Por lo tanto, las tendencias recientes en la química analítica basan en el uso de biosensores como una alternativa a las técnicas tradicionales mencionadas anteriormente. Los biosensores electroquímicos utilizando una enzima del grupo de las oxido-reductasas, PPO (polifenol oxidasa) han sido ampliamente estudiados. La enzima PPO cataliza la hidroxilación de los monofenoles a o-difenoles (actividad monofenolasa o cresolasa), y la subsecuente oxidación de los o-difenoles a las o-quinonas correspondientes (actividad difenolasa o catecolasa) en presencia de oxígeno. El objetivo del presente trabajo es el diseño, desarrollo y optimización de dos biosensores amperométricos enzimáticos para la determinación cuantitativa de compuestos fenólicos en medio acuoso. Así mismo, la determinación del herbicida atrazina basada en la cuantificación de la inhibición de la actividad catalítica de la PPO por el herbicida y midiendo la disminución de la corriente de reducción de o-quinona en función de la concentración de atrazina. Sin embargo, los sensores amperométricos basados en la PPO para la cuantificación de compuestos fenólicos presentan un inconveniente importante relacionado con la disminución de la sensibilidad y la precisión en las determinaciones, causadas por el ensuciamiento del electrodo inducido por la polimerización de los radicales formados durante las reacciones electro-enzimáticas. En un intento por eludir este problema, en este trabajo se propusieron dos enfoques para superar los efectos de ensuciamiento del electrodo y por lo tanto para mejorar la precisión de la determinación de estos contaminantes. El primer enfoque consistió en la inmovilización de la enzima PPO en una membrana desechable fijada en una sonda de oxígeno tipo Clark. Este enfoque permitiría evitar el ensuciamiento del electrodo mediante el registro

de la corriente de reducción del cofactor oxígeno, y la obtención de una respuesta estable y reproducible del biosensor. Las membranas enzimáticas desechables fueron elaboradas con filtros de acetato de celulosa y con recubrimiento de PPO mediante el uso de hidrogeles biocompatibles. La estrategia propuesta permitió alcanzar una RSD de 1.22% para la cuantificación de catecol con una sensibilidad de $0.89 \mu\text{A mmol L}^{-1}$ y un límite de detección calculado sobre la base de la relación señal/ruido igual a 3, resultó ser de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$. El segundo enfoque incorporaría la enzima inmovilizada en hidrogel de quitosano entrecruzado con glutaraldehído sobre un electrodo de grafito espectralmente puro, y se basa en el registro de la corriente de reducción de o-quinona producida enzimáticamente en ausencia de cualquier mediador, junto con la limpieza electroquímica continua y la reactivación *in situ* de la superficie del electrodo, aplicando pulsos de potencial con amplitud +1.40 V frente a Ag, AgCl/ KCl(sat). con una duración de 166.66 ms, mientras que la determinación se lleva a cabo a 0.0 V frente a Ag, AgCl/KCl(sat) por 66.64 ms. Las determinaciones de fenol y catecol se puede realizar en el intervalo de 0.5 a 2.0 mmol L⁻¹ y 0.5 a 2.5 mmol L⁻¹ respectivamente; con un límite de detección de $5.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ y $2.1 \mu\text{mol L}^{-1}$. Como resultado, se logró alcanzar una RSD de 2.97% para la determinación de 0.6 mmol L⁻¹ de catecol, en comparación con 6.53% sin la aplicación la etapa de limpieza. La determinación de la atrazina se puede realizar en el intervalo de 50-250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ con una ecuación de regresión $I=0.031CA$ ($R^2=0.9861$), es decir, la sensibilidad de la determinación de atrazina fue $31 \mu\text{A mmol L}^{-1}$ y se obtuvo un límite de detección de $6 \mu\text{mol L}^{-1}$. La formación de la película de polímero en la superficie del electrodo de trabajo durante la determinación electro-enzimática de fenoles se demostró experimentalmente aplicando diversas técnicas como voltametría cíclica, amperometría, EQCM y microscopía óptica. La buena estabilidad, la reutilización, la selectividad de estos tipos de biosensores los convierte en una alternativa simple, económica y rápida a los métodos estándares de cuantificación de pesticidas y compuestos fenólicos, los cuales podrán ser usados para el control en línea y en el campo.

Palabras Clave: Polifenol oxidasa, electrodo tipo Clark, membrana enzimática desechable, hidrogel, fenoles, atrazina, amperometría de pulsos.

ABSTRACT

Rapid industrialization has led numerous accidents that have contaminated the terrestrial, atmospheric and aquatic resources with toxic materials and other pollutants, threatening people, animals, and agricultural ecosystems with serious health risks. Phenols or phenolic compounds are important contaminants of natural and anthropogenic generated during dyes, chemicals, textiles, resins and plastics production, as well as during the processes of wood preserving and petroleum refining. Meanwhile also have the triazine herbicide widely used in modern agriculture with the purpose of maintaining and reaching high crop production. These substances and their metabolites are persistent in the environment and highly toxic, they are included in the EPA list of priority pollutants, and therefore it is important continuous control and monitoring of their waste. Common methods used to quantify these contaminants that include chromatography and spectroscopic techniques, which require trained personnel, expensive reagents and laboratory equipment, long times extraction, preconcentration and sample cleanup. Therefore, recent trends in analytical chemistry rely on the use of biosensors as an alternative to the above mentioned traditional techniques. Electrochemical biosensors using an enzyme of oxidoreductases group polyphenol oxidase (PPO) has been extensively studied. This enzyme catalyzes the o-hydroxylation of the monophenols to o-diphenols (monophenolase or cresolase activity) and the oxidation of the o-diphenols to the corresponding o-quinones (diphenolase or catecholase activity) in the presence of O₂. The aim of this work was to design, develop and optimize the two enzymatic amperometric biosensors to determine the phenolic compounds quantitatively in an aqueous medium. Also, the determination of atrazine herbicide, based on the quantification of the PPO inhibition they provoke by measuring the decrease of the o-quinones reduction current as a function of atrazine concentration. Nevertheless, the PPO-based amperometric sensors for phenolics determination have a drawback associated with decreased sensitivity and accuracy. It is due to electrode fouling induced by the polymerization of the radicals formed during the enzymatic and electrochemical reactions sequence. In an attempt to circumvent this problem, in this work proposes two approaches to overcome the effects of electrode fouling and thus to improve the accuracy of the determination of these environmental pollutants. The first approach involves the immobilization of the enzyme PPO in a disposable membrane fixed in a Clark-type oxygen electrode. This approach allows avoiding the electrode fouling by recording the oxygen reduction current, and obtaining a stable and reproducible sensor response by using prefabricated disposable enzyme membranes. Disposable enzymatic membranes were made with cellulose acetate filters coating with PPO through the use of biocompatible hydrogels. The proposed strategy permitted to reach a RSD of 1.22% for the quantification of catechol with sensibility 0.89 $\mu\text{A mmol L}^{-1}$. The

limit of detection, estimated on the basis of the signal to noise ratio of 3, was found to be $1 \mu\text{mol L}^{-1}$. The second approach incorporates the immobilized enzyme chitosan hydrogel cross-linked with glutaraldehyde on a bare spectrally pure graphite electrode. It is based on the registration of the o-quinone reduction current in the absence of any mediator, along with the continuous cleaning and reactivation of the electrode surface achieved by applying an appropriate pulse potential waveform. The optimum cleaning potential for in situ regeneration of the electrode surface was found to be +1.40 V vs. Ag, AgCl/KCl(sat) for 166.6 ms and quinone reduction current was registered at a potential of 0.00 V vs. Ag, AgCl/KCl(sat) applied for 66.64 ms. The phenol and catechol determinations can be realized in the interval from 0.5 to 2.0 mmol L^{-1} and 0.5 to 2.5 mmol L^{-1} respectively; with a limit of detection of $5.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $2.1 \mu\text{mol L}^{-1}$. As a result, a RSD of 2.97% for 0.6 mmol L^{-1} o-catechol determination was achieved compared with 6.53% without the cleaning step application. The atrazine determination is linear over the studied range from 50 to 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ with a regression equation $I=0.031CA$ ($R^2=0.9861$), i.e. the sensitivity of the atrazine determination is $31 \mu\text{A mmol L}^{-1}$. The limit of detection was found to be $6 \mu\text{mol L}^{-1}$. Polymer film formation on the working electrodes surface during the enzymatic electrochemical phenols determination was experimentally proved applying various techniques (cyclic voltammetry, amperometry, EQCM, and optical microscopy). The good stability, reusability and the selectivity of these types of biosensors makes them a simple, inexpensive and quick to standard methods of quantifying alternative pesticides and phenolic compounds, which could be used for on-line monitoring and field.

Keywords: Polyphenol oxidase, Clark type electrode, disposable enzyme membrane, hydrogel, phenols, atrazine, pulsed amperometric detection.

	Página
DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	5
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABLAS	14
NOMENCLATURA	15
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	16
1.1 Planteamiento del problema y justificación	16
1.2 Objetivos de la investigación	17
1.2.1 Objetivo general	17
1.2.2 Objetivos específicos	17
1.3 Hipótesis	18
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	19
2.1 Contaminantes en el medio ambiente	19
2.1.1 Origen y clasificación	20
2.1.2 Riesgos asociados a la presencia de contaminantes.....	21
2.1.2.1 Compuestos fenólicos	21
2.1.2.2 Determinación de compuestos fenólicos	22
2.1.2.3. Antecedentes bibliográficos sobre la determinación de compuestos fenólicos con biosensores amperométricos.....	24
2.1.3 Herbicidas	27
2.1.3.1 Atrazina	28
2.1.3.2 Determinacion de atrazina.....	30
2.1.3.3 Antecedentes bibliográficos sobre la determinación de atrazina con biosensores electroquímicos	31
2.2 Biosensores: Definición	34
2.2.1 Clasificación de los Biosensores	35

2.2.2 Elementos biológicos de reconocimiento molecular	36
2.2.3 Métodos de inmovilización	37
2.2.4 Sistema de transducción.....	41
2.3 Biosensores amperométricos de PPO	46
2.3.1 Elemento Biocatalítico.....	46
2.3.1.1 Sustratos	47
2.3.1.2 Inhibidores de la PPO	48
2.3.2 Transductor electroquímico	49
Referencias capítulo II	50
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
3.1. Instrumentos	63
3.2 Reactivos.....	67
3.2.1. Preparación de disoluciones	67
3.3. Procedimiento experimental.....	67
3.3.1 Evaluación de la actividad enzimática	67
3.3.2 Preparación del biosensor con membrana desechable de PPO.....	68
3.3.2.1 Preparación del sistema de inmovilización	68
3.3.2.2 Elaboración de sonda de oxígeno	71
3.3.2.3 Obtención de los amperogramas.....	72
3.3.3 Preparación de biosensor basado en amperometría de pulsos (PAD).....	73
3.3.3.2 Electrodo de grafito espectralmente puro.....	75
3.3.3.3 Obtención de los amperogramas.....	75
3.3.3.4 Obtención de los voltamperogramas cíclicos	76
3.3.4 Estudio de los parámetros analíticos de los biosensores	76
Referencias capítulo III	77
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN INCLUIDA.....	78
4.1 Biosensor tipo Clark con membrana desechable de PPO	78
4.1.1 Principio de medición	78
4.1.2 Optimización de la membrana desechable de PPO	78
4.1.2.1 Efecto de la naturaleza del hidrogel.....	79
4.1.2.2 Efecto de la concentración de hidrogel	80
	10

4.1.2.3 Efecto de la carga enzimática	81
4.1.3 Actividad de la enzima PPO.....	83
4.1.4 Caracterización superficial de las membranas enzimáticas desechables	83
4.1.5 Espectros de Infrarrojo por Transformadas de Fourier (FTIR) de membranas enzimáticas desechables	85
4.1.6 Determinación de catecol aplicando biosensor con membrana de PPO desechable en condiciones experimentales optimas	87
4.2 Biosensor basado en amperometría de pulsos (PAD).....	89
4.2.1 Principio de medición	89
4.2.2 Pruebas de ensuciamiento y regeneración de la superficie del electrodo..	90
4.2.2.1 Voltametría cíclica.....	90
4.2.2.2 Microbalanza de cristal de cuarzo (QCMB).....	91
4.2.2.3 Microscopía óptica.....	93
4.2.3 Determinación de compuestos fenólicos.....	94
4.2.3.1 Estabilidad.....	97
4.2.4 Determinación de atrazina	97
Referencias capítulo IV.....	102
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES	105
ANEXO A.....	107
PUBLICACIONES	107
Capítulos de libro	107
Artículos indexados.....	107
Articulos en extenso	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la atrazina ($C_8H_{14}ClN_5$).	28
Figura 2. Principio de funcionamiento de un biosensor basado en la PPO para la determinación de atrazina.	32
Figura 3. Estructura de un biosensor.	34
Figura 4. Esquemas de inmovilización de una biomolécula.	38
Figura 5. Enzima PPO.	46
Figura 6. Reacción global del biosensor midiendo (a) el oxígeno consumido en la reacción enzimática o (b) la reducción de la o-quinona producida enzimáticamente.	49
Figura 7. Detalle de sonda de oxígeno tipo Clark adaptada a celda de electrolisis convencional de acrílico.	63
Figura 8. Celda electroquímica.	64
Figura 9. Celda EQCM.	65
Figura 10. Espectrofotómetro RAYLEIGH WQF-510A FTIR.	65
Figura 11. Espectrofotómetro UV-VIS Evolución Thermo Scientific 605.	66
Figura 12. Método de inmovilización de enzimas mediante atrapamiento en hidrogel.	69
Figura 13. Preparación membranas enzimáticas desechables (atrapamiento).	70
Figura 14. a) Sonda tipo Clark comercial. b) Sonda tipo Clark modificada.	71
Figura 15. Diseño del biosensor mediante atrapamiento.	72
Figura 16. Medida de la intensidad de corriente en condiciones de estado estacionario.	73
Figura 17. Recubrimiento por rotación (“spin-coating”).	74
Figura 18. Inmovilización de la enzima PPO sobre electrodo de grafito.	74
Figura 19. Procedimiento de entrecruzamiento del hidrogel de quitosano.	75
Figura 20. Un electrodo de grafito espectralmente puro.	75
Figura 21. Efecto de la naturaleza del hidrogel en la sensibilidad de las determinaciones de catecol. Hidrogel 0.8% y PPO 1 mg mL ⁻¹ relación volumen a volumen (1:1). Determinaciones consecutivas de catecol en el rango de 0.1-0.5 mmol L ⁻¹	80
Figura 22. Efecto de la concentración del hidrogel de gelatina en la sensibilidad de la determinación de catecol. PPO (1 mg mL ⁻¹) y gelatina (0.2%, 0.6%, 0.8%, and 1%) relación volumen a volumen (1:1). Determinaciones consecutivas de catecol en el rango de 0.1-0.5 mmol L ⁻¹	81
Figura 23. Efecto de la carga enzimática en la sensibilidad de la determinación de catecol. Determinaciones consecutivas de catecol en el rango de 0.1-0.5 mmol L ⁻¹	82

Figura 24. Medida de actividad enzimática de PPO libre e inmovilizada.....	83
Figura 25. Imágenes de microscopio óptico de la superficie de a) filtro de celulosa b) filtro de celulosa con quitosano 0.8 % c) filtro de celulosa con alginato de sodio al 0.8 % d) filtro de celulosa con gelatina 0.8 %.	84
Figura 26. Espectros de FTIR de a) filtro de celulosa/quitosano/PPO, b) filtro de celulosa /AlgNa/PPO y c) filtro de celulosa/quitosano/PPO.	86
Figura 27. (a) Respuesta amperométrica del biosensor basado en PPO inmovilizada en hidrogel de gelatina 1.0%, en función de la adición sucesiva de solución de catecol a 25°C; 120 rpm y pH 6.5. (b) Curva de calibración para la catecol 0.1 mmol L ⁻¹ hasta 0.7 mmol L ⁻¹	87
Figura 28. (A) Voltamograma cíclico resultante de la reducción y la oxidación reversible de o-quinona en un electrodo de grafito a pH 6.5, 25 °C, 25 barridos de potencial, velocidad de barrido de 0.1 V s ⁻¹ . (B) Corriente de pico catódico I _{pc} y corriente de pico anódico I _{pa} , dependencia del número de barridos de potenciales sucesivos y la concentración de catecol: 1) 2 mmol L ⁻¹ ; 2) 3 mmol L ⁻¹ ; PBS 0.1 mol L ⁻¹	91
Figura 29. Respuesta Transitoria EQCM a catecol 6 mmol L ⁻¹ que ilustra el ensuciamiento del electrodo; PBS 0.1 mol L ⁻¹ , pH 6.5, 25 °C.....	92
Figura 30. Imágenes de la superficie de un electrodo de grafito antes (A) y (B) después de reacciones consecutivas que conducen al ensuciamiento de la superficie.	93
Figura 31. (A) Respuesta de tiempo real del biosensor basado en la PPO a concentraciones crecientes de compuestos fenólicos; (B) Gráfica de calibración para la determinación de fenol y catecol. 25°C, pH 6.5, 750 rpm. E _d =0.00 V vs Ag/AgCl(sat), E _d =66.64 ms, E _{cl} =+1.40 V vs Ag/AgCl(sat) y E _{cl} =166.6 ms.....	95
Figura 32. Estabilidad del biosensor de PPO.....	97
Figura 33. (A) Detección amperométrica de catecol y dopamina. (B) Gráfica de calibración para la determinación de catecol y dopamina a 25°C, pH 6.5, 750 rpm. E _d =0.00 V vs Ag/AgCl(sat), E _d =66.64 ms, E _{cl} =+1.40 V vs Ag/AgCl(sat) y E _{cl} =166.6 ms.....	98
Figura 34. Gráfico dobles recíprocos de Lineweaver-Burk.....	99
Figura 35. (A) Respuesta corriente vs tiempo del biosensor basado en PPO en presencia de dopamina y adiciones sucesivas de ATZ; (B) Curva de calibración para la determinación de ATZ. 25°C, pH 6.5, 750 rpm; E _d =0.00 V vs Ag/AgCl(sat), τ _d =66.64 ms, E _{cl} =+1.40 V vs Ag/AgCl(sat) y τ _{cl} =166.6 ms.....	100
Figura 36. Representacion de Lineweaver-Burk, curva de 1/V vs 1/S (inserción) con y sin inhibidor (atrazina).	101

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Métodos cromatográficos para la determinación de compuestos fenólicos.	23
Tabla 2. Antecedentes bibliográficos sobre la determinación de compuestos fenólicos con biosensores amperométricos enzimáticos.	25
Tabla 3. Criterios de clasificación de los herbicidas.	27
Tabla 4. Antecedentes bibliográficos sobre la determinación de atrazina con métodos cromatográficos	31
Tabla 5. Principales características analíticas de biosensores electroquímicos aplicados para la cuantificación atrazina.	33
Tabla 6. Clasificación de los biosensores.	35
Tabla 7. Resumen de optimización de la preparación de membrana enzimática.	82
Tabla 8. Características de la determinación amperométrica de catecol mediante el uso de un biosensor basado en PPO.	88
Tabla 9. La recuperación de la catecol en el agua del grifo.	96
Tabla 10. Principales características analíticas de algunos biosensores amperométricos de PPO que aplican para la cuantificación de atrazina.	100

NOMENCLATURA

ATZ: Atrazina.

Ecl: Potencial de limpieza.

Ed: Potencial de detección.

EQCM: Microbalanza de Cristal de Cuarzo.

FTIR: Espectroscopía de IR por Transformadas de Fourier.

Ipc: Corriente de catódico.

Ipc: Corriente de pico anódico.

K_M: Constante de Michaelis-Menten.

LD: Límite de detección.

PAD: Deteccion por amperometría de pulsos.

PBS: Solución tampón de fosfato.

PPO: Polifenol oxidasa.

RSD: Desviación estándar relativa.

τ_c : Período de aplicación del potencial de la limpieza.

τ_d : Período de aplicación del potencial de detección.

ECD: Detector de captura de electrones.

NPD: Detector de nitrógeno-fósforo.

SPE: Extracción en fase sólida.

FM: Fase móvil.

DAD: Detector de diodos.

MS: Espectrometría de masas.

MSD: Detector selectivo de masas.

HRP: Peroxidasa de rábano picante.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Planteamiento del problema y justificación

La rápida industrialización ha dado lugar a innumerables accidentes que han contaminado los recursos terrestres, atmosféricos y acuáticos con materiales tóxicos y otros contaminantes, amenazando a las personas, animales y ecosistemas con graves riesgos para la salud. Estos efectos adversos han dado lugar al desarrollo y utilización de diferentes métodos y tecnologías para controlar y reducir los efectos de la contaminación.

Los métodos comúnmente utilizados para la cuantificación de contaminantes ambientales incluyen diversas técnicas cromatográficas con detectores de flama, captura de electrones o espectrometría de masas, que poseen un sinnúmero de ventajas y dan resultados exactos con concentraciones muy bajas, sin embargo, requieren largos tiempos de extracción, preconcentración y limpieza de la muestra, personal calificado y equipos de laboratorio costosos.

El uso de biosensores ofrece algunas ventajas muy atractivas frente al empleo de métodos cromatográficos, para el análisis de contaminantes, entre las que cabe destacar un menor costo por análisis y que, habitualmente, se trata de dispositivos fáciles de utilizar que no requieren de personal especializado para su manejo. Además, a diferencia de las técnicas de análisis convencionales, los biosensores son, en general, sistemas fácilmente miniaturizables que pueden dar lugar a resultados cualitativos o semicuantitativos *in situ* (en la propia matriz de la muestra), reduciendo los costes asociados al transporte y almacenamiento de la misma en el laboratorio y permitiendo una toma de decisiones rápida cuando surge un problema. Es por ello que, en los últimos años, se ha prestado una especial atención a este tipo de dispositivos en distintas áreas, incluyendo el ámbito de la química analítica.

La sensibilidad y selectividad del biosensor va a estar condicionada, entre otros factores, por el elemento de reconocimiento empleado. En general, los biosensores desarrollados para la determinación de contaminantes en alimentos y medioambiente se basan en el empleo de elementos de reconocimiento de origen biológico, acoplados a un sistema de transducción.

Se han descrito biosensores catalíticos basados en el empleo de enzimas, tejidos y/o células como receptores. Para el desarrollo de biosensores catalíticos, el elemento de reconocimiento más utilizado son las enzimas (biosensores enzimáticos). Un ejemplo son los biosensores para la determinación del herbicida atrazina, basados en el efecto inhibitor que ejercen estos herbicidas sobre la enzima PPO, empleando como sustratos enzimáticos compuestos fenólicos como catecol o fenol. El sistema redox catecol/*o*-benzoquinona, es catalizado mediante Polifenol oxidasa o tirosinasa (PPO).

Los pesticidas y compuestos fenólicos son sustancias que están presentes en la naturaleza y presentan diferentes aplicaciones con gran importancia nutricional en algunos casos y/o tóxicas en otros. Es muy importante la cuantificación de estos compuestos orgánicos en diversas muestras, tanto hidrofílicas como agua, frutas entre otras, como hidrofóbicas como aceites y grasas. Como biomaterial para la detección de los compuestos fenólicos se ha utilizado la enzima polifenol oxidasa (PPO) por su gran especificidad para los mismos.

1.2 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.2.1 Objetivo general

Desarrollar, caracterizar y aplicar dos biosensores electroquímicos enzimáticos para la determinación de compuestos fenólicos y el herbicida atrazina.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Desarrollar dos nuevos biosensores electroquímicos integrando:

- Membrana de celulosa desechable como soporte de la enzima polifenol oxidasa y una sonda de oxígeno tipo Clark modificada.
- La enzima Polifenol oxidasa inmovilizada sobre un electrodo de carbono y aplicando la técnica electroanalítica amperometría de pulsos (PAD).

2. Caracterizar y optimizar las membranas desechables como soporte de la enzima. Estudio de la morfología, eficacia de la inmovilización y efecto de la inmovilización sobre la estructura de la enzima. En la optimización se estudian parámetros relacionados con la matriz y su efecto en la actividad de la enzima inmovilizada.

3. Caracterizar la película de polímero formada sobre la superficie del electrodo de trabajo, durante las determinaciones de fenoles mediante las técnicas amperometría de pulsos, voltametría cíclica, EQCM, y microscopía óptica.

4. Aplicación y caracterización analítica de los biosensores desarrollados.

1.3 HIPÓTESIS

- Se espera que la modificación de la sonda de oxígeno y la membrana enzimática desechable a través de la superficie del electrodo de trabajo de la sonda facilite la difusión de oxígeno y asegure una mejor reproducibilidad logrando la cuantificación de compuestos fenólicos.
- Además, se espera que la cuantificación de compuestos fenólicos y el herbicida atrazina, mediante la técnica electroanalítica de amperometría de pulsos dedicada a la limitación del ensuciamiento y pasivación del electrodo así como su reactivación *in situ* de la superficie del mismo, permitirá alcanzar una alta sensibilidad de la determinación y obtener resultados reproducibles.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Contaminantes en el medio ambiente

La contaminación de los alimentos y el medio ambiente es un problema general que afecta a la población mundial. El hombre emplea gran variedad de productos químicos en las actividades productivas (agricultura, ganadería, industria) a fin de obtener el mayor rendimiento posible. La eliminación inadecuada de dichas sustancias, o su acumulación incontrolada, pueden originar graves problemas tales como la contaminación de los recursos naturales, incluidos aguas, suelos y atmósfera, o de los alimentos, con las consiguientes repercusiones negativas sobre la salud humana, animal y/o la sostenibilidad ambiental [1]. En algunos casos, la concentración del contaminante a la que se encuentran expuestos los seres vivos es elevada, originando intoxicaciones agudas que, en ocasiones, resultan fatales y conducen al fallecimiento de los individuos. No obstante, en general, las exposiciones se producen a dosis bajas aunque deberían resultar inocuas, cuando se producen de forma continua o crónica, durante un periodo de tiempo prolongado, pueden dar lugar a la respuesta tóxica.

En las últimas décadas se ha incrementado notablemente el interés sobre la seguridad alimentaria y ambiental, realizándose grandes esfuerzos económicos y legislativos con el objetivo de mejorar los sistemas empleados para garantizar su control. Es por ello que la Unión Europea ha fijado unos valores de concentración máxima para los contaminantes más habituales [1], que establecen el nivel de contaminante que puede contener una determinada matriz (alimento, agua, etc.), para que la exposición a la misma sea toxicológicamente aceptable para el hombre, los animales y/o la fauna.

El cumplimiento de la normativa requiere disponer de herramientas analíticas adecuadas, que permitan identificar y cuantificar, de forma fiable, la presencia de dichas sustancias en distintas matrices. En muchos casos, la necesidad de realizar de forma rutinaria un gran número de análisis requiere disponer de metodologías sencillas, fáciles de automatizar y disponibles a bajo coste, al alcance de distintos usuarios [2]. Finalmente, la posibilidad de emplear dispositivos analíticos como los sensores, que permitan el análisis *in situ* de dichas sustancias, ha supuesto una ventaja adicional, especialmente para el análisis medioambiental, al disminuir el tiempo de espera entre la aparición del contaminante y la detección del mismo[3].

2.1.1 Origen y clasificación

Se denomina contaminación o polución a la introducción, en el medio natural, de sustancias que pueden ocasionar efectos negativos en los seres vivos, en los ecosistemas y/o en los materiales [3]. La gran variedad de contaminantes existentes hace compleja su clasificación atendiendo a su naturaleza química. Por ello, estas sustancias se suelen agrupar en función de la fuente de contaminación, el medio receptor o el impacto ambiental causado.

Atendiendo a la **fuente de contaminación**, se clasifican en contaminantes naturales (sustancias originadas por fenómenos que suceden en la naturaleza, ajenos a la actividad humana, tales como erupciones volcánicas, incendios naturales, episodios de eutrofización, etc.) y contaminantes de origen antropogénico (generadas por actividades tales como la agricultura y ganadería, la generación de electricidad, el transporte, la minería y metalurgia, la industria química, etc).

En función del **medio receptor** en el que transcurre su existencia, o la mayor parte de ella, es posible distinguir entre contaminantes del aire (tanto contaminación estratosférica, atmosférica, urbana y contaminación en interiores), contaminantes de aguas (superficiales, subterráneas, marinas), contaminantes del suelo, contaminantes de alimentos, etc [2].

Por último, atendiendo al **impacto ambiental** que provocan, pueden encontrarse contaminantes que causan efecto invernadero, acidificación, destrucción del ozono estratosférico, formación de smog, eutrofización, toxicidad humana y ecotoxicidad. Dado que una misma fuente puede emitir más de un contaminante, y que un contaminante puede provenir de más de una fuente, estar presente en más de un medio y originar más de un impacto ambiental, no es fácil modelizar la contaminación [3].

2.1.2 Riesgos asociados a la presencia de contaminantes

La presencia de contaminantes y la exposición del ser humano a los mismos representan un riesgo potencial para la salud. Este riesgo y su gravedad dependerán, entre otros factores, de la naturaleza del contaminante (su toxicidad) y del grado de exposición al mismo (concentración, tiempo, etc).

2.1.2.1 Compuestos fenólicos

Los fenoles son compuestos aromáticos que se caracterizan por tener uno o varios grupos hidroxilo unidos directamente al anillo aromático. Generalmente se nombran como derivados del miembro más sencillo de la familia, el fenol [2].

Son compuestos altamente tóxicos, carcinogénicos y alergénicos. Su toxicidad varía con el número de sustituyentes y su posición en el anillo aromático. Debido a su alta toxicidad y persistencia en el medio ambiente, el fenol y especialmente sus derivados clorados, nitrados y alquilados se han definido como contaminantes peligrosos y están incluidos en la lista de sustancias peligrosas y contaminantes prioritarios de la Comunidad Europea (CE) y de la Agencia de Protección Ambiental Norteamericana (EPA) [1,3].

La presencia de fenoles en el medio ambiente es consecuencia tanto de acciones naturales como del aporte antropogénico, generalmente de carácter industrial. Desde el punto de vista de la contaminación, es de gran importancia la presencia de estos compuestos en aguas y sedimentos, debido a su elevada toxicidad, siendo empleados en diferentes tipos de industrias, como textiles, plásticos, colorantes, tintas, medicamentos, antioxidantes, polímeros sintéticos, resinas, pesticidas, detergentes, etc. Por tanto, es necesario prestar interés al origen, migración y distribución de estos compuestos en el medio ambiente, así como contar con métodos fiables para su determinación en matrices complejas [4].

Los polifenoles, son compuestos constituidos por al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo como sustituyentes. En el ser humano, tras su ingesta, parte de la actividad biológica de los polifenoles se debe a su capacidad de formar parte del sistema antioxidante celular, proporcionando importantes beneficios para la salud [5]. Entre sus propiedades más relevantes cabe destacar su capacidad para inhibir los procesos oxidativos de lipoproteínas de baja densidad (LDL) reduciendo los riesgos de enfermedades cardiovasculares, su actividad antioxidante, protegiendo los tejidos del daño oxidativo y del envejecimiento celular, su acción antiinflamatoria, reduciendo la

actividad de la enzima hialuronidasa, y sus propiedades anticancerígenas. Todo ello, hace que los polifenoles sean considerados como un subproducto de alto valor añadido [5,6]. Un ejemplo, lo encontramos en el aceite de oliva. Los polifenoles al tratarse de antioxidantes naturales, ralentizan o previenen los procesos de descomposición de aceites y grasas. De ahí que la determinación de estos compuestos sea importante a la hora de evaluar la calidad del aceite, ya que son parcialmente responsables de su estabilidad a la autooxidación y de sus características organolépticas [6].

2.1.2.2 Determinación de compuestos fenólicos

Debido a las distintas aplicaciones de los compuestos fenólicos y por su gran importancia nutricional en unos casos y tóxica en otros, es importante disponer de métodos analíticos que permitan la identificación y cuantificación de estos compuestos en muestras medioambientales, clínicas, y alimentarias. La necesidad de identificación individual de los compuestos fenólicos en distintas muestras requiere el uso de las técnicas tradicionales de separación, como cromatografía de alta eficacia (HPLC), cromatografía de gases (CG), electroforesis capilar (EC) etc. La HPLC es la técnica analítica más utilizada para la caracterización de compuestos fenólicos, como lo refleja el gran número de artículos publicados [7]. Los sistemas de detección más empleados en HPLC son espectrofotometría UV-visible con fotodiodos en serie, espectrometría de masas y detección electroquímica. La electroforesis capilar ha sido incorporada como alternativa o complemento de las separaciones cromatográficas para el análisis de compuestos fenólicos en distintas matrices, ya que es una técnica de alta resolución, sin paso de derivatización previo y corto tiempo de análisis [7,8]. Recientemente se ha utilizado como técnica analítica la electrocromatografía capilar (ECC), técnica híbrida de electroforesis capilar y HPLC, uniéndose las ventajas de ambas y combinando la retención cromatográfica con la movilidad electroforética [9,10]. El mayor inconveniente radica en la baja vida de la columna, así como el elevado tiempo de acondicionamiento de la columna, lo que perjudica a la robustez del método y el precio del análisis. En la tabla 1, se describen algunas de las publicaciones en el campo de la determinación de compuestos fenólicos en distintas matrices, indicándose en cada caso el pretratamiento utilizado, los compuestos determinados y las muestras analizadas.

Tabla 1. Métodos cromatográficos para la determinación de compuestos fenólicos.

Método	Detector	Pretratamiento	Compuestos /muestras	LD	Ref.
HPLC	Espectrofotometría UV-VIS, fotodiodos en serie	Extracción con ultrasonidos	Ácidos fenólicos en fresas	2µg/L	[11]
HPLC	Espectrofotometría UV-VIS, fotodiodos en serie	-	Ácidos fenólicos en aceite de oliva	52-100 ng/L	[12]
HPLC	Espectrometría de masas	Extracción en fase solida	Ácidos fenólicos en lipoproteína de baja densidad	0.32-0.89 ng/L	[13]
HPLC	Espectrometría de masas	Extracción en fase solida	Fenoles simples en leche materna	1ng/L	[14]
HPLC	Fluorescencia	Derivatización	Fenoles simples en agua	0.1-0.9 ng/L	[15]
HPLC	Electroquímico	-	Fenoles simples en cerveza	10-200 ng/L	[16]
HPLC	Electroquímico	Extracción en fase solida	Fenoles simples en agua	0.098-0.34 µM	[17]
CG	Espectrometría de masas	Extracción en fase solida con derivatización previa	Fenoles simples en agua	50-500 ng/L	[18]
CG	Espectrometría de masa	Extracción en fase solida con derivatización previa	Fenoles simples en agua	0.03-0.96 ng/L	[19]
CG	Espectrometría de masa	Extracción en una gota, con derivatización previa	Fenoles simples en agua	4-61 ng/L	[20]
CG	Espectrometría de masas o ionización en llama	Extracción en fase solida	Fenoles simples en agua	10-100 ng/L	[21]
EC	Espectrometría UV-VIS, fotodiodos en serie	Extracción en fase solida	bisfenoles	0.4 ng/L	[22]
EC	Espectrometría UV-VIS, fotodiodos en serie	Extracción en fase solida	Ácidos fenólicos	0.09-0.11	[23]

Estos métodos ofrecen un sinnúmero de ventajas y están bien establecidos, sin embargo, requieren equipos caros, personal calificado, y demandan largos tiempo de extracción y pretratamiento de la muestra y no son muy adecuados para análisis *in situ*.

Los métodos electroquímicos constituyen una alternativa interesante para el análisis de compuestos fenólicos, sustancias electroactivas fácilmente oxidables. Estos métodos analíticos son poco costosos, sencillos, con cortos tiempos de análisis y buena reproducibilidad. Por estas razones son muchos los grupos dedicados a desarrollar métodos electroquímicos de detección de compuestos fenólicos, y dentro de estos métodos los biosensores amperométricos, han adquirido un papel relevante [28]. Los biosensores amperométricos basados en enzimas ofrecen una excelente alternativa debido a sus ventajas, incluyendo el diseño compacto, la respuesta rápida, bajo costo y facilidad de uso en las aplicaciones de campo con corto tiempo de análisis y una buena reproducibilidad.

2.1.2.3. Antecedentes bibliográficos sobre la determinación de compuestos fenólicos con biosensores amperométricos

La necesidad de hacer frente a los problemas analíticos que se plantean hoy en día, requiere disponer de técnicas rápidas y fiables que permitan la detección *in situ* de sustancias contaminantes, como es el caso de los compuestos fenólicos presentes en muestras ambientales, y otras sustancias de interés, como los polifenoles en alimentos. Este hecho ha impulsado el desarrollo de biosensores como alternativa a técnicas espectrofotométricas y cromatográficas, que generalmente implican un mayor tiempo de análisis.

El empleo de enzimas, como elemento de reconocimiento biológico, y la detección amperométrica como sistema de transducción, para la fabricación de biosensores, proporciona numerosas ventajas desde un punto de vista analítico. En este apartado se va a dar una visión general de los diferentes métodos desarrollados en los últimos años basados en la utilización de biosensores enzimáticos amperométricos para la detección y determinación de compuestos fenólicos.

En la tabla 2., se resumen las características de diferentes biosensores electroquímicos encontrados en la bibliografía para la determinación de compuestos fenólicos. Los biosensores han sido agrupados atendiendo al material enzimático empleado, indicándose la enzima utilizada, parámetros experimentales, así como las características analíticas del método y el tipo de muestra a la que se han aplicado.

Tabla 2 Antecedentes bibliográficos sobre la determinación de compuestos fenólicos con biosensores amperométricos enzimáticos.

Electrodo/ Detección	Enzima	Analito/muestra	Intervalo Lineal	LD	Ref.
Pasta de Carbono/Amperom.	PPO	Fenol, catecol y p-cresol/Salmón	0-7 μM 0-10 μM 0-12 μM	-	[24]
Pasta de Carbono/Amperom.	PPO	Fenol, catecol	0-100 μM	-	[25]
Carbono Vitrificado/ DPV	PPO	Dopamina, 4-metil catecol/Suero	2-10 M 30-1200 μM	0.9 μM 17 μM	[26]
Carbono Vitrificado/Amperom.	PPO	Fenol, catecol, p-cresol/ Medios acuosos	3.3-220.3 μM 5.6-74.3 μM 3.8- 5.6 μM	0.8 μM 1.5 μM 2.4 μM	[27]
Carbono Vitrificado/Amperom.	PPO	Catecol, fenol	1-100 μM 5-100 μM	0.35 mM 1 μM	[28]
Screen-Printed/ Amperom.	PPO con BSA	Fenol, catecol/Aguas residuales	-	0.41 μM 0.43 μM	[29]
Screen Printed (Carbopack ó Pt)/ Amperom.	PPO	Fenol, catecol/ Aguas residuales	-	1.6 μM 0.38 μM	[30]
Grafito-Teflón/ Amperom.	PPO	Fenol, catecol/ Aguas residuales	1.0×10^{-8} - 4.0×10^{-5} M	1.0×10^{-8} M	[31]
Grafito-Teflón/ Amperom.	PPO	Fenol, catecol	0.1-25 μM 0.1-15 μM	0.1 μM 0.1 μM	[2]
Grafito- EPD/ Amperom.	PPO	Fenoles, catecol	0.05-6 μM 0.05- 8 μM	0.026 μM 0.028	[2]
Diamante/ CV y Amperom.	PPO	Fenol, p-cresol	1-200 μM 1-200 μM	0.2 μM 0.1 μM	[33]
Electrodo de oxígeno Clark (Oro)/ Amperom.	PPO y SH	Fenol/Orina	2×10^{-6} - 1.5×10^{-4} M	0.5 μM	[34]
Electrodo Clark/ Amperom.	PPO y BSA	Fenol, catecol/aceite oliva	10-500 ppm 0.5-5 ppm	4 ppm -	[6]
ITO/ Amperom.	PPO	Fenol, catecol, p-cresol	1.35-222.3 μM 5.6-74.3 μM 3.8-85.6 μM	-	[35]

Se han construido una amplia variedad de biosensores enzimáticos modificando electrodos de pasta de carbono y de carbono vitrificado. La mayoría de los métodos se basan en la reducción electroquímica de los productos de la reacción enzimática (*o*-quinonas) catalizada por la enzima polifenol oxidasa [24]. En algunos casos se utiliza una sustancia mediadora, cuya oxidación o reducción sobre el electrodo sirve para monitorizar la concentración de los fenoles en disolución. Uno de los principales inconvenientes de los biosensores basados en el principio de detección mencionado, está asociado con el ensuciamiento del electrodo; inducido por la polimerización de los radicales formados durante la secuencia de reacciones enzimáticas y electroquímicas, que alteran la sensibilidad y la precisión de las determinaciones.

También se han encontrado ejemplos en los que se emplea un electrodo de Clark [34]. En estos casos, la monitorización de los compuestos fenólicos se lleva a cabo mediante la detección del consumo de oxígeno. La inmovilización de las enzimas en los electrodos de oxígeno suele realizarse colocando la enzima sobre la superficie de la membrana permeable al gas del electrodo de oxígeno y recubriéndola con una membrana de diálisis o de otro tipo [36], o bien inmovilizando previamente la enzima en un gel que posteriormente se deposita en la membrana del electrodo [37].

Durante la preparación de biosensores, hay que tener en cuenta que la inmovilización de la enzima en la superficie electródica depende del tipo de material electródico empleado. Así, en los biosensores que utilizan materiales compósitos, el método de inmovilización más utilizado es el atrapamiento del material proteico en la matriz electródica [2], aunque en ocasiones la enzima se inmoviliza después de haberse mezclado con otras partículas [39]. Otra alternativa es el empleo de una fina capa de sol-gel [40], polímeros [41] y los hidrogeles [42,43], la incorporación dentro de pasta de carbono [44], o la inmovilización sobre electrodos modificados con nanomateriales [45-47].

Una gran parte de los diseños que utilizan electrodos de carbono vitrificado llevan a cabo la inmovilización de la enzima por encapsulamiento con una membrana [27], por atrapamiento en una matriz polimérica depositada en la superficie del electrodo [53], mediante el empleo de un hidrogel [48], o por unión covalente con carbodiimida [49]. En algunos casos, se emplean conjuntamente dos métodos de inmovilización, por ejemplo, unión covalente con glutaraldehído en la superficie del electrodo y posterior encapsulamiento con una membrana de diálisis, o unión covalente a un hidrogel que posteriormente se deposita sobre la superficie del electrodo [50]. En el caso de emplear un electrodo de grafito sólido la inmovilización de la enzima es similar a la de los electrodos de carbono vitrificado, si bien es más frecuente la adsorción, debido a la ventaja de que este material posee una superficie rugosa [51].

El medio de trabajo de estos biosensores es comúnmente acuoso o predominantemente acuoso, empleándose en la mayoría de los casos regulador fosfato a pHs entre 5.0 y 7.4. La escasa aplicación de los biosensores desarrollados puede atribuirse a la dificultad de llevar a cabo medidas en matrices complejas, en las cuales el límite de detección puede aumentar considerablemente, la estabilidad de la enzima suele disminuir y la pasivación electroquímica es habitualmente mucho más acusada.

2.1.3 Herbicidas

Un herbicida es una sustancia que inhibe o interrumpe el crecimiento y desarrollo de plantas indeseables (i.e. maleza o malas hierbas) que pueden crecer junto con los cultivos, limitando la producción agrícola y reduciendo la calidad de las cosechas. Existe una gran variedad de herbicidas, los cuales pueden clasificarse atendiendo a distintos criterios (tabla 3), siendo los más comunes: la época de aplicación, selectividad, tipo de movilidad en la planta, familia química y modo y mecanismo de acción.

Tabla 3. Criterios de clasificación de los herbicidas.

Selectividad	Naturaleza química
Selectivos: atacan a las malas hierbas sin afectar el cultivo	Compuestos organofosforados
No selectivos: destruyen toda la vegetación presente en la zona de aplicación, sin discriminar.	Compuestos triazínicos
Vía de absorción	Derivados de la urea
Absorción radicular, a través de las raíces de las plantas	Derivados del ác. fenoxiacético
Por los brotes.	Compuestos bupiridínicos
Absorción foliar, a través de las hojas de la planta.	Compuestos fenólicos
	Nitroanilinas
	Carbamatos y tiocarbamatos
Movilidad en la planta	Mecanismo de acción
Sistémicos: se distribuyen por la planta afectando a zonas de la misma, distintas a la de la aplicación.	Inhibición de la síntesis de lípidos
De contacto: destruyen los tejidos de la planta por fitotoxicidad directa afectando a la zona donde se aplican.	Inhibición de la síntesis de aminoácidos
Época de aplicación	Inhibición del crecimiento de las plántulas
Pre-siembra: antes de sembrar.	Reguladores del crecimiento
Pre-emergencia: después de la siembra, cuando el cultivo no ha emergido.	Inhibición de la fotosíntesis
Emergencia: cuando el cultivo está brotando.	Ruptura de la membrana celular
Post-emergencia: cuando el cultivo ya se ha desarrollado.	Inhibición de los pigmentos

El uso de herbicidas en los países industrializados está muy extendido, aplicándose en más del 85% de los cultivos principales como alternativa a la escarda manual utilizada en la agricultura tradicional. Estos compuestos pueden permanecer en pequeñas cantidades, denominadas residuos, en o sobre frutas, vegetales, granos y otros alimentos, así como en los suelos del cultivo, pudiendo ser absorbidos, posteriormente, por las plantas que crecen en ellos. Por otra parte, desde los suelos pueden transportarse, por disolución o arrastre mecánico, bajo la influencia del agua (precipitaciones atmosféricas) y llegar a aguas subterráneas, contaminando los medios acuáticos y la fauna que los habita. De esta forma pasan a formar parte de la cadena trófica, pudiendo ocasionar problemas de bioacumulación [52], [53]. Un ejemplo es el caso de los herbicidas triazínicos, grupo de contaminantes que incluye la atrazina (ATZ), presentes en los 10 herbicidas más utilizados en toda Europa.

2.1.3.1 Atrazina

La atrazina (ATZ) (No. CAS 1912-24-9) es un herbicida orgánico nitrogenado derivado del grupo de las triazinas (TRZs). Una de las familias de herbicidas más empleada en agricultura con una estructura común basada en un anillo triazínico (Figura 1) [54]. La atrazina es un sólido cristalino de color blanco sin olor y peso molecular 215.69 g/mol, con punto de fusión entre 175 y 177°C. Al calentarse se descompone produciendo gases tóxicos que incluyen el cloruro de hidrógeno y óxidos de nitrógeno. Su solubilidad en agua es de 34.7 mg/L a 26°C [55].

El compuesto grado técnico se comercializa en forma de suspensión, polvo o gránulos y tiene una pureza entre 92% y 99.9% [56]. La baja solubilidad en agua y la estabilidad química de las TRZs favorece su persistencia en el ambiente la cual varía entre 4 y 12 meses, pero si no existen condiciones favorables para su degradación es posible detectar residuos incluso hasta dos años después de su aplicación [57].

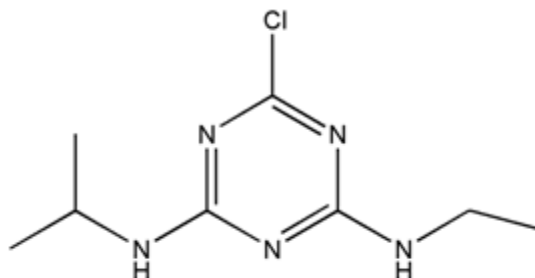


Figura 1. Estructura de la atrazina (C₈H₁₄ClN₅).

Las atrazina se aplican generalmente al suelo (tratamiento de pre-emergencia), donde es absorbida por el sistema radicular y transportadas hacia las hojas, vía apoplasto (xilema) [58]. Para actuar, requiere ser movilizadada a la zona de las raíces por medio de la lluvia o riego. También se puede aplicar al follaje con adición de tensioactivos, actuando en este caso como herbicidas de contacto al no poder movilizarse vía simplasto (floema).

Su mecanismo de acción se basa en la inhibición del proceso fotosintético, interfiriendo en la reacción de Hill. La ATZ se une a la proteína D1, localizada en el complejo del fotosistema II, por el mismo sitio de unión de la plastoquinona. Al impedir la entrada de plastoquinona, imposibilitan la formación de plastoquinona reducida, interfiriendo con la transferencia de electrones excitados fuera del fotosistema II. Se provoca así la destrucción de la clorofila y los carotenoides, causando la clorosis, y la formación de radicales libres que destruyen las membranas celulares, por lo que las plantas afectadas presentan como síntomas típicos clorosis foliar, seguida por necrosis y muerte de la planta [57]. Su acción se mide por medio del oxígeno liberado como oxígeno molecular, proveniente de la fotólisis del agua.

En el ámbito mundial, el herbicida se introdujo en año 1958, pero su utilización se ha incrementado constantemente desde hace 50 años [59]. El uso de la atrazina empezó en México en 1975 [60] y son diversas las empresas productoras del herbicida en el país. De acuerdo con la Asociación Mexicana de la Industria de Plaguicidas y Fertilizantes (AMIPFAC), en 1995, el empleo de herbicidas que contienen atrazina como ingrediente activo, fue de 2012 t o 12.8 % del total de herbicidas usados en México. La importación de productos que contienen atrazina como ingrediente activo (fracción arancelaria 2933.69.09) ha aumentado de 189.35 t en 2003 a 287.8 t en 2012, provenientes de Estados Unidos de América, China, India, Israel e Italia [61].

Su uso ha sido prohibido en los Estados Unidos de América y en varios países de la Comunidad Europea. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció un límite máximo admisible de 2 mg L⁻¹ para ATZ y 100 mg L⁻¹ para la ATZ, más sus metabolitos [62], mientras que en los Estados Unidos de América (EUA) se fijó este límite en 3 µg L⁻¹ para agua del mismo uso [63].

La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasifica la ATZ como compuestos de categoría 3: no clasificable como carcinógeno en humanos. En 1994, la Agencia de Protección Ambiental (EPA, del inglés Environmental Protection Agency) incluyó a las triazinas en

el grupo C, posible carcinógeno en humanos [64], clasificándolas, posteriormente, como compuestos de grupo N, no es probable que sea un cancerígeno para los seres humanos [65].

En México, el uso de atrazina no está regulado y es de amplia aplicación en zonas de cultivo, la normatividad contempla límites para algunos plaguicidas en agua, pero no para la atrazina. Sin embargo, su presencia supone siempre un riesgo potencial para la salud, principalmente debido a su tendencia a acumularse en tejidos grasos, y su exposición crónica se ha asociado a la aparición de daños hepáticos, de riñón y corazón, problemas en el desarrollo del feto e incremento de la posibilidad de desarrollar cáncer de ovario.

2.1.3.2 Determinación de atrazina

Los métodos analíticos para la determinación de residuos de atrazina, incluyen generalmente una etapa de extracción, una etapa de limpieza y/o preconcentración y finalmente la etapa de análisis. En la etapa de extracción, el analito objeto de estudio se separa de la matriz (agua, suelos, alimentos, etc.) a un extracto, el cual, en caso de ser necesario, se somete posteriormente a una etapa de limpieza, para eliminar otros posibles componentes extraídos de la matriz, y se concentra a un volumen menor. Por último, el extracto concentrado, o una fracción del mismo, se analizan empleando una técnica que permita detectar selectivamente el contaminante y cuantificar su concentración en la muestra.

Las técnicas más populares para la determinación de atrazina en el suelo, vegetales, frutas, tejidos animales, y muestras de orina son la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y cromatografía de gases (GC). La electroforesis capilar (CE) es una alternativa a las técnicas de HPLC y GC convencionales y está ganando importancia. Los inmunoensayos (especialmente a través del uso de kits) también se están haciendo disponibles y permiten el análisis de TRZs en condiciones de campo. Las técnicas más antiguas que todavía se utilizan a veces para el análisis de triazinas incluyen cromatografía en capa fina (TLC) y espectrofotometría; pero como cada vez aumentan los requisitos para lograr bajos límites de detección de analitos, estas técnicas están disminuyendo en importancia [66]. En la tabla 4 se muestran algunos de los trabajos publicados de determinación de atrazina en diferentes matrices.

Tabla 4. Antecedentes bibliográficos sobre la determinación de atrazina con métodos cromatográficos.

Método	Detector	Pretratamiento	Compuesto/muestra	LD	Ref.
HPLC	DAD	SPE (SDB-XC Empore TM, discos)	ATZ/agua de drenaje agrícola	100 ng/L	[67]
HPLC	UV	SPE (tierra de diatomeas)	ATZ/ agua de rio y potable	210-240 ng/L	[68]
HPLC	DAD	SPE (C18) SPE (Nanotubos de carbono)	ATZ/agua de rio, potable y residual	9-33 ng/L	[69]
HPLC	UV, $\lambda=220, 230$ nm	C18, metanol-agua (70:30 v/v)	ATZ/ naranjas, maíz	0.015-0.30 ppm	[70]
HPLC	MS-MS	C18, metanol-formiato de amonio 10 mM	ATZ/ zanahorias, papa	0.5-2.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[71]
GC-ITMS	MS	SPE (C18)	ATZ/agua de embalse y sedimentos	0.13-0.75 ng/L	[72]
GC	MSD	SPME	ATZ/agua subterránea	2-8 ng L ⁻¹	[73]
CG	NPD	Columna DB-5	ATZ/aceite	15 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[74]
CG	MS	Columna DB-5	ATZ/Suero de sangre humana	5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[75]
CG	NPD	Columna cianopropil fenil	ATZ/ aceite de oliva	0.006 mg kg ⁻¹ (LOQ)	[76]
CG	ECD	Columna SPB-5	ATZ/orina humana	10 ng mL ⁻¹	[77]
TLC	UV, $\lambda=254$ nm	FE: silica gel RO-18 F254 FM: Agua:metanol (8:2 v/v)	ATZ/suelos	–	[78]
EC	UV, $\lambda=210, 214$ nm	Metanol: acetonitrilo (50:50 v/v)	ATZ/ aguas subterráneas y superficiales	0.02-0.32 $\mu\text{g L}^{-1}$	[79]
Espectrofotometría	UV, $\lambda=470$ nm	p-aminoacetofenona agente derivatizantes	ATZ/aguas, semillas y suelos.	0.16-1-6 ppm	[80]
Inmunoensayo	–	–	–	0.025-0.1 g L ⁻¹	[81]

2.1.3.3 Antecedentes bibliográficos sobre la determinación de atrazina con biosensores electroquímicos

Los biosensores electroquímicos son los más ampliamente aplicados para la determinación de atrazina. Los típicos son los sensores enzimáticos con detección amperométrica, es decir, la señal analítica es la corriente farádica resultante registrada a un potencial constante apropiado [82].

Los biosensores amperométricos enzimáticos en su mayoría implican la enzima PPO [83-89], esta enzima cataliza la hidroxilación de *o*-monofenoles a *o*-difenoles (actividad monofenolasa o cresolasa) y la subsecuente oxidación de *o*-difenoles a sus correspondientes *o*-quinonas (actividad difenolasa o catecolasa). Puesto que la atrazina es un inhibidor de la PPO, se cuantifica midiendo la disminución de la corriente de la reducción de *o*-quinonas registrada a un potencial por lo general de -0.2 V/SCE (Figura 2).

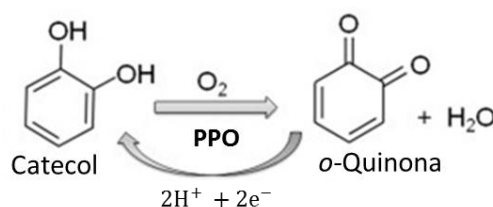


Figura 2. Principio de funcionamiento de un biosensor basado en la PPO para la determinación de atrazina.

Las *o*-quinonas son sustancias muy reactivas y pueden reaccionar de forma espontánea convirtiéndose en hidro-quinonas que polimerizan fácilmente (polímeros coloreados) [90], [91], lo que lleva a la formación de una capa o película aislante, ocasionando el ensuciamiento y la pasivación del electrodo. Por lo tanto, en un intento de mejorar las características analíticas de determinación de atrazina, algunos biosensores amperométricos basados en PPO hacen uso de mediadores [92]. Otro enfoque se basa en el seguimiento del consumo del cofactor oxígeno, la aplicación del electrodo tipo Clark [93]. Adicionalmente, la PPO podría ser inactivada por polímeros de *o*-quinona. Como el proceso es sensible al agua [94, 95], la inactivación se podría evitar realizando el análisis en medios orgánicos anhidros. Por lo tanto, la determinación de la atrazina se lleva a cabo con éxito en cloroformo [88, 89].

Otra desventaja de los biosensores basados en PPO se asocia con la baja estabilidad y la limitada unión de la enzima a superficies sólidas [96]. Por lo tanto, una gran variedad de protocolos de inmovilización de PPO se ensayaron para asegurar una alta estabilidad operacional y de almacenamiento de los biosensores, utilizando poli anfifílico (pirrol) [83], [84], politiofeno [47], sol-gel [87], carragenina [34], etc., como soporte para la inmovilización de la enzima. Mejores trabajos con biosensores en materia de estabilidad de la PPO y mejor sensibilidad se alcanzaron con nanomateriales aplicados como matriz de inmovilización de enzimas, es decir, la PPO se mantuvo en la superficie de crecimiento de nanotubos verticales de TiO₂ [86]. Las notables características del biosensor fabricado para la cuantificación atrazina se atribuyeron a la apropiada interfaz

bioelectroquímica de PPO/nanotubos TiO_2 , resultante de la preponderante estructura tubular, excelente biocompatibilidad, y la el carácter hidrófilo de los nanotubos de TiO_2 [86].

La inhibición de la PPO por la atrazina también fue explotada para el desarrollo de biosensores conductimétricos [98, 97]. El principio de detección se basa en el registro del cambio de conductividad de la membrana de la enzima PPO, ya sea cuando interactúa con su sustrato o inhibida por la atrazina. El límite de detección para la atrazina fue aproximadamente de 1 ppb. Sin embargo, una de las limitaciones de este tipo de biosensores es claramente su falta de selectividad. Las características analíticas de los biosensores electroquímicos aplicados para cuantificación atrazina se enumeran en la Tabla 5.

Tabla 5. Principales características analíticas de biosensores electroquímicos aplicados para la cuantificación atrazina

Biosensor	LD	Range lineal	Ref.
Amperométrico enzimático	4 μM	-	[83]
Amperométrico enzimático	1 mg L^{-1}	-	[85]
Amperométrico enzimático	0.1 ppt	0.2 ppt-2 ppb	[86]
Amperométrico enzimático	5.5 μM	1×10^{-5} - 1×10^{-4} M	[87]
Amperométrico enzimático	0.5 mg L^{-1}	1-7 mg L^{-1}	[88]
Amperométrico enzimático	0.5×10^{-6} mM	2×10^{-6} – 2×10^{-1} mM	[89]
Amperométrico enzimático	10 μM	20-130 μM	[93]
Conductométrico enzimático	1 ppb	2.15-2150 ppb	[97]
Amperométrico inmuno	0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$	-	[99]
Amperométrico inmuno	5×10^{-11} M	1×10^{-10} - 2.8×10^{-5} M	[100]
inmuno Impedimétrico	-	10-600 ng mL^{-1}	[101]
inmuno Impedimétrico	10 pg mL^{-1}	-	[102]
inmuno Impedimétrico	-	0.01 ppt-1 ppm	[103]
inmuno Impedimétrico	0.04 $\mu\text{g L}^{-1}$	-	[104]

Algunas de las desventajas de los biosensores amperométricos basados en PPO para la determinación de atrazina podrían evitarse aplicando inmunosensores electroquímicos. Se ha demostrado que los ensayos inmuno-absorbentes ligados a enzimas (ELISA) son muy adecuados para la determinación de atrazina, debido a la alta especificidad del análisis y el bajo límite de detección alcanzado [98], [105, 106]. Por lo tanto, los inmunosensores electroquímicos que combinan la simplicidad y la sensibilidad de los métodos electroquímicos, y el bajo coste del equipo electroquímico con la especificidad de los inmunoensayos son considerados como herramientas

analíticas muy ventajosas [107]. Los pasos a seguir aplicando inmunosensores electroquímicos incluyen actualmente la inmovilización del elemento de reconocimiento (antígeno o anticuerpo) en la superficie del electrodo, la inyección de un anticuerpo secundario marcado con enzima, la adición de un sustrato enzimático apropiado que produce especies electroactivas, y su detección electroquímica [108].

La mayoría de los inmunosensores electroquímicos hacen uso de la detección amperométrica utilizando como transductores de electrodos de carbono vítreo o varios electrodos serigrafiados, y anticuerpos monoclonales, anticuerpos monoclonales biotinilados (etiqueta de HRP) [96], anticuerpos policlonales (etiqueta de HRP) en conjunto con un sistema de polímeros molecularmente cableado de osmio, y fragmentos de costra recombinante (etiqueta de HRP), como elementos de reconocimiento biológico [109-112]. Otra estrategia para la detección de atrazina usando inmunosensores electroquímicos esta asociada con la aplicación de la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS). La técnica hace posible la detección directa, sin etiqueta de la unión anticuerpo-pesticida midiendo el cambio de la impedancia.

2.2 Biosensores: Definición

De acuerdo con la IUPAC, el término biosensor se reserva para definir 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 [114]. No debe confundirse con un sensor químico implantado en una matriz biológica para obtener datos de la misma, ya que si carece del elemento biológico no se corresponderá con un biosensor.

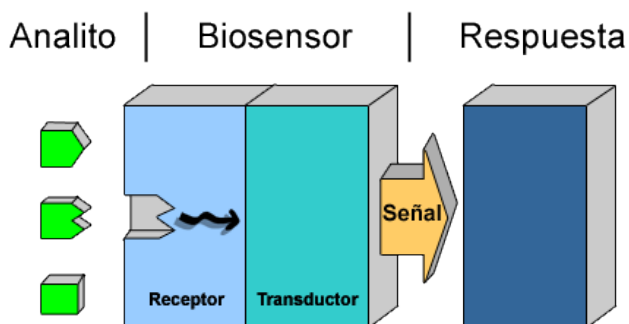


Figura 3. Estructura de un biosensor.

El primer biosensor fue desarrollado por Clark y Lyons, en 1962 para la determinación de glucosa y fue comercializado a partir de 1975 por Yellow Springs Instrument Company. Este biosensor se denominó "enzyme electrode" y consistía en la enzima glucosa oxidasa atrapada en una membrana semipermeable acoplada a un electrodo de oxígeno. Desde entonces, el desarrollo de los biosensores ha avanzado a otros campos como el control medioambiental y las industrias agroalimentarias. El número de publicaciones científicas, revisiones y patentes relacionadas con biosensores es muy elevado, lo que refleja el gran interés que despierta este tema en el área científica [114]. Las características más destacables de estos dispositivos, que los convierten en opciones altamente atractivas como herramientas analíticas, son: su especificidad, alta sensibilidad, capacidad de respuesta que conduce a un corto tiempo de análisis, su capacidad de inclusión en sistemas integrados, facilidad de automatización, capacidad de trabajar en tiempo real e *in situ*, su versatilidad y bajo costo, etc.

2.2.1 Clasificación de los Biosensores

Los biosensores pueden clasificarse atendiendo a diferentes criterios, como el modo en que interactúan el elemento de reconocimiento y el analito, la metodología de detección empleada para concretar dicha interacción y la naturaleza del elemento de reconocimiento o del sistema de transducción. En la tabla 6, se presenta una clasificación de biosensores de acuerdo a los criterios mencionados.

Tabla 6. Clasificación de los biosensores.

Criterios de clasificación de los biosensores	
Mecanismo de Interacción	Metodología de la Detección
Catalítico	Directa
Afinidad	Indirecta
Sistema de Reconocimiento	Sistema de Transducción
Enzima	Electroquímico
Orgánulo, tejido o célula	Óptico
Receptor biológico	Piezoeléctrico
Anticuerpo	Termométrico
Ácidos nucleicos	Magnético
PIM, PNA, aptámero	Nanomecánico

2.2.2 ELEMENTOS BIOLÓGICOS DE RECONOCIMIENTO MOLECULAR

Las moléculas utilizadas en los biosensores como elementos de reconocimiento 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 selectiva para reconocer a este elemento en presencia de otros compuestos y además, deberá permanecer estable a lo largo del tiempo [115].

El reconocimiento molecular puede conllevar simplemente el enlace entre el elemento receptor y la molécula reconocida (antígeno-anticuerpo) o bien la interacción puede ser de naturaleza catalítica (enzima-sustrato-producto). Éste es el principal criterio que se utiliza en la clasificación de los biosensores como catalíticos o de bioafinidad.

a) 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 enzimas inmovilizadas aisladas o paquetes multienzimáticos coinmovilizados, que actúan de modo encadenado, orgánulos celulares, células completas y tejidos animales o vegetales.

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, como por ejemplo determinados insecticidas del tipo de los carbamatos, que inhiben la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa y cuya presencia puede cuantificarse a través del grado de inactivación de esta enzima, o los metales pesados que inhiben la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, presente en la membrana de la microalga *Chlorella vulgaris*, que adecuadamente inmovilizada en el extremo de una fibra óptica permiten su determinación [115].

b) 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, 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. Existen algunos inconvenientes con este tipo de sistemas.

El principal es que habitualmente se requieren pasos adicionales de lavado y separación de las moléculas marcadas que permanecen en exceso. Además, necesita de la adición de sustratos específicos de las enzimas que se utilizan como marcadores. Por ello han proliferado otros sistemas de transducción directa basados en cuantificar la interacción entre el receptor y el analito a través de los cambios de masa que se producen sobre la superficie del material empleado como transductor [116], o también por los cambios que experimenta una radiación electromagnética, adecuadamente utilizada, y que se producen como consecuencia de esta interacción [117]. En la actualidad se emplean distintos tipos de reactivos de bioafinidad como anticuerpos, receptores y canales iónicos, lectinas, células, ácidos nucleicos, aptámeros, ácidos nucleicos peptídicos (PNAs) y polímeros de impresión molecular (PIMs).

2.2.3 MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN

El buen funcionamiento de un biosensor depende en gran medida, de la inmovilización del sistema de reconocimiento biológico sobre el transductor. El objetivo fundamental de la inmovilización es permitir un íntimo contacto entre la enzima y el transductor manteniendo inalterable en lo posible la estabilidad de dicho sistema de reconocimiento biológico. Los métodos de inmovilización comprenden métodos físicos, fundamentalmente por adsorción o por atrapamiento, y métodos químicos, ya sea mediante unión covalente o por entrecruzamiento o crosslinking. Dentro de cada uno de estos métodos existen numerosas variantes y además, también es posible utilizar

combinaciones de diferentes métodos de inmovilización. En la Figura 4., se recogen los esquemas correspondientes a los principales métodos de inmovilización y sus principios.

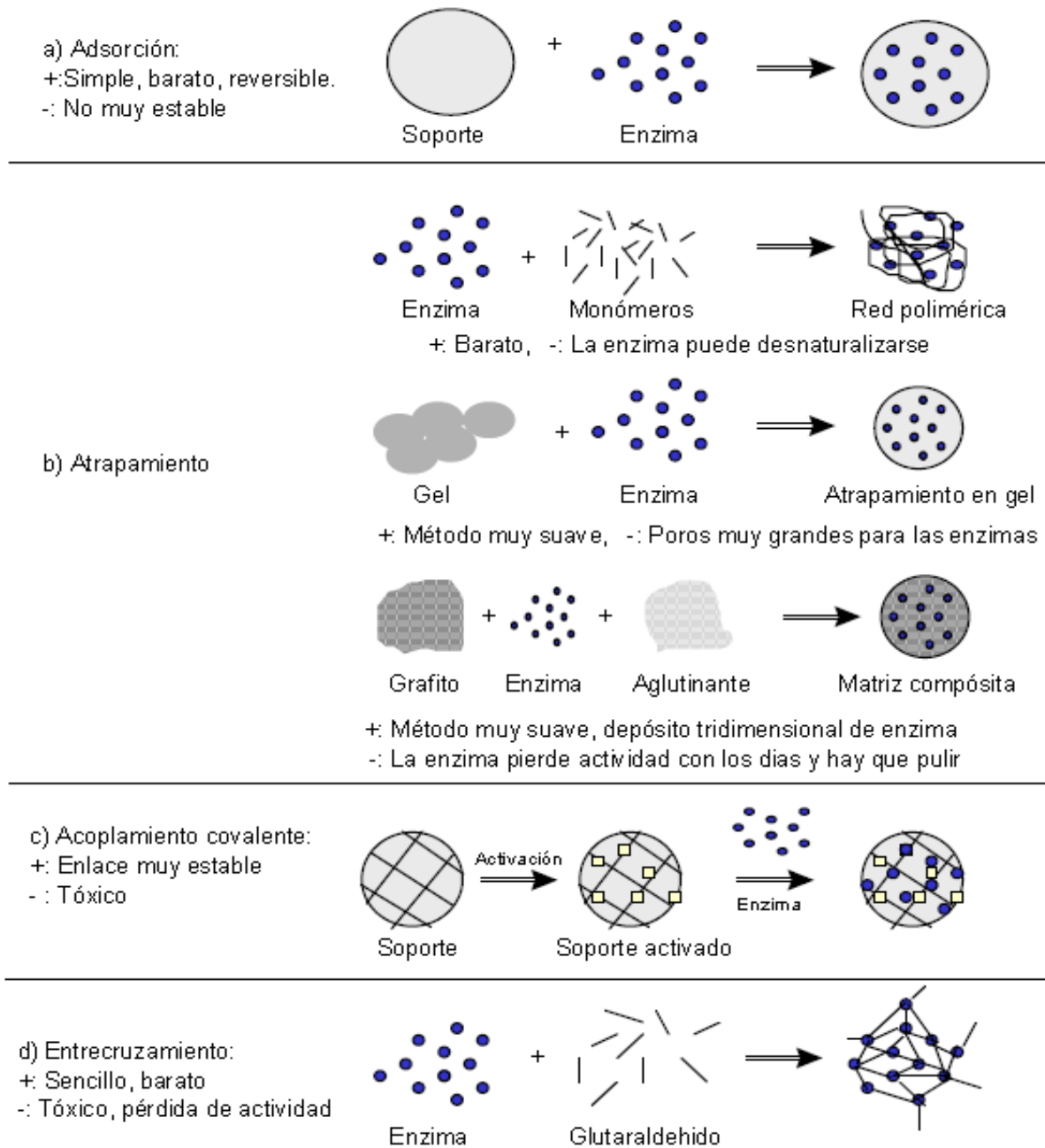


Figura 4. Esquemas de inmovilización de una biomolécula.

a) Adsorción

La adsorción de las biomoléculas sobre materiales es un método de inmovilización simple, poco costosa, con alta sensibilidad y que no desnaturaliza a la enzima, lo que hace que sea una técnica versátil para la modificación de la superficie electródica. Este tipo de inmovilización se basa en la unión de la biomolécula a la matriz mediante interacciones de tipo no covalente: fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno o de Van der Waals. El procedimiento de adsorción consiste en poner en contacto las moléculas de enzima con el material adsorbente durante el tiempo suficiente para que se produzcan las interacciones. Los adsorbentes utilizados son: resinas de intercambio iónico, geles de sílice, arcillas, alúmina, colágeno y vidrio poroso [118]. Este sistema presenta un inconveniente, se trata de un proceso reversible ya que la unión entre la matriz y la enzima es débil, pudiéndose producir pérdida de enzima.

b) Encapsulación

En este método, el biomaterial se separa del seno de la disolución mediante una membrana. Los tipos principales de membranas usadas son acetato celulosa (membrana de diálisis), policarbonato, Nafion, etc. Entre las ventajas de este sistema destacan la unión íntima entre el biomaterial y transductor, además, de preparación sencilla.

c) Atrapamiento

El atrapamiento es otro método físico de inmovilización que puede llevarse a cabo de dos formas diferentes: a) por inclusión dentro de una matriz polimérica y b) por inclusión en la matriz del transductor. Estas técnicas de atrapamiento poseen algunas ventajas tales como su preparación químicamente sencilla, fácil manipulación y además, la enzima está protegida de la biodegradación y la contaminación por la matriz, lo cual aumenta el tiempo de vida del biosensor [119]. Como desventaja se puede encontrar la dificultad de acceso del sustrato a la enzima por la barrera difusional impuesta.

d) Entrecruzamiento

En los métodos químicos de inmovilización basados en el entrecruzamiento, se producen uniones de las enzimas entre sí mediante reactivos bifuncionales, entre los que destacan el glutaraldehído y 2,4-dinitro-benceno. Con este método se produce una mínima pérdida de enzima, pero las uniones entre las enzimas son irreversibles y se utilizan sustancias químicas tóxicas [120].

e) Enlaces covalentes

Se producen uniones covalentes entre grupos funcionales de la enzima que no son esenciales para su actividad catalítica con grupos químicos de la matriz o directamente del transductor. Como ventajas se destaca la manipulación sencilla y la estabilidad en condiciones ambientales extremas teniendo como inconvenientes la posible alteración del centro activo de la enzima y el tratamiento con sustancias químicas tóxicas.

En las reacciones químicas utilizadas en la inmovilización covalente, generalmente intervienen los grupos nucleófilos de las moléculas como grupos amina (-NH₂), grupos carboxílicos (-COOH), alcoholes (-OH), tioles (-SH) o también grupos imidazol. Las vías principales de reacción suelen reducirse a la activación de ácidos carboxílicos en ésteres mediante carbodiimida y N-hidroxisuccinimida, a la formación de una base de Schiff entre una amina nucleófila y un aldehído y a las sustituciones nucleofílicas entre aminas primarias o tioles y grupos electrófilos con un elemento saliente, como un éster activado o un halogenuro de ácido [120].

f) Técnica sol-gel

Se parte de un precursor (sales inorgánicas de metales o compuestos organometálicos) que se somete a reacciones de hidrólisis y polimerización dando una suspensión coloidal o sol. Esta suspensión se deposita sobre la superficie a recubrir y las partículas se condensan en una nueva fase, gel, formando una capa muy fina. Posteriormente, esta película se somete a un tratamiento térmico, dando lugar a una matriz sólida porosa [121]. El material de reconocimiento se añade durante la transición de sol a gel, quedando retenido el material biológico en las cavidades de la matriz.

g) Monocapas autoensambladas (self-assemble monolayers o SAMs)

Se forman por la organización espontánea de las moléculas de enzima con ciertos grupos funcionales (ej, tiol), sobre la superficie de un metal. Para inmovilizar el elemento de reconocimiento, se pone en contacto las monocapas con una disolución que contenga el material biológico produciéndose una interacción entre ambos a través de grupos funcionales que se han activado previamente con diversos compuestos químicos.

h) Membranas de bicapas lipídicas (bilayer lipid membranes o BLMs)

Aunque su uso para la fabricación de biosensores no es algo reciente, su utilización en este campo se ha limitado debido entre otras cosas a problemas de estabilidad mecánica. Para mejorar la estabilidad se han diseñado membranas unidas a un soporte sólido (solid supported bilayer lipid membranes) y para ello, se requiere de una SAM adsorbida sobre la superficie del transductor más una monocapa lipídica que interacciona con ella [119].

2.2.4 SISTEMA DE TRANSDUCCIÓN

Los transductores son dispositivos que convierten la información correspondiente a las variaciones de las propiedades fisicoquímicas, inducidas como consecuencia de la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analíto, en magnitudes eléctricas cuantificables. Esta transformación permite que las señales puedan ser amplificadas, almacenadas y registradas [120].

Como se ha indicado anteriormente, existen varios tipos de transductores que pueden emplearse en la fabricación de biosensores, como transductores electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos (másicos, gravimétricos, acústicos), termométricos, magnéticos y nanomecánicos. La utilización de un transductor u otro dependerá del propio elemento de reconocimiento empleado, de la naturaleza de la interacción entre éste y el analíto y del mecanismo de señalización producido por el marcador utilizado si lo hubiere.

a) Transductores electroquímicos

Los transductores electroquímicos utilizan propiedades electroanalíticas que se producen o modifican por la interacción entre el analíto y el sistema de reconocimiento, proporcionando información analítica cuantitativa o semicuantitativa. Para el adecuado funcionamiento del biosensor, el elemento de reconocimiento y el sistema de transducción deben estar en contacto directo. Atendiendo a esta modalidad de transducción, existen cuatro tipos de biosensores: potenciométricos, amperométricos, conductimétricos e impedimétricos [122] dependiendo de que detecten cambios en el potencial de electrodo, en la corriente eléctrica generada o consumida, la conductividad y resistencia eléctrica.

Se utilizan habitualmente con elementos de reconocimiento biocatalíticos como enzimas, ya que éstas pueden generar o consumir sustancias electroactivas que impliquen cambios en el pH, en el potencial, resistencia eléctrica, etc.

b) Transductores amperométricos

Se basan en la medida de las corrientes faradaicas resultantes de los intercambios de electrones que se producen entre las enzimas que constituyen el sistema de biorreconocimiento y un electrodo mantenido a un potencial apropiado. La posibilidad de poder incorporar en el electrodo otros componentes, como mediadores redox, cofactores u otras biomoléculas, confiere a este tipo de biosensores una gran versatilidad de uso [123].

La mayor parte de los biosensores amperométricos utilizan las enzimas del grupo oxido-reductasas, dado que los productos consumidos o producidos durante el proceso de óxido-reducción, suelen ser fácilmente transducibles amperométricamente. La determinación de oxígeno mediante el electrodo de Clark, aplicando potenciales de -0.6 V (vs AgCl/Ag) a un electrodo de trabajo de platino, es una de las alternativas, aunque también puede recurrirse a la oxidación del peróxido de hidrógeno, en aquellas reacciones catalizadas por enzimas que generen este producto, como las flavin-oxidasas del tipo glucosa oxidasa, a potenciales de $+0.68\text{ V}$ vs AgCl/Ag . El principal problema, asociado a estos biosensores, es su acusada dependencia de la concentración de oxígeno disuelto. Este inconveniente se puede solventar mediante la utilización de mediadores electroquímicos que transfieren los electrones directamente al electrodo, sin necesidad de reducir el oxígeno como cosustrato.

En la actualidad se dispone también de biosensores amperométricos donde los electrones pueden transferirse directamente desde el centro activo reducido de la enzima, sin necesidad de utilizar mediadores. Estos biosensores utilizan sales orgánicas conductoras, como el ión Nmetilfenazinio (NMP⁺) con el radical tetracianoquinodimetano (TCNQ⁻). Por sus características, numerosas flavo-enzimas son fuertemente adsorbidas por estas sales mediante la formación de uniones salinas, dada la alternancia de cargas positivas y negativas dentro de un entorno hidrofóbico. Estos electrodos enzimáticos se pueden preparar simplemente mediante inmersión del propio electrodo en una disolución de la enzima y permanecer estables durante varios meses.

La progresiva reducción de los potenciales de trabajo necesarios que introduce este tipo de mediación, disminuye sustancialmente los problemas asociados con la interferencia de compuestos extraños, que se producen trabajando a potenciales elevados. Estos tres tipos de electrodos constituyen las tres generaciones de biosensores amperométricos.

Sin duda alguna, en el contexto de los biosensores electroquímicos, los más prometedores, sobre todo en términos de sensibilidad, son los biosensores amperométricos, los cuales monitorizan corrientes faradaicas resultantes de intercambios electrónicos entre el sistema biológico y un electrodo mantenido a un potencial constante apropiado. De entre los biosensores amperométricos, los más utilizados son los electrodos enzimáticos, que al inmovilizar en las cercanías del material electródico las enzimas, combinan las ventajas de la selectividad enzimática con la transducción directa de la velocidad de reacción en una corriente eléctrica.

c) Transductores Potenciométricos

Basados en medidas potenciométricas, suelen emplearse electrodos selectivos a iones (Ion Selective Electrode ISE), con los que se determina la variación en la concentración de un ión, inducida mediante una reacción catalizada por una enzima. Las variaciones en la medida de los potenciales vienen determinadas por la ecuación de Nerst y en el caso de los electrodos enzimáticos se encuentra afectada por el valor de la constante de Michaelis-Menten (K_M) de la enzima utilizada. La respuesta sólo será lineal a concentraciones de sustrato inferiores a la equivalente a la décima parte del valor de dicha K_M . Las configuraciones más empleadas en este tipo de biosensores utilizan el electrodo de vidrio, el electrodo de amoniaco, el de yoduro y el sensor de anhídrido carbónico, en combinación con diferentes enzimas inmovilizadas en la proximidad del electrodo, mediante membranas del tipo poliacrilamida [123]. Los electrodos selectivos a iones deben su respuesta a la diferencia de potencial

que se genera a ambos lados de una membrana, con propiedades de unión selectiva para un determinado ión, que separa la disolución objeto de análisis y un electrolito interno de concentración invariable.

d) Transductores Conductimétricos e Impedimétricos

Las variaciones en la conductividad de un medio, debidas a la transformación catalítica de un sustrato en sus productos correspondientes, pueden también detectarse mediante un sistema integrado de electrodos planos interdigitados, a través de la medida de su impedancia. El ejemplo quizás más característico lo constituye el biosensor de urea, fabricado mediante la inmovilización de ureasa sobre la superficie del sistema de electrodos. Esta enzima en presencia de urea cataliza su transformación en el ión bicarbonato y amoníaco, con el consiguiente aumento en la conductividad del medio.

e) Transductores Ópticos

Los transductores ópticos 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. Entre los transductores que utilizan propiedades ópticas se incluyen los sensores de fibra óptica (optrodos) y los sensores de onda evanescente [123].

f) Transductores Másicos

Bajo esta denominación se incluyen los sistemas de transducción que detectan pequeños cambios de masa producidos sobre la superficie sensora, debidos a la interacción analito-sistema de reconocimiento. Se denominan también gravimétricos, piezoeléctricos o transductores acústicos, dado que en su diseño se utilizan cristales piezoeléctricos que entran en resonancia cuando se aplica una corriente eléctrica alterna. El acoplamiento de elementos de reconocimiento, sobre este tipo de

cristales, permite la construcción de biosensores que pueden detectar directamente la unión con su correspondiente analíto. Puesto que la frecuencia de oscilación del cristal viene determinada por su masa, de acuerdo con la ecuación de Sauerbrey, esta frecuencia variará cuando se produzca la interacción, pudiendo relacionarla con la concentración del analíto.

Los sensores piezoeléctricos pueden adoptar dos modos distintos de funcionamiento, según el tipo de onda acústica implicada. Unos son los denominados tipos SAW (Surface Acoustic Wave) donde la resonancia ocurre sólo en la superficie del cristal, al tratarse de ondas transversales superficiales cuya energía se encuentra confinada en una zona de la superficie equivalente a una longitud de onda. El otro modo corresponde a los tipos BAW (Bulk Acoustic Wave) que son ondas de volumen que atraviesan el cristal y por tanto la resonancia ocurre en toda la masa del mismo. El dispositivo que utilizan estas últimas se conoce comúnmente como la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM). El aumento de masa que tiene lugar, como consecuencia de la reacción de afinidad, en el camino acústico entre dos pares de electrodos, implica un cambio en la velocidad de la onda y por tanto en la frecuencia de oscilación [124].

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.

g) Transductor Nanomecánico

Son estructuras fabricadas mediante nanotecnología, a partir de silicio o de nitruro de silicio y pueden ser de forma triangular o rectangular, simulando ménsulas o trampolines en miniatura. Dichas estructuras experimentan una deflexión en su extremo como consecuencia de la incorporación sobre el mismo del analíto de interés. Su pequeño tamaño (1 μm de espesor, 500 μm de longitud y 100 μm de anchura) permite medidas de gran sensibilidad de menos de un ángstrom de variación en su curvatura con respecto a su posición inicial. La detección del analíto puede llevarse a cabo por distintos mecanismos, como por ejemplo mediante un haz de luz láser dirigido hacia el extremo de la estructura y que permite conocer el grado de deflexión del dispositivo a través del cambio en la reflexión del láser, que afectará, a su vez, al rendimiento de un fotodiodo alineado con él [125]. El cambio de masa (de 1 pg) puede también determinarse midiendo el cambio en la frecuencia de resonancia que experimenta el transductor o mediante detección eléctrica directa [126]. Se han

utilizado para detectar pequeñas cantidades de microorganismos patógenos como la Salmonella, con un límite de detección de 25 células. También se ha empleado para detectar el polimorfismo de un solo nucleótido.

2.3 BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS DE PPO

Los biosensores amperométricos de PPO se han empleado para la determinación de diferentes sustratos, activadores e inhibidores de la reacción enzimática catalizada por la oxidoreductasa. Estos biosensores se han utilizado en medios acuosos y no acuosos.

2.3.1 Elemento Biocatalítico

La polifenol oxidasa (PPO) (EC 1.14.18.1), también conocida como tirosinasa, clasificada dentro de la clase de las óxido-reductasas está ampliamente distribuida en la naturaleza, encontrándose en bacterias, plantas y animales. La PPO ha sido purificada a partir de una gran variedad de fuentes que incluyen desde el champiñón hasta el melanoma de ratón.

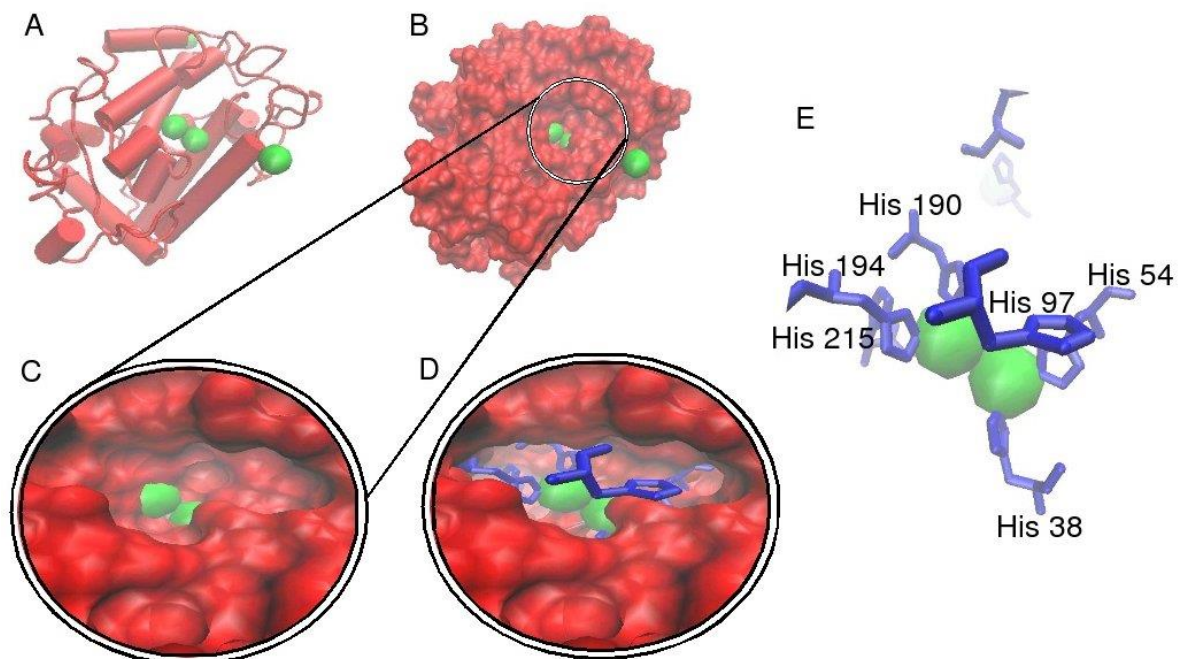


Figura 5. Enzima PPO.

La estructura de la PPO producida por champiñones es la de un tetrámero, con un peso molecular de 128.000 Dalton, cuyo centro activo consiste en dos átomos de cobre unidos a histidinas;

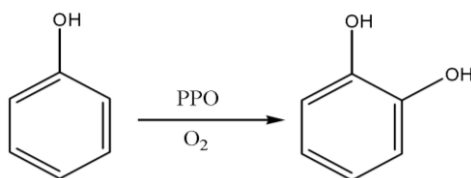
alrededor de los cobres, se sitúan aminoácidos hidrofóbicos, con anillos aromáticos importantes para la unión de los sustratos [32]. Los sitios activos muestran una estructura piramidal trigonal coordinadas por las esferas formadas por los tres ligandos de histidina y la molécula del solvente como puente.

Los modelos de la Figura 5, tienen el formato del archivo 1WX3 del Protein Data Bank. Este archivo PDB contiene las coordenadas de la estructura cristalina de una PPO obtenida de *Streptomyces* que forma un complejo con una llamada "proteína caddie". En todos los modelos sólo se muestra la molécula de PPO, los átomos de cobre se muestran en verde y la superficie molecular se muestra en rojo. En los modelos D y E los aminoácidos de histidina aparecen como una representación de una línea azul. Del modelo E se puede ver claramente que cada átomo de cobre dentro del sitio activo está efectivamente formando un complejo con tres residuos de histidina, con un centro de cobre tipo 3. También puede verse de los modelos C y D que el sitio activo para esta proteína se encuentra dentro de una bolsa formada en la superficie molecular.

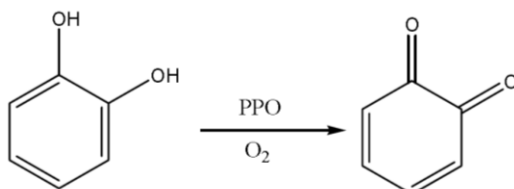
2.3.1.1 Sustratos

La especificidad de las tirosinasas se reduce a los monofenoles con una posición orto libre y los ortodifenoles. El mecanismo de reacción de la PPO, se basa en la catálisis de dos etapas secuenciales e interdependientes, en el caso de los monofenoles:

- Hidroxilación de monofenoles en posición orto (cresoles, clorofenoles, fenol, etc) a *o*-difenoles (actividad monofenolasa o cresolasa):



- Oxidación de *o*-difenoles (catecol, dopamina, epinefrina) a *o*-quinonas (actividad difenolasa o catecolasa):



Siguiendo un mecanismo ordenado, la enzima liga primero el oxígeno y después el monofenol. Se produce un cambio de valencia de los iones de cobre de Cu^{1+} a Cu^{2+} formándose un complejo que tiene un enlace O–O bien polarizado donde se produce la hidroxilación a *o*-difenilo. La oxidación del *o*-difenol a *o*-quinona finaliza el ciclo. La polifenol oxidasa es capaz de catalizar reacciones de oxidación de compuestos polifenólicos en presencia de oxígeno molecular y la presencia de los compuestos oxidados por la enzima son precursores de las reacciones de pardeamiento [38].

2.3.1.2 Inhibidores de la PPO

Es conocido que la PPO sufre una inhibición autocatalítica. Esta inhibición parece deberse a la unión covalente de un producto quinónico de reacción a la enzima, al ataque de un radical hidroxílico unido a un cobre generado por el complejo Cu (I)-peróxido, o por la destrucción de un residuo de histidina durante los procesos de oxidación en la catálisis.

Además, se conoce un número de inhibidores competitivos de la PPO que se unen al centro activo de la enzima. Los más eficientes son los que poseen una función con un nitrógeno o un oxígeno en conjunción con otro oxígeno en una distancia 2.7-2.8 Å, que corresponde a la distancia de 3 Å de los átomos de cobre en el centro activo de la enzima. Algunos ejemplos son el ácido salicilhidroxámico y la tropolona.

2.3.2 TRANSDUCTOR ELECTROQUÍMICO

La determinación del sustrato se puede llevar a cabo midiendo el consumo de oxígeno en la reacción enzimática (a) o midiendo la reducción electroquímica de las *o*-quinonas producidas enzimáticamente (b). En la primera modalidad se utiliza un electrodo de oxígeno tipo Clark y en el segundo caso electrodos de carbono. La intensidad de corriente obtenida en ambos casos se relaciona directamente con la concentración de sustrato (Figura 6).

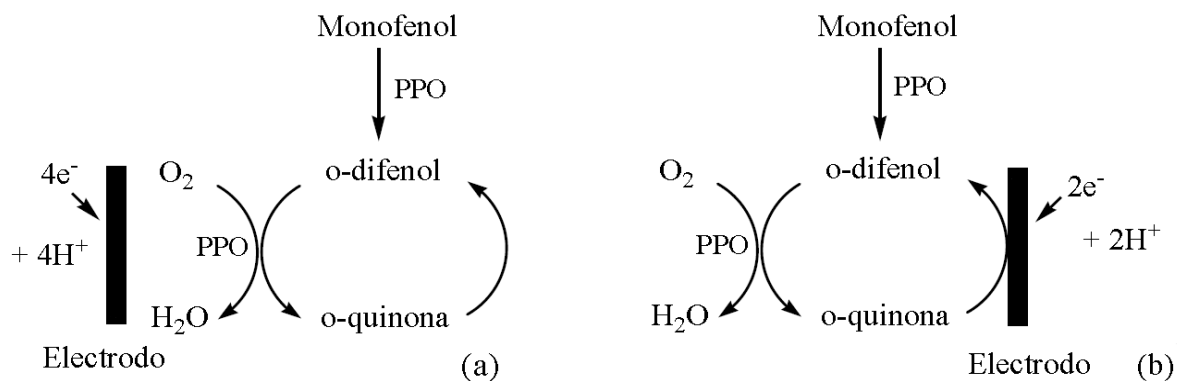


Figura 6. Reacción global del biosensor midiendo (a) el oxígeno consumido en la reacción enzimática o (b) la reducción de la *o*-quinona producida enzimáticamente.

REFERENCIAS CAPÍTULO II

- [1] Doménech, X. El ciclo de los contaminantes, en: Química de la contaminación. Miraguano Ed., Madrid. (1999).
- [2] Serra, B., Jiménez S., Mena, M.L., Reviejo, A., and Pingarrón J.M. Composite electrochemical biosensors: a comparison of three different electrode matrices for the construction of amperometric tyrosinase biosensors. *Biosens. Bioelectron.* (2002), 17:217-226.
- [3] Soares-Rosatto S., Sanches-Freire R., Durán N. and Tsatsuo-Kubota L. Biosensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Quim. Nova.* (2001), 24: 77-86.
- [4] Wang J., Lu F. and Lopez D. Tyrosinase-based ruthenium dispersed carbon paste biosensor for phenols. *Biosens. Bioelectron.* (1994), 9: 9-15.
- [5] Mello L.D., Tabeada M.P. and Kubota L.T. HRP-based amperometric biosensor for the polyphenols determination in vegetables extract. *Sens. Actuat. B.* (2003), 96 (3): 636-645.
- [6] Capannesi C., Palchetti I., Mascini M. and Parenti A. Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection of phenols. *Biosens. Bioelectron.* (2000), 17: 1015-1023.
- [7] Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Gallina-Toschi, T., and Fernandez-Gutierrez, A. Analytical determination of polyphenols in olive oils. *J. Sep. Sci.* (2005), 28, 837-858.
- [8] Gomez-Caravaca, A., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., and Fernandez-Gutierrez, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J. Pharm. Biom. Anal.*, (2006), 41, 1220-1234.
- [9] Stoggl, M., Huck, CW., Stecher, G., and Bonn, GK. Capillary electrochromatography of biologically relevant flavonoids. *Electrophoresis.* (2006), 27, 787-792.
- [10] Fonseca, N., Tavares, M., and Horvath, C. Capillary electrochromatography of selected phenolic compounds of *Chamomilla recutita*. *J. Chrom. A.* (2007), 1154, 390-399.

- [11] Herrera, MC., and Luque de Castro, MD. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. *J. Chrom. A.* (2005), 1100, 1-7.
- [12] Jimenez, MS, Velarte., R., and Castillo, J. Direct determination of phenolic compounds and phospholipids in virgin olive oil by micellar liquid chromatography. *Food. Chem.* (2007), 100, 8-14.
- [13] Torre-Carbot, K., Chavez-Servin, JL., Jauregui, O., Castellote, AI., Lamuela-Raventos, RM., Fito, M., Covas, MI., Muñoz-Aguayo, D., and Lopez-Sabater, MC. Presence of virgin olive oil phenolic metabolites in human low density lipoprotein fraction: Determination by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* (2007), 583, 402-410.
- [14] Ye, X., Kuklennyik, Z., Needham, LL., and Calafat, AM. Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *J. Chrom. B.* (2006), 831, 110-115.
- [15] Suliman, F., Al-kindy, S., Al-Kindy, S., and Al-Lawati, J. Analysis of phenols in water by high-performance liquid chromatography using coumarin-6-sulfonyl chloride as a fluorogenic precolumn label. *J. Chrom. A.* (2006), 1101, 179-184.
- [16] Vanbeneden, N., Delvaux, F., and Delvaux, FR. Determination of 4-vinylgaiacol and 4-vinylphenol in top-fermented wheat beers by isocratic high performance liquid chromatography with ultraviolet detector. *J. Chrom. A.* (2006), 1136, 237-242.
- [17] Vega, D., Agui, L., Gonzalez-Cortes, A., Yañez-Sedeño, P., and Pingarrón, J. Electrochemical detection of phenolic estrogenic compounds at carbon nanotube-modified electrodes. *Talanta.* (2007), 71,1031-1038.
- [18] Zhang, ZL. Hibberd, A., and Zhou, J. Optimisation of derivatisation for the analysis of estrogenic compounds in water by solid-phase extraction gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* (2006), 577, 52-61.
- [19] Gatidou, G., Thomaidis, N., Stasinakis, A., and Lekkas, T. Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and

- bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chrom. A.* (2007), 1138, 32-41.
- [20] Saraji, M., and Bakhshi, M. Determination of phenols in water samples by single-drop microextraction followed by in-syringe derivatization and gas chromatography–mass spectrometric detection. *J. Chrom. A.* (2005), 1098, 30-36.
- [21] Faraji, H. β -Cyclodextrin-bonded silica particles as the solid-phase extraction medium for the determination of phenol compounds in water samples followed by gas chromatography with flame ionization and mass spectrometry detection. *J. Chrom. A.* (2005), 1087, 283-288.
- [22] Blanco, E., Casais, M., Mejuto, M., and Cela, R. Analysis of tetrabromobisphenol A and other phenolic compounds in water samples by non-aqueous capillary electrophoresis coupled to photodiode array ultraviolet detection. *J. Chrom. A.* (2005), 1071, 205-211.
- [23] Lima, D., Duarte, A., Esteves, V. Optimization of phenolic compounds analysis by capillary electrophoresis. *Talanta.* (2007), 72, 1404-1409.
- [24] Tingry, S., Innocent, C., Touil, S., Deratani, A. and Seta, P. Carbon paste biosensor for phenol detection of impregnated tissue: modification of selectivity by using β -cyclodextrin-containing PVA membrane. *Mat. Sci. Eng. CBio S.* (2006), 26 (2-3): 222-226.
- [25] Rogers, K., Becker, J., and Cembrano, J. Improved selective electrocatalytic oxidation of phenols by tyrosinase-based carbon paste electrode biosensor. *Electrochim. Acta* (2000), 45: 4373-4379.
- [26] Tembe, S., Karve, M., Inamdar, S., Haram, S., Melo, J. and D'Souza, S. Development of electrochemical biosensor based on tyrosinase immobilized in composite biocopolymeric film. *Anal. Biochem.* (2006), 349 (1): 72-77.
- [27] Rajesh, W., and Kaneto, K. Amperometric tyrosinase based biosensor using an electropolymerized PTS-doped polypyrrole film as an entrapment support. *React. Funct. Polym.* (2004), 59 (2): 163-169.
- [28] Kim, M., and Lee, W. Amperometric phenol biosensor based on sol-gel silicate/Nafion composite film. *Anal. Chim Acta.* (2003), 479 (2):143-150.

- [29] Solná, R., Sapelnikova, S., Skládal, P., Winther, M., Carlsson, C., Emnéus, J. and Ruzgas, T. Multienzyme electrochemical array sensor for determination of phenols and pesticides. *Talanta*. (2005), 65: 349-357.
- [30] Solná, R., Dock, E., Christenson, A., Winther, M., Carlsson, C., Emnéus, J., Ruzgas, T. and Skládal, P. Amperometric screen-printed biosensor arrays with co-immobilised oxidoreductases and cholinesterases. *Anal. Chim. Acta*. (2005), 528 (1): 9-19.
- [31] Serra, B., Reviejo, A., and Pingarrón, J. Composite multienzyme amperometric biosensors for an improved detection of phenolic compounds. *Electroanal*. (2003), 15 (22): 1737-1744.
- [32] Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J. and Krebs, B. Cristal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural Biology*. (1998), 5(12): 1084-1090.
- [33] Zhou, Y., and Zhi, J. Development of an amperometric biosensor based on covalent immobilization of tyrosinase on a boron-doped diamond electrode. *Electrochem. Comm*. (2006), 8 (12): 1811-1816.
- [34] Campanella L., Gregori E. and Tomassetti M. Salicylic acid determination in cow urine and drugs using a bienzymatic sensor. *J. Pharm. Biom. Anal.* (2006), 42(1): 94-99.
- [35] Rajesh W., Takashima and Kaneto K. Amperometric phenol biosensor based on covalent immobilization of tyrosinase onto an electrochemically prepared novel copolymer poly (N-3-aminopropyl pyrrole- copyrrole) film. *Sens. Actuat. B*. (2004), 102 (2): 271-277.
- [36] Streffer, K., Vijgenboom, E., Tepper, A., Makower, A., Sheller, F., Canters, G., and Wollenberger, U. Determination of phenolic compounds using recombinant tyrosinase from *Streptomyces antibioticus*. *Anal Chim. Acta*. (2001), 427: 201-210.
- [37] Campanella, L., Bonanni, A., Finotti, E., and Tomassetti, M. Biosensors for determination of total and natural antioxidant capacity of red and white wines: comparison with other spectrophotometric and fluorimetric methods. *Biosen. Bioelectron*. (2004), 19: 641-651.
- [38] Ayaz, A., Demir, O., Torun, H., Kolcuoglu, Y., and Colak, A. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening. *Food Chemistry*. (2008), 106:291-298. New York.

- [39] Liu, S., Yu, J. and Ju, H. Renewable phenol biosensor based on a tyrosinase-colloidal gold modified carbon paste electrode. *J. Electroanal. Chem.* (2003), 540 (2): 61-67.
- [40] Lee J., Xu G., Kim B., and Lee, W. Amperometric tyrosinase biosensor based on carbón nanotube-doped sol-gel-derived zinc oxide–nafion composite films. *Electroanalysis* (2011); 23:962.
- [41] Bieganski, A., Michota, A., Bukowska, J., y Jackowska, K. Inmovilización de la tirosinasa en poli (ácido indol-5-carboxílico) Evidencia Por Métodos electroquímicos y espectroscópicos. *Bioelectroquímica*. (2006), 69 p. 41.
- [42] Li, M., Yao, H., y Zhu, J. Reactivos pecado Biosensor Para Los Compuestos fenólicos Sobre la base de de la tirosinasa Atrapado Dentro De La película de gelatina. *Anal. Bioanal. Chem.* (2005), 383 p. 1127.
- [43] Guérente, L., Desbrières, J., Fatisson, P., Labbé, y Rivas, G. Caracterización físicoquímica de la auto-Ensamblaje capa por capa de polifenol oxidasa y quitosano en el Electrodo de Carbono vítreo. *Electrochim. Acta.* 50 (2005), p. 2865.
- [44] Nistor, C., Emnéus, J., Gorton, L., y Ciucu, A. Mejora de la Estabilidad y la selectividad Alterada de tirosinasa basado Electrodo de grafito Para La Deteccion de Compuestos fenólicos. *Anal. Chim. Acta.* (1999), 387 p. 309.
- [45] Sanz, V., Mena, M., González, A., Yañez, P., y Pingarrón, J. Desarrollo biosensor basado en la tirosinasa de oro nanopartículas modificadas en Electrodo de carbón vítreo. Aplicación a la medición de un índice de polifenoles en los vinos bioelectrochemical. *Anal. Chim. Acta.* (2005), 528 p. 1.
- [46] Li, Y., Liu, Z., Yang, Y., Shen, G. and Yu, R. Un biosensor fenol-Mediador Gratuito basado en la inmovilización de la tirosinasa una nanopartículas de ZnO. *Anal. Biochem.* (2006), 349 p. 33.
- [47] Védrine, C., Fabiano, S., and Tran, C. Amperometric tyrosinase based biosensor using an electrogenerated polythiophene film as an entrapment support. *Talanta.* (2003), 59 (3): 535-544.

- [48] Wang, B., Zhang, J., and Dong, S. Silica sol-gel composite film as an encapsulation matrix for the construction of an amperometric tyrosinase-based biosensor. *Biosens. Bioelectron.* (2000), 15 (7-9): 397-402.
- [49] Freire, R., Duran N., and Kubota L.T. Electrochemical biosensor-based devices for continuous phenols monitoring in environmental matrices. *J. Brazil Chem. Soc.* (2002), 13 (4): 456-462.
- [50] Freire, R., Thongngamdee, S., Durán N., Wang, J. and Kubota, L. Mixed enzyme (laccase/tyrosinase) based remote electrochemical biosensor for monitoring phenolic compounds. *Analyst.* (2002), 127: 58-261.
- [51] Haghghi B., Gorton L., Ruzgas T and Jonson J. Characterization of graphite electrodes modified with laccase from *Trametes versicolor* and their use for bioelectrochemical monitoring few phenolic compounds in flor injection analysis. *Anal. Chim Acta.* (2003), 487 (1): 3-14.
- [52] Merrington, G., Winder, L., Parkinson, R., and Redman, M. Pesticides, en: *Agricultural Pollution: Environmental Problems and Practical Solutions.* (2005), Ed. Taylor & Francis Group, Londres.
- [53] Katagi, T. Bioconcentration, bioaccumulation, and metabolism of pesticides in aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* (2010), 204, 1-132.
- [54] Anne, M., Hansen, Treviño, L., Márquez, H., Villada, M., González, L., Guillén, A., y Hernández, A. Atrazina: UN HERBICIDA POLÉMICO, *Rev. Int. Contam. Ambie.* (2013), 29 65-84.
- [55] Ficha técnica de herbicida atrazina [en línea], [fecha de consulta: 6 Noviembre 2014]. Disponible en: <<http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/atrazina.pdf>>
- [56] United States Environmental Protection Agency (US EPA).1983. Guidance for the reregistration of pesticide products containing atrazine as the active ingredient. PB84-149541. Washington, DC, EE.UU.
- [57] Sánchez, J., and Sánchez, M. Los plaguicidas. Adsorción y evolución en el suelo. Temas monográficos, 14. I.O.A.T.O. Centro de Edafología y Biología Aplicada. Excma. (1984), Diputación Provincial de Salamanca.
- [58] Doll, J. Los Herbicidas: modo de actuar y síntomas de toxicidad. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. (1982) Cali.

- [59] Golla, V., Nelms J., Taylor R. y Mishra S. Pesticide concentrations in drinking water from farm homes: Variation between community water supply and wellwater. *J. Environ. Sci. Eng.* (2011), 5, 955-961.
- [60] SAGARPA. (2007). Anteproyecto de Modificación de la Norma Oficial Mexicana NOM-032-FITO-1995. Por la que se establecen los requisitos y especificaciones fito-sanitarios para la realización de estudios de efectividad biológica de plaguicidas agrícolas y su dictamen técnico. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. [en línea]. Disponible en: [http://www.cofemermir.gob.mx/mir/uploadtests/10046.59.59.1.NOM-%20032-FITO-1995%20\(MODIF.\).Doc](http://www.cofemermir.gob.mx/mir/uploadtests/10046.59.59.1.NOM-%20032-FITO-1995%20(MODIF.).Doc). (Último acceso mayo 17, 2014).
- [61] SIAVI (2012). Secretaría de Economía. México. (Sistema de Información Arancelaria Vía Internet). [En línea]. Disponible en: <http://www.siavi.economia.gob.mx/>. (Último acceso mayo 23, 2014).
- [62] WHO. Guidelines for drinking-water quality. World Health Organization. Ginebra, Suiza. 4a ed. (2011).
- [63] USEPA. 2003. Interim Reregistration Eligibility Decision for Atrazine. United States Environmental Protection Agency. Washington, D.C. 285.
- [64] EPA. (2006) Triazine Cumulative Risk Assessment and Atrazine, Simazine, and Propazine Decisions. [En línea]. Disponible en: http://www.epa.gov/oppsrrd1/cumulative/triazine_fs.htm
- [65] De la Cruz, M.; Palero, J.M.; Lucena Rodríguez, R.; Cárdenas Aranzana, S.; Valcárcel, M. *Rev. Esp. Salud Pública.* (2012), 86, 21 - 35.
- [66] Barchanska, H., and Baranowska, I. Procedures for Analysis of Atrazine and Simazine in Environmental Matrices. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume* 200. (2009). DOI: 10.1007/978-1-4419-0028-9_3.
- [67] Tran, A.T.K.; Hyne, R.V. and Doble, P. Determination of commonly used polar herbicides in agricultural drainage waters in Australia by HPLC. *Chemosphere.* (2007), 67, 944-953.
- [68] Katsumata, H.; Kaneco, S.; Suzuki, T., and Ohta, K. Determination of atrazine and simazine in water samples by high-performance liquid chromatography after preconcentration with heat-treated diatomaceous earth. *Anal. Chim. Acta.* (2006), 577, 214-219.

- [69] Zhou, Q., Wang, W.D., Xiao, J., Wang, J., Liu, G., Shi, Q., and Guo, G. Comparison of the enrichment efficiency of multiwalled carbon nanotubes, C₆₀ silica, and activated carbon as the adsorbents for the solid phase extraction of atrazine and simazine in water samples. *Microchim. Acta.* (2006), 152, 215-224.
- [70] Wittmann, C., and Hock, B. Analysis of atrazine residues in food by an enzyme immunoassay. *J Agric Food Chem.* (1993), 41: 1421-1425.
- [71] Núñez, O., Moyano, E., and Galceran, M. LC-MS/MS analysis of organic toxics in food. *Trends Anal Chem.* (2005), 24: 683-703.
- [72] Ma, W., Jiang, G., and Cai, Z. Multiresidue analysis of atrazine, diuron and their degradation products in sewage sludge by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Int. J. Env. Anal. Chem.* (2005), 85, 1117-1125.
- [73] Tompkins, B. Determination of Atrazine and Four Organophosphorous Pesticides in Ground Water Using Solid Phase Microextraction (SPME) Followed by Gas Chromatography with Selected-Ion Monitoring. *J. Chromatogr. A.* (2002), 972, 183-194.
- [74] Sabik, H., Cooper, S., Lafrance, P., and Fournier, J. Determination of atrazine, its degradation products and metolachlor in runoff water and sediments using solid-phase extraction. *Talanta.* (1995), 42: 717-724.
- [75] Lacassie, E., Marquet, P., Gaulier, J., Dreyfuss, M., and Lachâtre, G. Sensitive and specific multiresidue methods for the determination of pesticides of various classes in clinical and forensic toxicology. *Forensic Sci Int.* (2001), 121: 116-125.
- [76] Lentza-Rizos, C., Avramides, E., and Cherasco, F., Low-temperature clean-up method for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. *J Chromatogr A.* (2001), 912: 135-142.
- [77] Mendaš, G., Drevenkar, V., and Zupančič-Kralj, L. Solid-phase extraction with styrene-divinylbenzene sorbent for high-performance liquid or gas chromatographic determination of urinary chloroand methylthiotriazines. *J Chromatogr A.* (2001), 918: 351-359.
- [78] Babi S, Petrovi M, and Kaštelan-Macan M. Ultrasonic solvent extraction of pesticides from soil. *J Chromatogr A.* (1998), 823: 3-9.

- [79] Carabias-Martinez R. Comparison of a non-aqueous capillary electrophoresis method with high performance liquid chromatography for the determination of herbicides and metabolites in water samples. *J Chromatogr A*. (2006), 1122: 194-201.
- [80] Ojeda, C., and Rojas, F. Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. *Anal Chim Acta*. (2004), 518: 1-24.
- [81] Mallat, E., Barcelo D, Barzen C, Gaultitz G, and Abuknesha R. Immunosensors for pesticide determination in natural waters. *Trends Anal Chem*. (2001), 20: 124-132.
- [82] Reviejo, A.J.; Pingarron, J.M. *Anales de la Real Sociedad Española de Química* (2000), 2, 5-15.
- [83] Besombes, J., Cosnier, S., Labbé, P., and Reverdy, G. A biosensor as warning device for the detection of cyanide, chlorophenols, atrazine and carbamate pesticides. *Anal. Chim. Acta*. (1995), 311, 255-263.
- [84] McArchie, F., and Persaud, K. Development of an enzyme-based biosensor for atrazine detection. *Analyst*. (1993), 118, 419-423.
- [85] Wang, J., Nascimento, V., Kane, S., Rogers, K., Smith, M., and Angnes, L. Screen-printed tyrosinase-containing electrodes for the biosensing of enzyme inhibitors. *Talanta*. (1996), 43, 1903-1907.
- [86] Yu, Z., Zhao, G., Liu, M., Lei, Y., and Li, M. Fabrication of a Novel Atrazine Biosensor and Its Subpart-per-Trillion Levels Sensitive Performance. *Environ. Sci. Technol*. (2010), 44, 7878–7883.
- [87] Majidi, M.R., Asadpour-Zeynali, K., and Gholizadeh, S. J. Sol-gel-derived Biosensor Based on Plant Tissue: The Inhibitory Effect of Atrazine on Polyphenol Oxidase Activity for Determination of Atrazine. *Chin. Chem. Soc*. (2008), 55, 522-528.
- [88] Moreno, H., León, E., Arribas, L., and Polo, L. Non-aqueous flow-injection determination of atrazine by inhibition of immobilized tyrosinase *Anal. Chim. Acta*. (1998), 362 187-192.
- [89] Campanella, L., Bonanni, A., Martini, E., Todini, N., and Tomassetti, M. Determination of triazine pesticides using a new enzyme inhibition tyrosinase OPEE operating in chloroform. *Sensors and Actuators B*. (2005), 111-112, 505-514.

- [90] Nourmohammadi, F., Gloabi, S., and Saadnia, A. Electrochemical synthesis of organic compounds: 1. Addition of sulfinic acids to electrochemically generated o- and p-benzoquinones. *Electroanal. Chem.* (2002), 529, 12-19.
- [91] Nematollahi, D., Tammari, E., Sharifi, S., and Kazemi, M. Mechanistic study of the oxidation of catechol in the presence of secondary amines by digital simulation of cyclic voltammograms. *Electrochim. Acta.* (2004), 49, 591-595.
- [92] Vidal, J., Bonel, L., and Castillo, J. A Modulated Tyrosinase Enzyme-Based Biosensor for Application to the Detection of Dichlorvos and Atrazine Pesticides. *Electroanalysis.* (2008), 20, 865-873.
- [93] Mazzei, F., Botrè, F., Lorenti, G., Simonetti, G., Porcelli, F., Scibona, G., and Botrè, C. Plant tissue electrode for the determination of atrazine. *Anal. Chim. Acta.* (1995), 316 79-82.
- [94] Estrada, P., Sánchez, R., Acebal, C., Arche, R., and Castellón, M. Characterization and optimization of immobilized polyphenol oxidase in low-water organic solvents. *Biotechnol Biotechnol. Appl. Biochem.* (1991), 14, 12-20.
- [95].Estrada, P., Baroto, W., Castellón, M., Acebal, C., and Arche, R. Temperature effects on polyphenol oxidase activity in organic solvents with low water content. *Chem. Tech. Biotechnol.* (1993), 56 59-65.
- [96] Ricci, R., and Palleschi, G. Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. *Biosens. Bioelectron.* (2005), 21, 389-407.
- [97] Anh, T., Dzyadevyhc, S., Van, M., Jaffrezic, N., Duc, N., and Chovelon, J. Conductometric Tyrosinase Biosensor for the Detection of Diuron, Atrazine and Its Main Metabolites. *Talanta.* (2004), 63, 365-370.
- [98] Barchańska, H., and Baranowska, I. Procedures for analysis of atrazine and simazine in environmental matrices In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*; Whitacre, D.M.; Ed.; *Springer Science Business Media.* (2009), 200, 53-84.
- [99] Grennan, K.; Strachan, G.; Porter, A.J.; Killard, A.J.; Smyth, M.R. atrazine analysis using an amperometric immunosensor based on single-chain antibody fragments and regeneration-free multi-calibrant measurement. *Anal. Chim. Acta.* (2003), 500, 287-298.

- [100] Campanella, L., Eremin, S., Lela, D., Martini, E., and Tomassetti, M. Reliable new immunosensor for atrazine pesticide analysis. *Sensors and Actuators B*. (2011), 156, 50-62.
- [101] Helali, S.; Martelet, C., Abdelghani, A.; Maaref, M.A.; Jaffrezic-Renault, N. A disposable immunomagnetic electrochemical sensor based on functionalized magnetic beads on gold surface for the detection of atrazine. *Electrochim. Acta*. (2006), 51, 5182-5186.
- [102] Ionescu, R., Gondran, C., Bouffier, L., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., and Cosnier, S. Label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of atrazine. *Electrochim. Acta*. (2010), 55, 6228-6232.
- [103] Pichetsurthorn, P., Vattipalli, K., and Prasad, S. Nanoporous impedimetric biosensor for detection of trace atrazine from water samples. *Biosens. Bioelectron*. 2012, 32, 155-162.
- [104] Azcón, J, Valera, E., Rodríguez, A., Barranco, A., Alfaro, B., Sánchez, F., and Marco, M. An impedimetric immunosensor based on interdigitated microelectrodes (IDμE) for the determination of atrazine residues in food samples. *Biosens. Bioelectron*. (2008), 23, 1367-1373.
- [105] Amistadi, M., Hall, J., Bogus, R., and Mumma, O. Comparison of gas chromatography and immunoassay methods for the detection of atrazine in water and soil. *J. Environ. Sci. Health, B*. (1997), 32, 845-860.
- [106] Franek, M., Kolar, V., Eremin, S. Enzyme immunoassay for s-triazine herbicides and their application in environmental and food analysis. *Anal. Chim. Acta*. (1995), 311, 349-356.
- [107] Zacco, E., Galve, R., Marco, M., Alegret, S., and Pividori, M. Electrochemical biosensing of pesticide residues based on affinity biocomposite platforms. *Biosens. Bioelectron*. (2007), 22, 1707-1715.
- [108] Ricci, F., Adornetto, G., and Palleschi, G. 2010. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. *Electrochim. Acta*. (2012), 84, 74-83.
- [109] Fernandez, M., Stiene, R., Kast, M., and Luque de Castro, U. Bilitewski, Application of screen-printed electrodes as transducers in affinity flow-through sensor systems. *Biosensors & Bioelectronics*. (1998), 13, 1107-1115.

- [110] Parellada, J., Narváez, A., López, M., Dominguez, E., Fernández, J., Pavlov, V., and Katakis, I. Amperometric Immunosensors and Enzyme Electrodes for Environmental Applications. *Anal. Chim. Acta.* (1998), 362, 47-57.
- [111] Bäumner, A., and Schmid, R., Development of a new immunosensor for pesticide detection: a disposable system with liposome-enhancement and amperometric detection. *Biosens. Bioelect.* (1998), 13, 519-529.
- [112] López, M., Ortega, F., Domínguez, E., and Katakis, I. Electrochemical immunosensor for the detection of atrazine. *J. Mol. Recog.* (1998), 11, 178-181.
- [113] Turner, A., Karube, I., and Wilson, G. (1987): *Biosensors: Fundamentals and Applications.* Oxford University Press, Oxford. 770p.
- [114] Keusgen, M. Biosensors: new approaches in drug discovery *Naturwissenschaften.* (2002), 89, 433-444.
- [115] 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.
- [116]. 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.
- [117] Wolfbeis O.S. Fiber-Optic chemical sensors and biosensors. *Anal. Chem.* (2004), 76, 3269-3284.
- [118] Matsumoto N., Chen X., and Wilson G.S. Fundamental studies of glucose oxidase deposition on a Pt electrode. *Anal. Chem.* (2002), 74, 362-367.
- [119] Nivens, D.A., and Conrad, D.W. Photoactive poly(ethylene glycol) organosilane films for site-specific protein immobilization. *Langmuir.* (2002), 18, 499-504.
- [120] Bilbao, A., Valdés, L., and Blanco, Y. Inmovilización covalente de glucosa oxidasa y peroxidasa. *Rev Cubana Farm.* (2000), 34(2):108-12.
- [121] Reisfeld R., and Saraidarov T. Innovative materials based on sol-gel technology. *Optical Materials.* (2004), 28, 64-70.

- [122] Thévenot, D., Toth, K., Durst, A., Wilson, G. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.* (2001), 16, 121-131.
- [123] Whang D., Jin, S., and Lieber, C. Large-scale hierarchical organization of nanowire arrays for integrated nanosystems. *Nanoletters.* (2003), 3, 1255-1259.
- [124] Sauerbrey G. The use of quartz crystal oscillator for weighing thin layers and for microweighing applications. *Z. Phys. Chem.* (1959), 155, 206.
- [125] Fritz, J., Baller, M., Lang, H., Rothuizen, H., Vettiger P., Meyer, E., Güntherodt, H., Gerber C., Gimzewski, J. Translating biomolecular recognition into nanomechanics. *Science.* (2000), 288, 316-318.
- [126] Wee, K., Kang, G., Park, J., Kang, Y., Yoon, D., Park, H., and Kim, S. Novel electrical detection of label-free disease marker proteins using piezoresistive self-sensing microcantilevers. *Biosens. Bioelectron.* (2005), 20, 1932–1938.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. INSTRUMENTOS

▪ Amperometría

Las medidas amperométricas para el biosensor con membrana desechable de PPO, se realizaron con una unidad amperométrica PRG-DEL Tacussel adecuadamente modificado conectado a una interfase de supresión de ruido de laboratorio y equipado con el software apropiado de Windows para la adquisición y tratamiento de datos. El potencióstato se conectó a una celda de electrolisis convencional de acrílico (31 mL de volumen) a una temperatura de 25°C, pH 6.5 (solución tampón fosfato 0.1 mol L⁻¹) con una sonda de oxígeno tipo Clark.

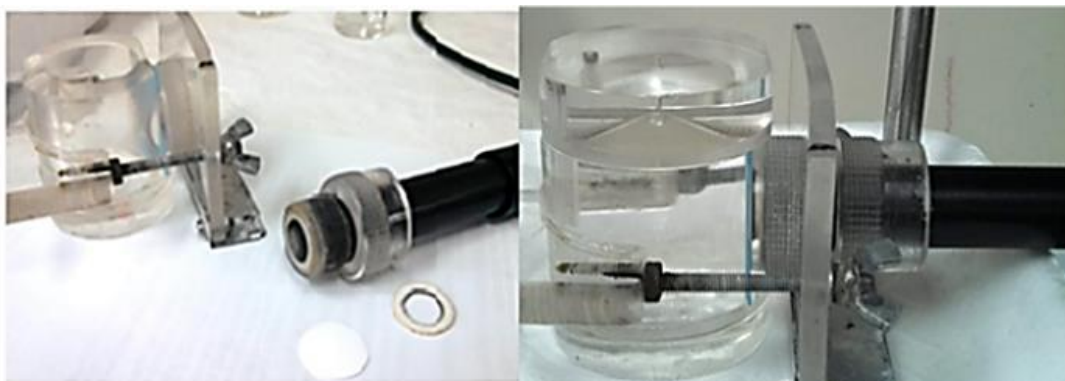


Figura 7. Detalle de sonda de oxígeno tipo Clark adaptada a celda de electrolisis convencional de acrílico.

Los estudios electroquímicos del biosensor basado en PAD se realizaron por medio de un analizador electroquímico Instrumentos CH modelo 440A (CH Instruments Inc., EE.UU.), y una celda de electrólisis de tipo convencional (10 mL de volumen). Un alambre de Pt se utilizó como electrodo auxiliar y Ag, AgCl/KCl(sat) como referencia. El electrodo de grafito espectralmente puro (Ringsdorf Werke, Alemania, 3 mm de diámetro) con una velocidad de rotación de 900 rpm, se desempeñó como electrodo de trabajo.

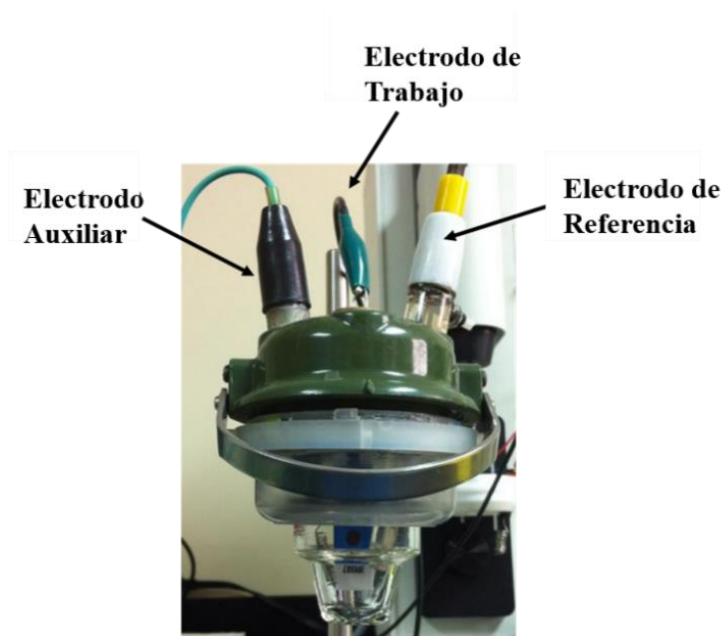


Figura 8. Celda electroquímica.

▪ QCMB

Las medidas electroquímicas en combinación con mediciones QCM (microbalanza de cristal de cuarzo) se realizaron utilizando el modelo CHI400A de la serie electroquímica microbalanza de cristal de cuarzo (EQCM). El modelo incluye un potenciostato/galvanostato CHI440A, una caja externa con el circuito oscilador, y la celda QCM. La densidad de los cristales de cuarzo recubiertos de oro (diámetro de cristal de 13.7 mm, y 5.11 mm el diámetro del disco de oro) fue 2.648 g cm^{-3} , y un módulo de cizallamiento de $2.947 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$. Para el cristal 8 MHz, el cambio de la masa es 0.14 ng para el cambio de frecuencia de 0.1 Hz. El procedimiento de limpieza QCM consistió en sumergir el cristal durante 5 minutos en una solución 1:1:5 de H_2O_2 (30%), NH_3 (25%), y agua desionizada calentada a una temperatura de 75°C , enjuagado con agua desionizada, y secado. El electrodo de oro del EQCM se utilizó como un electrodo de trabajo. Alambre de Pt se utilizó como electrodo auxiliar y Ag, AgCl/KCl(sat) como referencia.

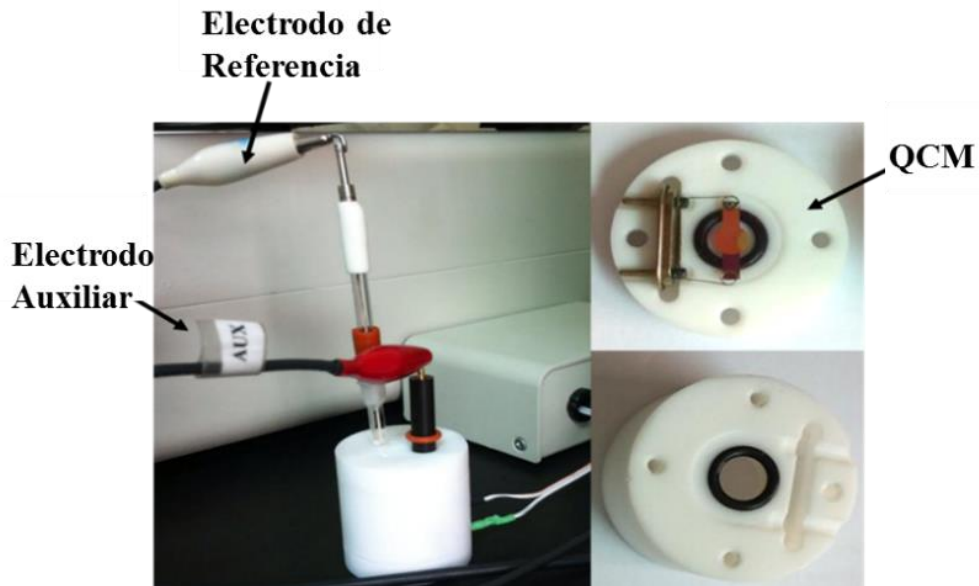


Figura 9. Celda EQCM.

- **IR**

La espectrofotometría infrarroja IR se utilizó para la caracterización de las membranas enzimáticas con cada una de las mezclas soportes. Para el estudio se utilizó un espectrofotómetro RAYLEIGH WQF-510A FTIR en el intervalo de $4000-500\text{ cm}^{-1}$. Se prepararon pastillas de KBr 1.0%, pesando 100 mg de KBr y 1 mg de las membranas trituradas con micropartículas. La mezcla se realizó con un mortero de agar. Posteriormente se presionó la mezcla en un troquel especial entre 700 y 1000 kg/cm^2 hasta obtener un disco transparente.



Figura 10. Espectrofotómetro RAYLEIGH WQF-510A FTIR.

▪ Microscopia Óptica

Un microscopio óptico se utilizó con el fin de observar la porosidad y características superficiales de las membranas enzimáticas preparadas con hidrogeles. Para ello, se saturaron las membranas de celulosa con hidrogel y se depositó cierta cantidad de mezcla soporte (enzima/hidrogel) previamente preparadas sobre una caja Petri y se dejaron secar a temperatura ambiente. El estudio se realizó con un microscopio XJP-H100 (1000x magnificación), equipado con una cámara digital 9MP MU900 conectada a un PC con AmScope Toup View.

▪ UV-VIS

La espectrofotometría de absorción UV-VIS se utilizó con el fin de determinar la actividad enzimática de la PPO.



Figura 11. Espectrofotómetro UV-VIS Evolución Thermo Scientific 605.

▪ 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 de 10 μL , 25 μL y 50 μL .

3.2 REACTIVOS

3.2.1. Preparación de disoluciones

Las soluciones stock de los compuestos fenólicos 1 mol L^{-1} . Se obtuvieron disolviendo la cantidad necesaria del fenol correspondiente (catecol, fenol, dopamina) en agua desionizada y se almacenaron a 4°C en oscuridad. Las soluciones con concentraciones más bajas se prepararon por dilución de esta. La atrazina se disolvió en metanol. Los hidrogeles de gelatina 0.2%, 0.6% 0.8% y 1.0% m/v, se obtuvieron disolviendo el polvo de gelatina en agua desionizada a 60°C para facilitar el proceso de disolución. El alginato de sodio 0.8% m/v se disolvió en agua destilada, y el quitosano 0.8% m/v (peso molecular medio, Sigma) se obtuvo por disolución de la sustancia en CH_3COOH 0.1 mol L^{-1} . El catecol, fenol, dopamina y atrazina, reactivos de grado analítico fueron suministrados por Sigma y fueron usados sin ningún pretratamiento de purificación. La PPO (EC 1.14.18.1, 1.000 U mg^{-1}) fue suministrada por Spectrum Chemical, USA. Todos los experimentos fueron realizados en disolución tampón de fosfato (PBS) 0.1 mol L^{-1} pH 6.5, preparada disolviendo las cantidades adecuadas de las sales dipotásica K_2HPO_4 y monopotásica KH_2PO_4 . Ajustando posteriormente el pH con NaOH ó H_3PO_4 . El valor de pH elegido corresponde al pH óptimo de la PPO.

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.

3.3.1 Evaluación de la actividad enzimática

La actividad de la PPO se determinó por el método espectrofotométrico [128] usando catecol 0.06 mol L^{-1} como sustrato. La actividad de la enzima se midió en la enzima libre y en la inmovilizada en cantidades equivalentes, considerándose la actividad de la PPO libre el 100%. Para el ensayo con la enzima libre se agregaron $950 \mu\text{L}$ de solución PBS 0.1 mol L^{-1} , pH 7.0, $10 \mu\text{L}$ solución enzimática 1.0 % m/v y $40 \mu\text{L}$ de sustrato. Para la medición de la actividad de la enzima inmovilizada se introdujo

la membrana preparada con la enzima en una cubeta espectrofotométrica, se agregaron 960 μL de solución PBS 0.1 mol L^{-1} , pH 7.0 y 40 μL de sustrato.

La velocidad de formación de *o*-quinona se evaluó por medidas espectrofotométricas usando un espectrofotómetro UV-VIS Evolución Thermo Scientific 605 ($\epsilon_{\text{quinona}}=1450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) con agitación constante (120 rpm) a 25°C con lecturas absorbancia a $\lambda=400 \text{ nm}$ por 3 minutos cada 3 s. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de *o*-quinona por minuto a partir de catecol en condiciones del ensayo. La siguiente fórmula se utiliza para calcular la actividad de la enzima:

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

Donde: $\Delta A/\Delta \tau$ es el cambio de la absorbancia con el tiempo, min^{-1} ; ϵ es el coeficiente de extinción molar, $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; l es la longitud del recorrido de la luz, normalmente 1 cm; V_c es el volumen de la celda espectrofotométrica, L; V es el volumen de la muestra, mL; C es la concentración de la proteína, mg mL^{-1} .

3.3.2 PREPARACIÓN DEL BIOSENSOR CON MEMBRANA DESECHABLE DE PPO

El biosensor desarrollado para las mediciones de compuestos fenólicos consistió en una sonda de oxígeno tipo Clark como transductor y la enzima PPO inmovilizada en una membrana desechable, como un elemento biológico de detección.

3.3.2.1 Preparación del sistema de inmovilización

- **Membranas enzimáticas desechables**

En este trabajo se realizó la inmovilización de la enzima PPO por atrapamiento en hidrogel. El atrapamiento, de gran sencillez desde el punto de vista experimental, requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos como ventaja adicional, la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura. Se han utilizado tres matrices diferentes, quitosano, alginato de sodio y gelatina como sistemas de inmovilización enzimática. Las membranas enzimáticas con características

reproducibles fueron obtenidas variando la cantidad de enzima inmovilizada y la cantidad de hidrogel, siempre con la misma concentración de enzima.

La obtención de las membranas enzimáticas se logró mediante por la técnica de recubrimiento por gota (“drop-coating”) a través de un filtro de celulosa *Sartorius* con diámetro de poro 0.22 μm . El recubrimiento por gota consiste en la formación de una película delgada mediante el depósito de gotas consecutivas de una solución en la superficie de la matriz y permitiendo que el disolvente se evapore (Figura 12). Todos los derivados se enjuagaron en PBS 0.1 mol L⁻¹ pH 6.5 a 120 rpm durante 15 min para eliminar las moléculas de enzima débilmente atrapadas. La membrana de la enzima obtenida se sujeta en la parte frontal plana de la sonda de oxígeno.

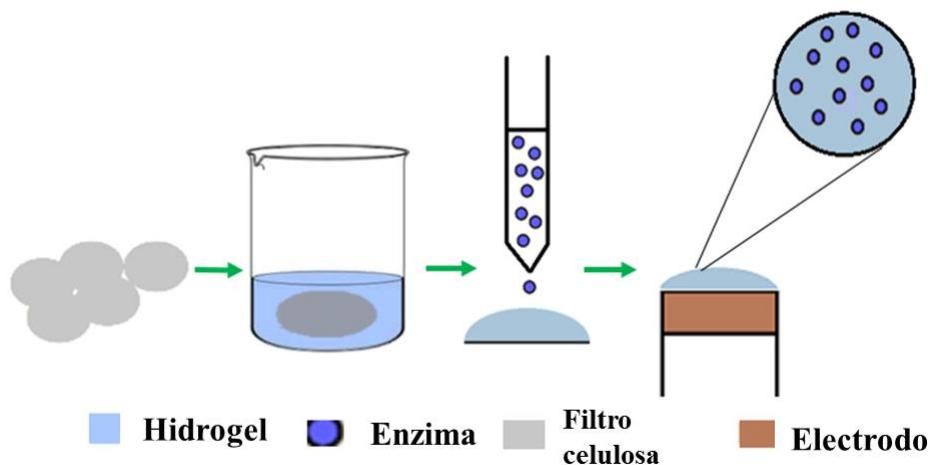


Figura 12. Método de inmovilización de enzimas mediante atrapamiento en hidrogel.

a) Membrana enzimática preparada con Quitosano

Inicialmente se preparó un hidrogel de quitosano al 0.8% (m/v). El filtro de celulosa se saturó con el hidrogel quitosano por 3 minutos y se dejó secar al aire a temperatura ambiente. Se realizó una mezcla soporte de relación enzima: hidrogel (1:1) con 30 μL de solución enzimática 1% (m/v) y 30 μL de hidrogel de quitosano 0.8% (m/v). Se inyectaron 40 μL de mezcla soporte sobre el filtro de celulosa hasta su secado. La película del hidrogel de quitosano, que contiene la PPO atrapada se formó dentro de 30 minutos a temperatura ambiente.

b) Membrana enzimática preparada con alginato de sodio

Se preparó una solución de alginato 0.8% (m/v). El filtro de celulosa se saturó con el hidrogel de alginato 0.8% (m/v) por 3 minutos y se dejó secar al aire a temperatura ambiente. El filtro de celulosa seco se sumergió en solución de BaCl_2 0.1 mol L^{-1} y se dejó reaccionar durante 10 minutos con agitación manual suave, para la formación del gel. Esa película se dejó secar al aire a 25°C por 30 minutos aproximadamente. Se realizó una mezcla soporte de relación enzima: hidrogel de alginato (1:1) con 30 μL de solución enzimática 1% (m/v) y 30 μL de hidrogel alginato de sodio. Se inyectaron 40 μL de mezcla soporte sobre la membrana polimérica hasta su secado. Luego se sumergió nuevamente en solución de BaCl_2 0.1 mol L^{-1} , se dejó reaccionar durante 10 minutos hasta su final secado a temperatura ambiente.

c) Membrana enzimática preparada con gelatina

Se preparó una solución de gelatina de 0.8% (m/v) en agua destilada. El filtro de celulosa se saturó con el hidrogel de gelatina 0.8% (m/v) por 3 minutos y se dejó secar al aire a temperatura ambiente. Se realizó una mezcla soporte de enzima/gelatina, de relación (1:1) mezclando 30 μL de solución enzimática 1% (m/v) y 30 μL de solución gelatina 0.8% (m/v). Se inyectaron 40 μL de mezcla soporte se depositaron sobre la membrana polimérica hasta su posterior secado. La película del hidrogel de gelatina, que contiene la PPO atrapada se formó dentro de 30 min a temperatura ambiente como se ilustra en la figura 13.

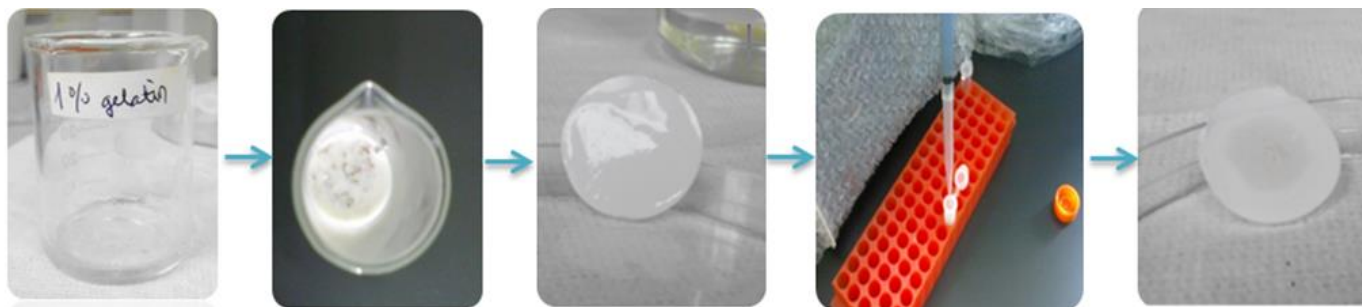


Figura 13. Preparación membranas enzimáticas desechables (atrapamiento).

3.3.2.2 Elaboración de Sonda de Oxígeno

La sonda de oxígeno tipo Clark incorpora un cátodo de oro, un ánodo de plata y un electrodo de referencia de Ag, AgCl(sat).

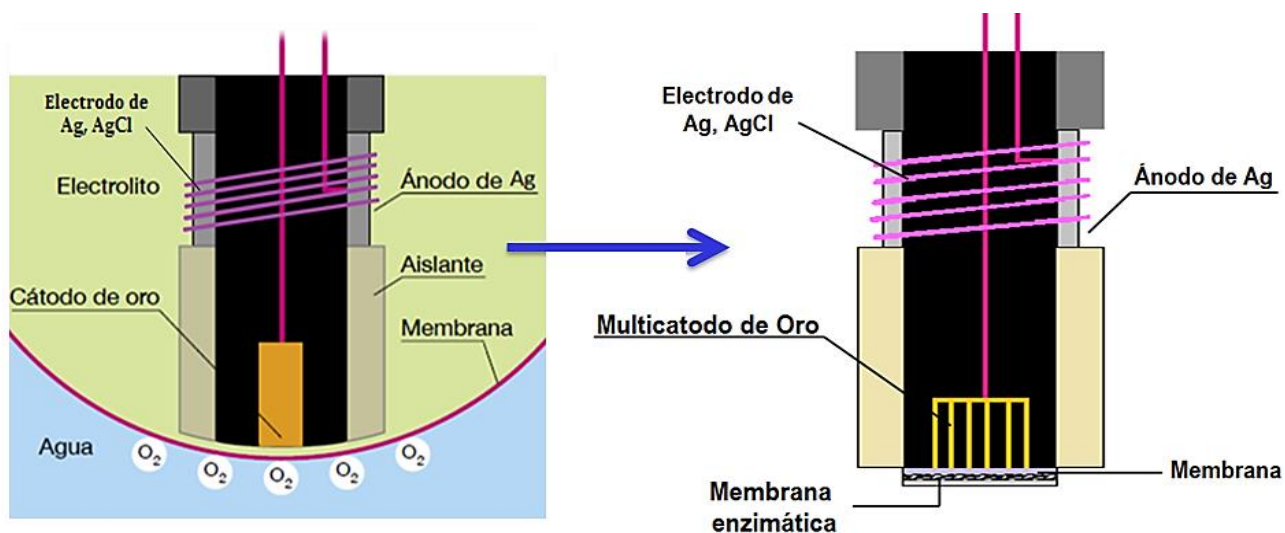


Figura 14. a) Sonda tipo Clark comercial. b) Sonda tipo Clark modificada.

Con el fin de satisfacer los requisitos específicos de los sensores enzimáticos, la sonda de oxígeno fue modificada, en comparación con las sondas de oxígeno comerciales (Figura 14). En primer lugar, la parte frontal esférica convencional fue reemplazada por una plana. Esta construcción original garantiza un buen contacto con la membrana enzimática a través de la superficie de la sonda [129-131]. En segundo lugar, el cátodo de disco pequeño ha sido sustituido por un multicátodo de oro dislocado de manera uniforme sobre toda la superficie de la parte delantera plana. Por lo tanto, las limitaciones debidas a la difusión de las moléculas de O_2 de la periferia de la membrana de polímero al cátodo fueron eliminados.

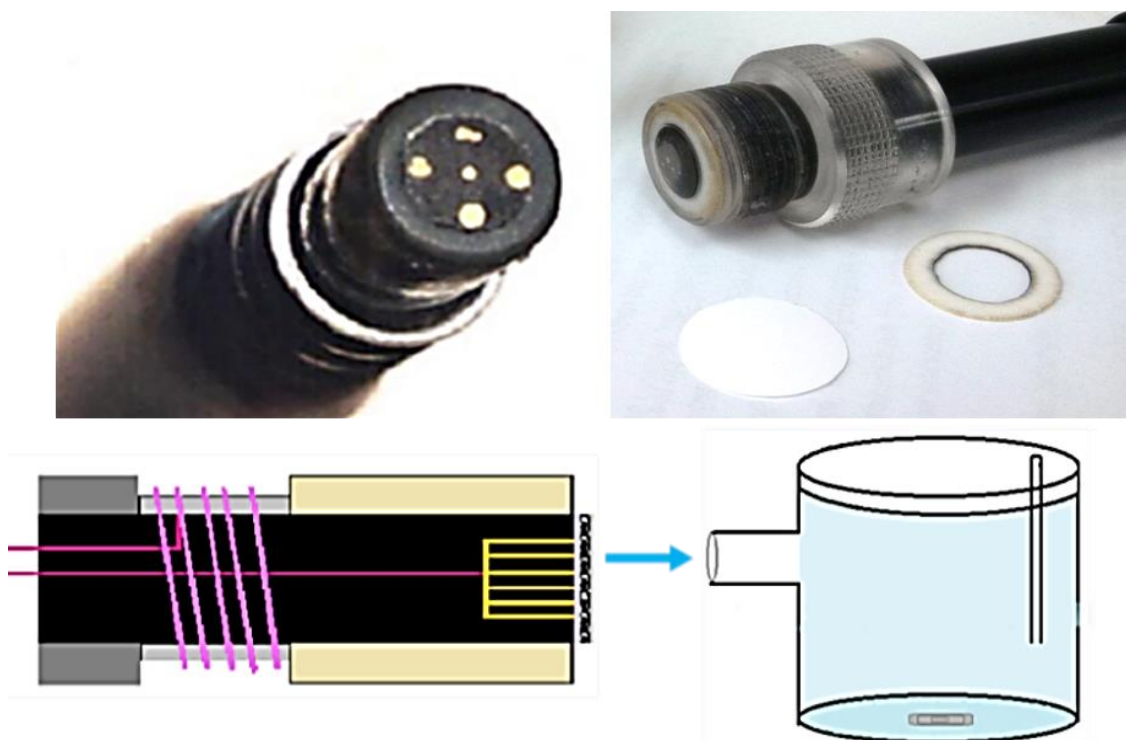


Figura 15. Diseño del biosensor mediante atrapamiento.

3.3.2.3 Obtención de los amperogramas

Para realizar las medidas amperométricas, se añadieron 31 mL de una disolución tampón de fosfato 0.1 mol L^{-1} y pH 6.5 a la celda electroquímica y se estabilizó el sistema al potencial de trabajo hasta obtener una línea base recta. Se aplica un potencial de -0.7 V al electrodo de trabajo (biosensor) ya que este potencial permite medir la reducción del oxígeno, que no ha sido consumido en la reacción enzimática, con el compuesto fenólico. Una vez estabilizada la corriente, se añade a la celda electroquímica una cantidad conocida de compuesto fenólico que genera una disminución de la intensidad de corriente, como consecuencia de la reducción de oxígeno, hasta llegar al estado estacionario donde la intensidad de corriente se mantiene constante. Se realiza una nueva adición de sustrato que da lugar a otra disminución en la intensidad de corriente, alcanzando un nuevo estado estacionario. Así sucesivamente hasta que se llega a la concentración de saturación de la enzima, situación en la que todos sus centros activos están unidos a moléculas de sustrato. La intensidad de corriente generada por la reducción del oxígeno tendrá una relación directa con la concentración de compuesto fenólico. Este proceso se refleja en la Figura 16.

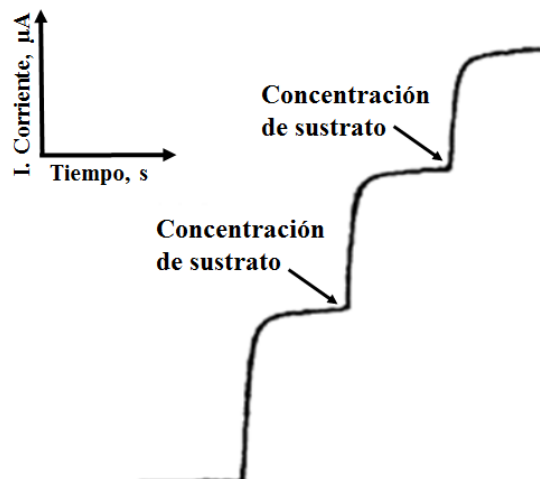


Figura 16. Medida de la intensidad de corriente en condiciones de estado estacionario.

3.3.3 PREPARACIÓN DE BIOSENSOR BASADO EN AMPEROMETRÍA DE PULSOS (PAD)

A continuación se describen los procedimientos experimentales relacionados con la preparación del biosensor basado en amperometría de pulsos para la determinación de compuestos fenólicos y el herbicida atrazina, incluyendo la preparación de del sistema de inmovilización de la enzima, así como la realización de los ensayos correspondientes.

3.3.3.1 Preparación de sistema de inmovilización enzimática

En este trabajo se realizó la inmovilización de la enzima PPO por atrapamiento en un hidrogel de quitosano mediante la técnica recubrimiento por rotación (“spin-coating”) Figura 17. El recubrimiento por rotación implica dispersar con precisión un líquido sobre un sustrato y a continuación girar para lograr una película uniforme. Se podría esperar que el recubrimiento por rotación permita la obtención de una capa de bioconocimiento uniforme y reproducible.

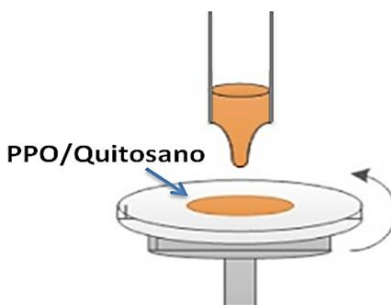


Figura 17. Recubrimiento por rotación (“spin-coating”).

Se realizó una mezcla soporte de relación enzima: hidrogel de quitosano (1:1) con 10 μL de la solución enzimática 1% (m/v) y 10 μL de un hidrogel de quitosano 0.1% (m/v). Se depositaron 5 μL de mezcla soporte sobre la superficie del electrodo mediante la técnica recubrimiento por rotación (“spin-coating”). La película del hidrogel de quitosano, que contiene la PPO atrapada se formó durante de 60 minutos a temperatura ambiente, después de dejar secar al aire.



Figura 18. Inmovilización de la enzima PPO sobre electrodo de grafito.

Se realizó el procedimiento de entrecruzamiento del hidrogel de quitosano por deposición de 5 μL de glutaraldehído 2.5% sobre la película formada y permitiendo que reaccione por 10 min (Figura 19). El exceso de glutaraldehído se eliminó por lavado del electrodo modificado con PBS pH 6.5. Por último, se formó una segunda capa de quitosano-enzima atrapada siguiendo el mismo procedimiento descrito.

La reacción se da entre el grupo aldehído que forma un enlace imina covalente con los grupos amino primarios del quitosano, debido a la resonancia establecida con enlaces dobles adyacentes vía reacción de Schiff. El grado de entrecruzamiento es el principal parámetro que influye en las propiedades de resistencia mecánica, hinchamiento y difusión, además de brindar una estructura porosa. Esta se encuentra influenciada por ciertos parámetros como la concentración del agente entrecruzante, peso molecular y grado de desacetilación del quitosano y temperatura

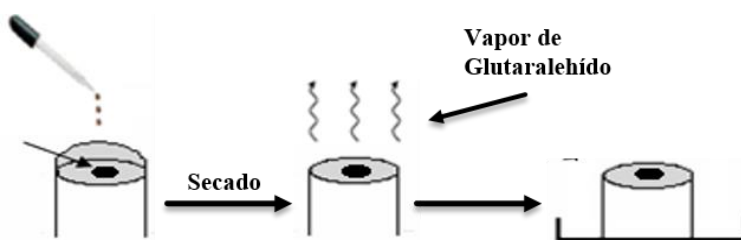


Figura 20. Procedimiento de entrecruzamiento del hidrogel de quitosano.

3.3.3.2 Electrodo de grafito espectralmente puro

El electrodo enzimático de trabajo consistió en un disco giratorio con un diámetro de 3 mm, fabricado con grafito espectralmente puro (Ringsdorf Werke, Alemania) Figura 20. Antes de inmovilizar la enzima sobre el electrodo, fue necesario aplicar un pretratamiento de limpieza para obtener una superficie limpia y reproducible. Para el lavado del electrodo de grafito se utilizó etanol. A continuación, la superficie electródica se pulió con pasta de alúmina $0.05\ \mu\text{m}$ y se lavó con agua desionizada en una bañó ultrasónico para eliminar cualquier partícula residual. Una vez hecho esto se procedió a inmovilizar la enzima PPO, siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

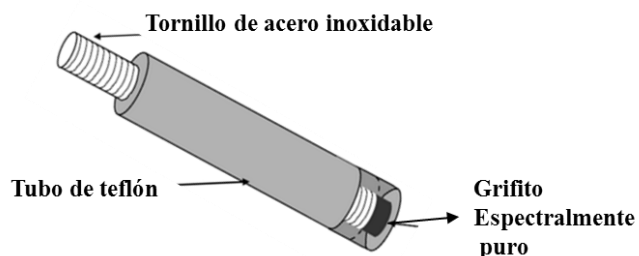


Figura 21. Un electrodo de grafito espectralmente puro.

3.3.3.3 Obtención de los amperogramas

Los amperogramas se obtienen sumergiendo el biosensor en la celda de medida que contiene 10 mL del medio de trabajo (PBS) pH 6.5, agitándose mecánicamente de forma constante. Se aplican los potenciales: de trabajo $0.00\ \text{V}$ vs Ag/AgCl(sat) durante 66.64 ms y el potencial de limpieza $+1.40\ \text{V}$ vs Ag/AgCl(sat) por 166.6 ms de manera consecutiva y se permite la estabilización de la corriente

de fondo. A continuación, se añade con una micropipeta el volumen deseado de la disolución patrón del compuesto fenólico a estudiar, lo que genera un aumento de la intensidad de corriente, como consecuencia de la reducción de la *orto*-quinona producida enzimáticamente, y se registra hasta llegar al estado estacionario donde la intensidad de corriente se mantiene constante. Se siguen realizando adiciones de pequeños volúmenes constantes de sustrato con la micropipeta hasta que se obtienen todas las señales deseadas. No fue necesario aplicar ningún tipo de tratamiento, físico o químico al electrodo entre medidas. La intensidad de corriente generada por la reducción del producto de la reacción enzimática tendrá una relación directa con la concentración de compuesto fenólico.

3.3.3.4 Obtención de los voltamperogramas cíclicos

Los voltamperogramas cíclicos se obtuvieron a una velocidad de barrido de 0.1 V/s y un intervalo de potencial de +0.4 V a -0.2 V vs Ag/AgCl(sat) a para el estudios de ensuciamiento y pasivación del electrodo.

3.3.4 Estudio de los parámetros analíticos de los biosensores

Los parámetros analíticos estudiados en todos los biosensores han sido la sensibilidad, intervalo lineal, límite de detección, tiempo de respuesta, repetibilidad y precisión. La sensibilidad se calcula a partir de la pendiente del intervalo lineal. El intervalo lineal corresponde con el mayor número de resultados que presentan un coeficiente de regresión igual o superior al 99%. El cálculo del límite de detección se basa en la relación señal/ruido=3. El tiempo de respuesta se estima mediante el tiempo que se transcurre entre la adicción del analíto a la celda y la obtención del 95 % de la respuesta.

Para evaluar la precisión del método, se determinan dos propiedades analíticas básicas, repetibilidad y precisión, expresadas mediante la desviación estándar relativa (RSD). En el estudio de la repetibilidad, todas las condiciones se mantienen idénticas, realizando 10 medidas de la misma disolución de sustrato con el mismo biosensor y el mismo día. Este estudio se realiza a 3 niveles de concentración de sustrato, a la concentración más baja y más alta del intervalo lineal y a una concentración intermedia.

REFERENCIAS CAPITULO III

- [1] Robb, D. Tyrosinase. In: Lontie R, editor. Copper proteins and copper enzymes. Boca Raton: CRC Press Inc.; 1984. p. 207.
- [2] Stoytcheva, M., Zlatev. R., Valdez. B., Magnin, J., and Velkova, Z. Electrochemical sensors based on *Arthrobacter globiformis* for cholinesterase activity determination. *Biosens Bioelectron.* (2006), 22: 1.
- [3] Stoytcheva, M., Zlatev, R., Velkova, Z., Valdez, B., Ovalle. M., and Petkov. L. Hybrid electrochemical biosensor for organophosphorus pesticides quantification. *Electrochim Acta.* (2009), 5:1721.
- [4] Stoytcheva, M., Zlatev, R., Magnin, J., Ovalle, M., Valdez, B. *Leptospirillum ferrooxidans* based Fe²⁺ sensor. *Biosens Bioelectron.* (2009), 25:482.

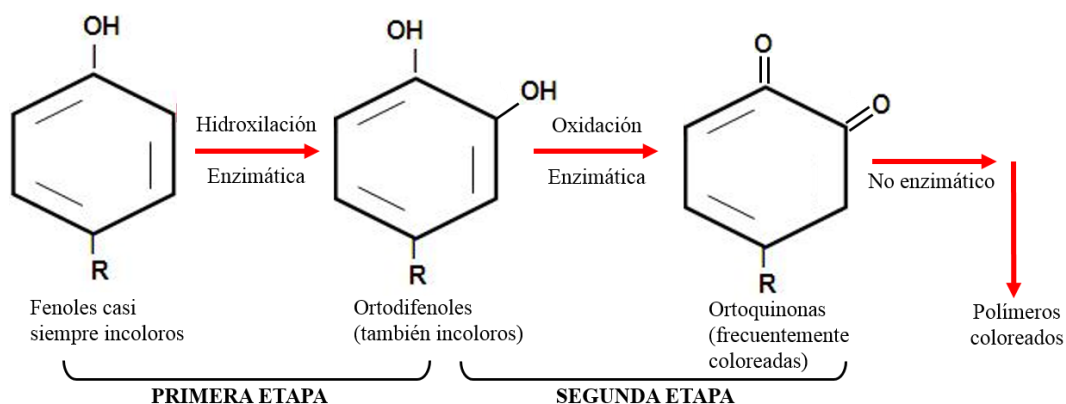
CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 BIOSENSOR TIPO CLARK CON MEMBRANA DESECHABLE DE PPO

4.1.1 Principio de medición:

Las determinaciones de compuestos fenólicos se basaron en la reacción de oxidación de un *o*-difenoil a *o*-quinona, la cual es catalizada por la PPO inmovilizada en la superficie del electrodo tipo Clark:



El principio de trabajo del biosensor es la disminución del flujo del cofactor oxígeno que llega a la sonda durante la reacción enzimática, que es proporcional a la concentración de sustrato en la solución. La intensidad de corriente de salida del sensor es, además, directamente proporcional al flujo de oxígeno a través de la membrana enzimática.

4.1.2 OPTIMIZACIÓN DE LA MEMBRANA DESECHABLE DE PPO

El propósito de este paso fue determinar la composición óptima de la membrana enzimática, dando la máxima sensibilidad y precisión de la determinación de fenoles aplicando el biosensor descrito anteriormente (apartado procedimiento experimental 3.3.2.1). Los parámetros variados fueron: la naturaleza de hidrogel, la concentración hidrogel, y la carga enzimática (relación hidrogel: PPO).

4.1.2.1 Efecto de la naturaleza del hidrogel

Los hidrogeles se describen como redes macromoleculares entrecruzadas o inmersas en un fluido que sufren cambios de volumen reversibles como respuesta a estímulos externos tales como pH, temperatura, campo eléctrico, entre otros. Estos hidrogeles pueden existir en dos fases, hinchados y colapsados. Los hidrogeles son capaces de absorber grandes cantidades de agua porque ello minimiza la energía libre de la mezcla del polímero con el disolvente, pero son insolubles en ella debido a que las cadenas poliméricas están interconectadas. La red tridimensional del polímero es estabilizada por el agente entrecruzante, el cual determina sus propiedades de hinchamiento. Esta estructura especial suave y húmeda permite que en el interior de los hidrogeles se puedan inmovilizar biomoléculas como enzimas, por el método de atrapamiento físico.

El efecto de la naturaleza de los hidrogeles seleccionados se puso a prueba de la siguiente manera: tres tipos de dispersiones hidrogeles que contienen 0.8% (m/v) de gelatina, 0.8% (m/v) quitosano, y 0.8% (m/v) de alginato de sodio se prepararon y tres filtros de celulosa fueron saturados con los hidrogeles, respectivamente. Cada uno de estos tres hidrogeles fueron mezclados con solución de PPO con 1 mg mL^{-1} en una relación de volumen a volumen de 1:1, y se utilizó para la deposición de la capa de enzima en los filtros de celulosa ya saturados. Por lo tanto, tres membranas basadas en los tres tipos de hidrogeles se elaboraron y uno a uno fueron ensamblados con la sonda de oxígeno tipo Clark. La capa enzimática estaba dentro del filtro de celulosa y entre la sonda tipo Clark y la membrana de polímero.

Se realizaron cinco determinaciones de catecol consecutivas, aplicando cada una de los tres tipos de membranas a 25°C y -0.7 V vs $\text{Ag/AgCl}(\text{sat})$ midiendo la disminución de la corriente de reducción de oxígeno, generada por las adiciones sucesivas de compuesto fenólico en 31 mL de una disolución PBS 0.1 mol L^{-1} pH 6.5 en el rango de $0.1\text{-}0.5 \text{ mmol L}^{-1}$, se presentan en la Figura 21.

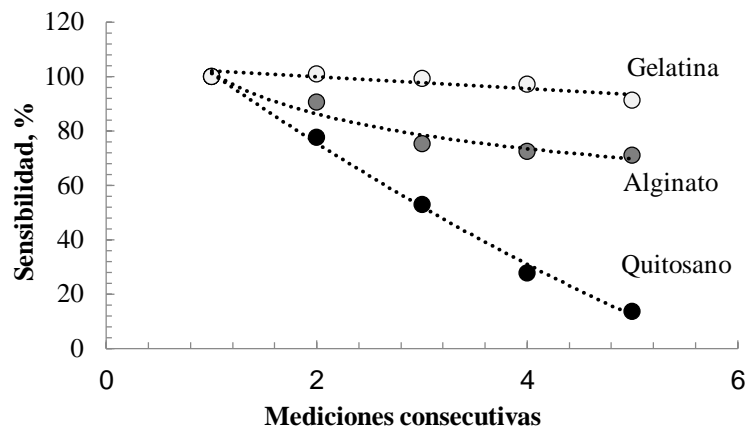


Figura 22. Efecto de la naturaleza del hidrogel en la sensibilidad de las determinaciones de catecol. Hidrogel 0.8% m/v y PPO 1 mg mL⁻¹ relación volumen a volumen (1:1). Determinaciones consecutivas de catecol en el rango de 0.1-0.5 mmol L⁻¹.

Como se puede observar en la Figura 21, la sensibilidad de las determinaciones consecutivas (n=5) disminuye después de cada determinación y esto es válido para cada uno de los hidrosol seleccionados en el orden: quitosano>alginato>gelatina. Se encontró que la disminución era 86.33%, 28.93% y 8.87%, respectivamente y condujo a la reducción de la precisión del análisis, caracterizado por una desviación estándar relativa de 71.85%, 14.69%, y 4.44%, respectivamente. La pérdida de sensibilidad se atribuyó a la fuga de la enzima, lo cual fue confirmado por medidas espectrofotométricas (no mostradas). Los resultados obtenidos demostraron que las capacidades de retención de la enzima en la gelatina son mejores que las de quitosano y alginato de sodio. Estudios previos reportados en la literatura confirman que el quitosano exhibe una menor eficiencia de retención de proteína en comparación con alginato [134, 135]. Este efecto se atribuye a los obstáculos de difusión más bajos de la matriz de quitosano debido a su red más abierta.

4.1.2.2 Efecto de la concentración de hidrogel

La cantidad de película enzimática depositada en la superficie electrodo constituye un parámetro importante que afecta en gran medida a la sensibilidad y densidad de corriente máxima del biosensor. Por lo tanto una vez comprobado que el hidrogel de gelatina es adecuado para la inmovilización de PPO, se procedió al estudio del efecto de la concentración de hidrogel en la mezcla PPO/hidrogel de relación (1:1) depositado en el filtro de celulosa. La concentración de la dispersión de gelatina se varió de la siguiente manera: 0.2%, 0.6%, 0.8% y 1.0% m/v, mientras que la concentración de la enzima se mantuvo constante en todas las experiencias (1.0% m/v). Para ello, se

realizaron cinco curvas de calibración utilizando soluciones de gelatina de 0.2, 0.6, 0.8, y 1.0 % m/v. Las concentraciones del sustrato (catecol) fueron de 0.1 mmol L⁻¹ a 0.5 mmol L⁻¹.

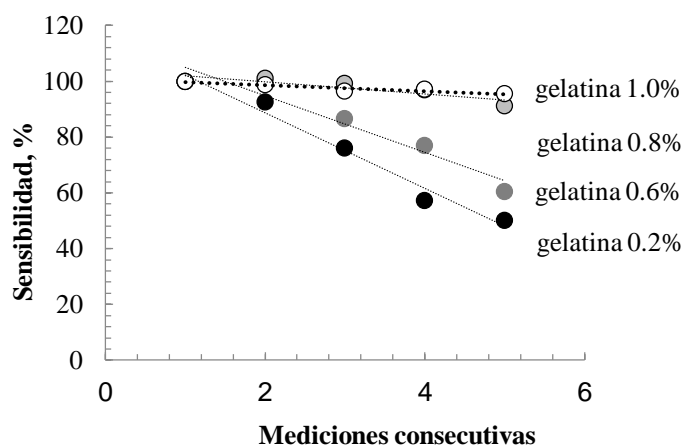


Figura 23. Efecto de la concentración del hidrogel de gelatina en la sensibilidad de la determinación de catecol. PPO (1 mg mL⁻¹) y gelatina (0.2%, 0.6%, 0.8%, y 1%) relación volumen a volumen (1:1). Determinaciones consecutivas de catecol en el rango de 0.1-0.5 mmol L⁻¹

Como se esperaba, la gelatina de baja concentración, exhibió una baja eficiencia de retención de la enzima: se observó la disminución de sensibilidad de 49.95% para el hidrogel de 0.2%, y 39.47% para el hidrosol de 0.6% (Figura 22). La mayor cantidad de gelatina, obviamente, dio lugar a interacciones moleculares más fuertes, lo que condujo a la formación de una red compacta con tamaño de poro pequeño y una mejor eficiencia de retención de la enzima. De hecho, la inmovilización de la PPO en gelatina al 0.8% y 1.0% dió como resultado una caída de sensibilidad de sólo 8.87% y 4.56%, respectivamente.

Se obtuvieron mejores resultados haciendo uso del hidrogel 1.0%, en términos de atrapamiento estable de la PPO, lo que se tradujo en una excelente precisión de las mediciones (RSD=1.22%, para n=5).

4.1.2.3 Efecto de la carga enzimática

Otro parámetro importante para optimizar el biosensor es la carga enzimática, lo que permite ampliar su campo de aplicación con distintos intervalos de linealidad. Se ha estudiado el efecto de la carga enzimática, variando la cantidad de hidrogel, con la misma cantidad de enzima colocada en el filtro de celulosa.

Dos membranas enzimáticas fueron preparadas con una mezcla de PPO al 1.0 % m/v y gelatina 1.0 % m/v a una relación de 1:1 y 1:2. Se realizaron 5 mediciones consecutivas de catecol con los dos tipos de membranas en el intervalo de 0.1 a 0.5 mmol L⁻¹, presentadas en la Figura 23. La RSD para cinco determinaciones consecutivas fue 1.22% y 5.00%, respectivamente; y la sensibilidad del análisis fue estimada en 0.89 μA mmol L⁻¹ y 0.73 μA mmol L⁻¹, respectivamente. La mejor precisión (1.22%) y sensibilidad (0.89 μA mmol L⁻¹) obtenidos mediante la mezcla 1:1 se han atribuido al mejor atrapamiento de la enzima en la mezcla más compacta de enzima/hidrogel.

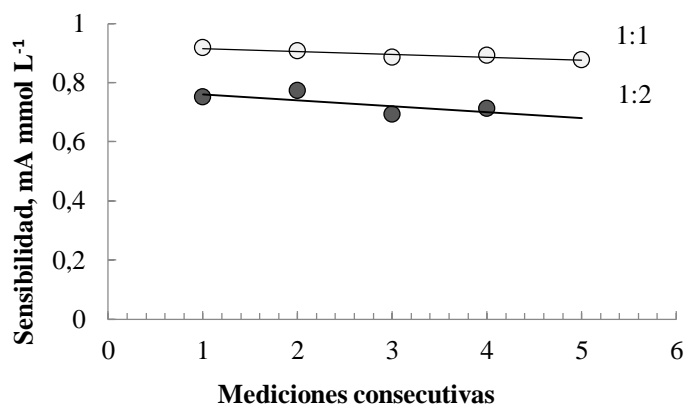


Figura 24. Efecto de la carga enzimática en la sensibilidad de la determinación de catecol. Determinaciones consecutivas de catecol en el rango de 0.1-0.5 mmol L⁻¹

Los resultados obtenidos, demuestran que las membranas de PPO con mejores desempeños podrían obtenerse usando: gelatina 1.0% m/v, y 1.0% m/v de la PPO en la proporción de gelatina 1:1, Tabla 7.

Tabla 7. Resumen de optimización de la preparación de membrana enzimática.

Soporte	PPO:hidrogel	Sensibilidad, %	RSD, %
Quitosano 0.8%	1:1	86.33	71.85
Alginato de Na 0.8%	1:1	28.93	14.69
Gelatina 0.8%	1:1	8.87	4.44

Soporte	PPO:gelatina	Sensibilidad, %	RSD, %
Gelatina 0.2%	1:1	49.95	28.79
Gelatina 0.6%	1:1	39.47	19.60
Gelatina 0.8%	1:1	8.87	4.44
Gelatina 1.0%	1:1	4.56	1.22

Soporte	PPO:gelatina	Sensibilidad, $\mu\text{A mmol L}^{-1}$	RSD, %
Gelatina 1%	1:1	0.89	1.22
Gelatina 1%	1:2	0.73	5.00

Estos resultados nos indican que la adecuada selección de la carga enzimática permitirá controlar el intervalo lineal y ajustarlo a la aplicación analítica correspondiente, así como reducir el tiempo de respuesta del biosensor.

4.1.3 Actividad de la enzima PPO

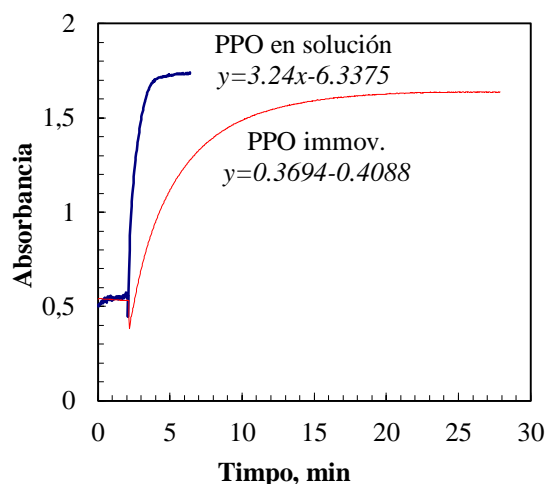


Figura 25. Medida de actividad enzimática de PPO libre e inmovilizada.

La actividad enzimática específica se encontró que era 224 de unidades mg^{-1} de la enzima libre, y para la enzima inmovilizada fue de 25.4 unidades mg^{-1} .

4.1.4 Caracterización superficial de las membranas enzimáticas desechables

En este análisis se observó la porosidad y características microscópicas superficiales de las membranas enzimáticas mediante un microscopio óptico con lentes de 4x, 40x y 100x (apartado 3.1 de la Parte Experimental). Las micrografías se muestran en la Figura 24. Asimismo, se muestra una micrografía en la misma escala del filtro de celulosa, sin hidrogel ni enzima.

La figura 25a) muestra la superficie del filtro de celulosa (tamaño de poro 22 μm) son ningún tratamiento con hidrogel, se observa con una superficie lisa uniforme. La imagen 25b) muestra la superficie de la membrana enzimática preparada con hidrogel de quitosano 0.8% m/v. En este caso no es posible distinguir zonas diferenciadas, se observan bordes lisos y regulares, producto del entrecruzamiento de las cadenas de quitosano; además presenta una superficie más ordenada y lisa, con respecto de los demás hidrogeles. La figura 25c). Exhibe la morfología de la membrana enzimática preparada con hidrogel alginato de sodio 0.8% m/v reticulado con iones de Ba^{+2} . Se observan capas superpuestas de alginato en los bordes y la superficie no presenta una porosidad definida y es irregular. Sin embargo, el hidrogel alginato de sodio muestra una estructura de tipo red con porosidad más alta y tamaño de poro mucho mayor que los de la película de hidrogel de quitosano.

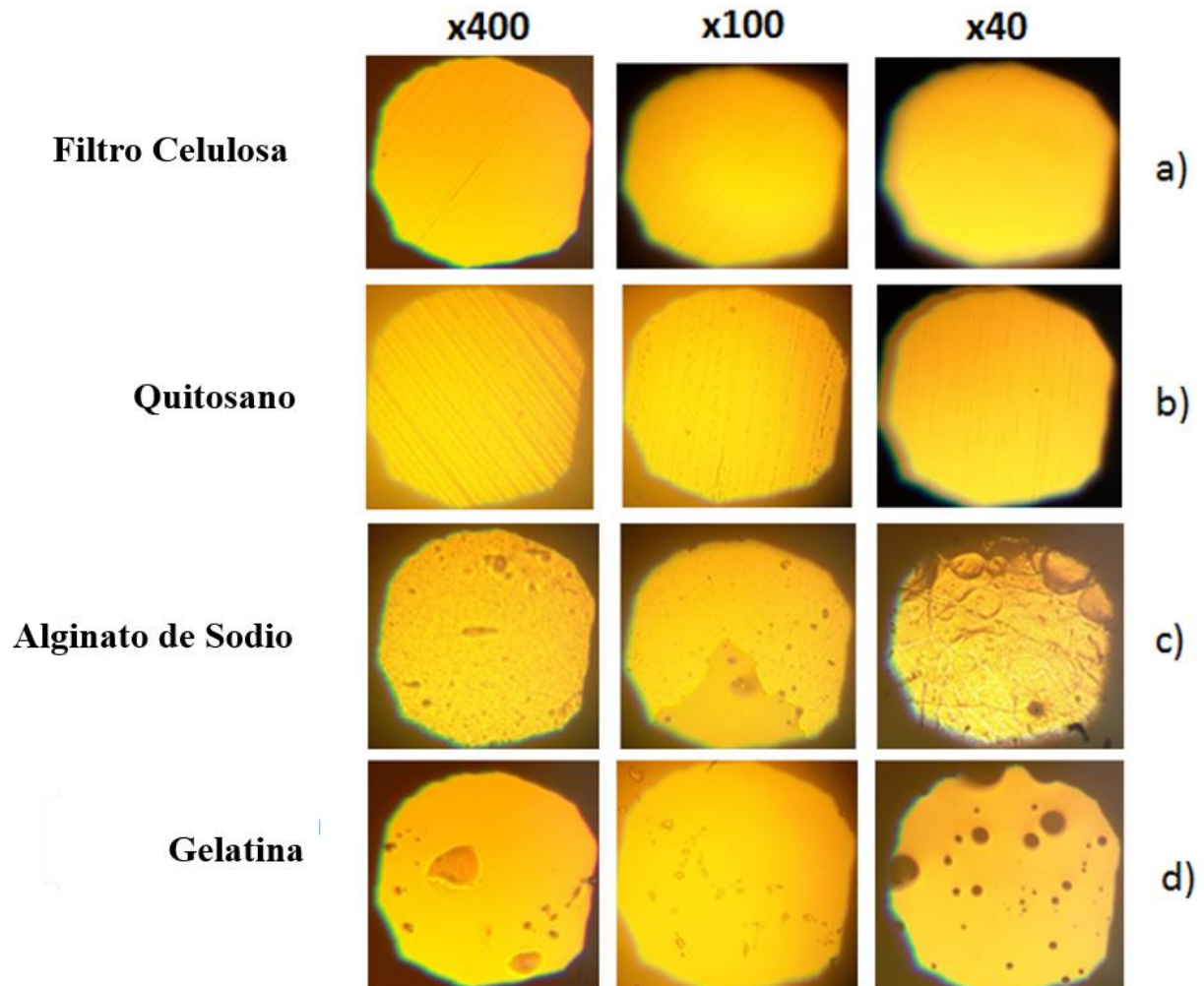


Figura 26. Imágenes de microscopio óptico de la superficie de a) filtro de celulosa b) filtro de celulosa con quitosano 0.8 % c) filtro de celulosa con alginato de sodio al 0.8 % d) filtro de celulosa con gelatina 0.8 %.

La figura 25d) está constituida con hidrogel de gelatina 0.8% m/v. La morfología de esta membrana muestra una superficie más compacta, con poros de mayor tamaño distribuidos de manera uniforme en toda el área de la membrana. Es por esta razón que la membrana conserva la enzima y la resguarda de manera eficaz previniendo la liberación de moléculas de enzima a la solución. Además la barrera difusional para el sustrato es menor en comparación con las demás membranas.

Al final, se obtiene una matriz polimérica que atrapa enzima PPO que se encuentren dentro del medio donde se realiza la polimerización. Interesa que el tamaño de poro sea lo suficientemente pequeño como para que la enzima no salga al exterior pero a la vez debe ser lo suficientemente grande para que el sustrato pueda difundir hacia el interior de la micropartícula permitiendo la reacción enzimática y para que el oxígeno, pueda salir del polímero y alcanzar la superficie eléctrica.

4.1.5 Espectros de Infrarrojo por Transformadas de Fourier (FTIR) de membranas enzimáticas desechables

Para investigar la naturaleza química de las membranas enzimáticas 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 los inmovilizados de alginato de sodio/f.celulosa/PPO, quitosano/f.celulosa/PPO, gelatina/f.celulosa/PPO, se muestran en las figuras 26 a) b) y c) respectivamente.

El espectro del filtro de celulosa (acetato de celulosa) (Figura 26a) muestra picos de absorción característicos a 29810.3 y 3508.93 cm^{-1} para los grupos -C-H y OH , también los picos en 1644.05 y 1733.1 cm^{-1} para los enlaces N-C=O y O-C=O . En la Figura 26b) se observa en el espectro del alginato los picos característicos en las regiones de 1640, 1050 y 3480 cm^{-1} de los grupos funcionales -COO- , -C-O-C- y OH respectivamente.

El espectro de quitosano (Figura 25a) presenta picos de absorción característicos a 1633, 1028 y también para los grupos N-H , C=O y OH . Un fuerte pico característico de amida a 1654 cm^{-1} ; una banda amplia con tres pequeños picos (1.300 cm^{-1} , 1.350 cm^{-1} y 1.412 cm^{-1}) atribuidos a distintos modos de vibración de los grupos -CH , -CH_2 y -CH_3 y una segunda amplia banda con dos pequeños picos 1.089 cm^{-1} producidos por los grupos C-O , C-O-C , C-C y C-N del biopolímero.

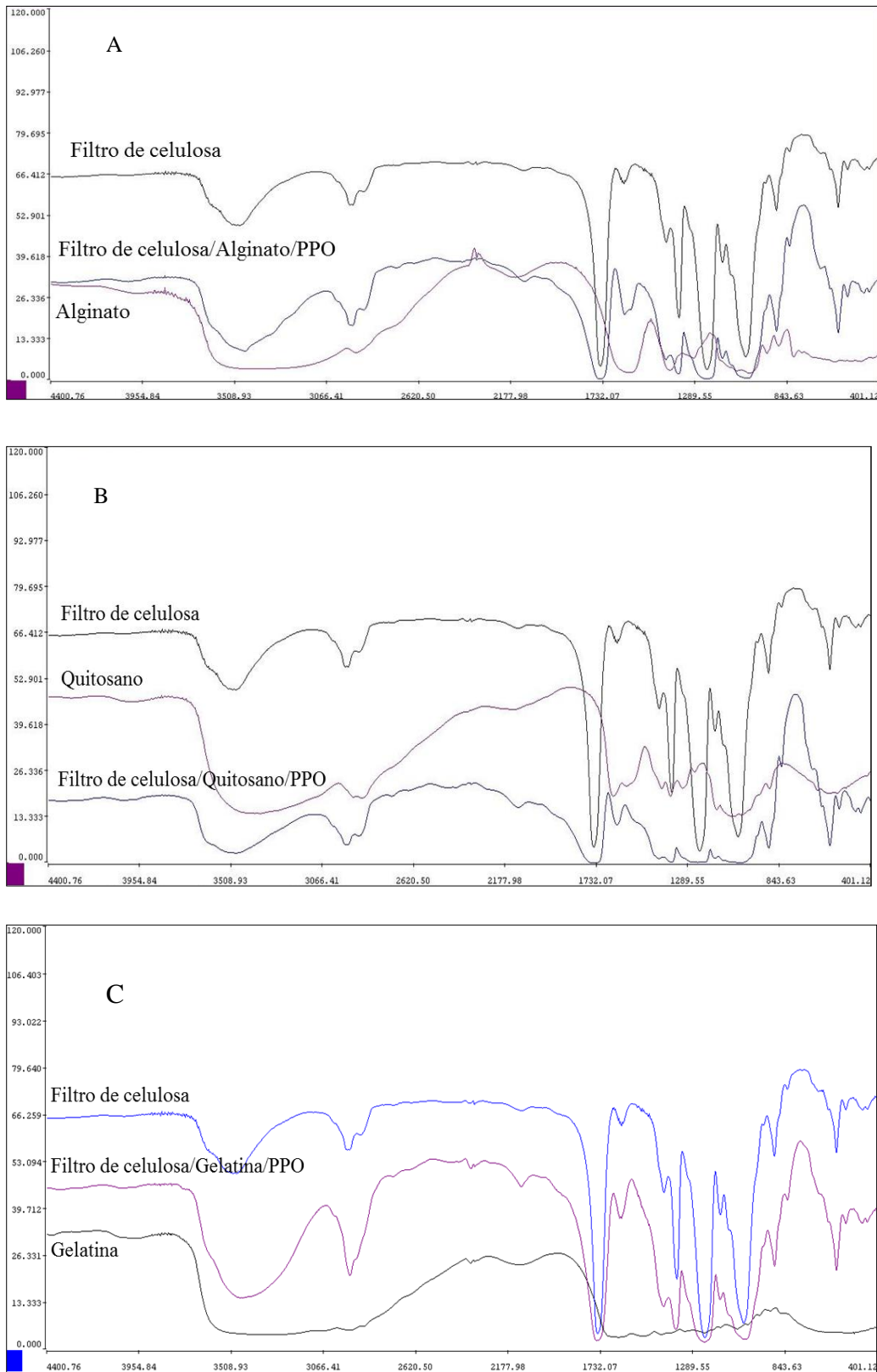


Figura 27. Espectros de FTIR de a) filtro de celulosa/quitosano/PPO, b) filtro de celulosa/AlgNa/PPO y c) filtro de celulosa/quitosano/PPO.

A partir de los espectros de FTIR se infiere que en las mezclas de los polímeros no se presentan otros picos de absorción que no correspondan a los espectros de sus componentes individuales y por lo tanto el análisis por FTIR no muestra evidencia de cambios fuertes de interacción química que cambie la naturaleza de los grupos funcionales de las membranas enzimáticas.

4.1.6 Determinación de catecol aplicando biosensor con membrana de PPO desechable en condiciones experimentales óptimas

El biosensor desarrollado, incluye un electrodo tipo Clark modificado actuando como transductor, y una membrana desechable soporte de la PPO como elemento de detección. La determinación catecol aplicando el biosensor enzimático de PPO implica: (i) la conversión a catecol a *o*-quinona por la PPO inmovilizado con consumo de oxígeno, y (ii) el registro de la variación de la corriente de reducción de oxígeno, en función de la concentración de analito (Figura 6a). Teniendo en cuenta esto, se estudió la respuesta del biosensor a catecol en condiciones experimentales óptimas. Esto se resume en la tabla 7.

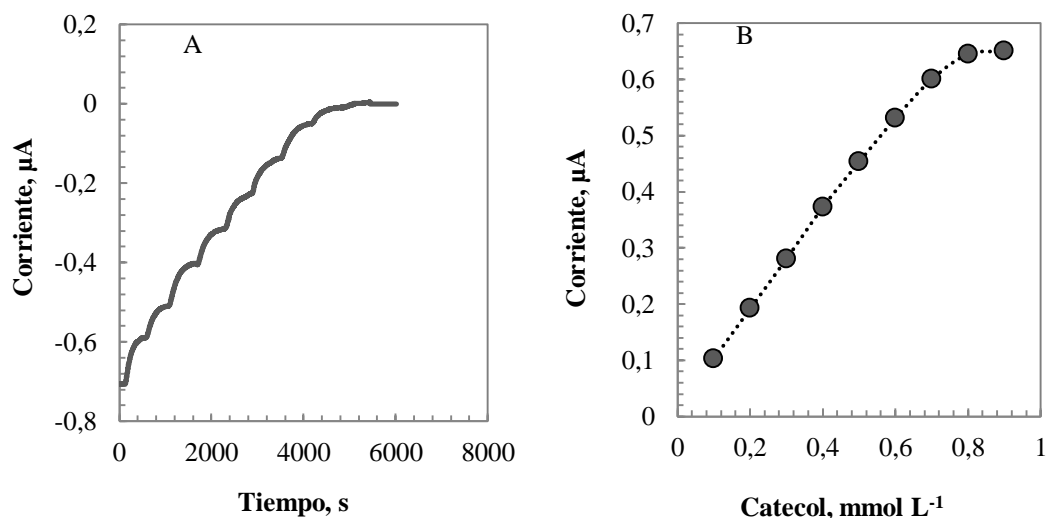


Figura 28. (a) Respuesta amperométrica del biosensor basado en PPO inmovilizada en hidrogel de gelatina 1.0%, en función de la adición sucesiva de solución de catecol a 25°C; 120 rpm y pH 6.5. (b) Curva de calibración para la catecol 0.1 mmol L⁻¹ hasta 0.7 mmol L⁻¹.

La figura. 27a), representa la respuesta típica en estado estacionario del biosensor a catecol en el rango de concentración de 0.1 mmol L⁻¹ a 0.9 mmol L⁻¹. La figura. 27b), correspondiente al diagrama de calibración, que fue lineal en el rango de de 0.1 mmol L⁻¹ a 0.7 mmol L⁻¹ con una pendiente de 0.89 μA mmol L⁻¹ con un coeficiente de correlación de R²=0.9954. El tiempo de respuesta del biosensor fue 120 s, lo que pone de manifiesto la buena accesibilidad del sustrato al centro activo de la enzima en este sistema de inmovilización.

Tabla 8. Características de la determinación amperométrica de catecol mediante el uso de un biosensor basado en PPO.

Características de biosensor	
Sensibilidad	0.89 μA mmol L ⁻¹
Concentración lineal de la curva	0.1-0.7 mmol L ⁻¹
Límite de detección LD	1 μmol L ⁻¹
Tiempo de respuesta en estado estacionario	120 s
Reproducibilidad	R.S.D. < 3%
Tiempo de vida de almacenamiento	t _{L10} =10 días

El límite de detección (LD), estimado sobre la base de la relación señal-ruido de 3, igualó a 1 μmol L⁻¹. Este LD es mayor que el reportado para los sensores de PPO modificados con nanomateriales, los cuales varían en el rango de 0.2 a 0.84 μmol L⁻¹ [136], [137]. Pero, está cerca de los valores reportados con pasta de carbón, de óxido de indio y estaño, y sensores serigrafados de Pt y PPO para la determinación catecol (1-1.7 mol L⁻¹) [137], de acuerdo con el principio de medición que se ilustra en la figura 6a).

La precisión de las determinaciones y la idoneidad del biosensor para el análisis de muestras reales fueron evaluadas por los experimentos de recuperación catecol en las muestras de agua del grifo, que mostraron resultados satisfactorios con el promedio de recuperación en el rango de 98-102%. Se prestó especial atención a la evaluación de la reproducibilidad de las determinaciones, que depende de la reproducibilidad de la membrana enzimática preparada. En el estudio de la repetibilidad, todas las condiciones se mantuvieron idénticas, realizando 10 medidas de la misma disolución de sustrato con el mismo biosensor y el mismo día. El biosensor tuvo una alta reproducibilidad 2.74% para n=10, debido a la técnica de inmovilización de enzimas fiable, lo que permite la preparación de membranas de enzimas activas con características idénticas.

La estabilidad de almacenamiento de las membranas de la enzima se ensayó midiendo la respuesta biosensor catecol a 0.4 mmol L^{-1} (0.1 mol L^{-1} PBS, pH 6.5, 25°C). Entre las mediciones, las membranas se mantuvieron almacenadas en seco a 4°C . No se observó disminución evidente en la respuesta del biosensor durante el periodo de prueba de 10 días. La respuesta estable fue adecuada lo que se atribuye a la inmovilización de la enzima en la estructura de gelatina suave y húmeda, lo que permite preservar la actividad enzimática.

4.2 BIOSENSOR BASADO EN AMPEROMETRÍA DE PULSOS (PAD)

El biosensor desarrollado incluye un electrodo de grafito modificado con una película quitosano/PPO. La inmovilización de la enzima PPO y preparación del biosensor se realizó de acuerdo con el procedimiento detallado en el capítulo Materiales y Métodos, apartado 3.3.3.

4.2.1 Principio de medición

Una extensión de la amperometría a un solo potencial fijo aplicado la representa la amperometría de pulsos, comúnmente utilizada para la cuantificación de analitos que tienden a provocar un ensuciamiento de la superficie de los electrodos. En la detección por amperometría de pulsos (pulsed amperometric detection PAD), se aplica un potencial de trabajo durante un corto periodo de tiempo (por lo general unos pocos cientos de milisegundos), seguido de potenciales más altos o más bajos que se utilizan para la limpieza del electrodo. La corriente se mide sólo mientras se aplica el potencial de trabajo. A continuación, las mediciones de corriente secuenciales se procesan por el detector para producir una salida suave.

La cuantificación de dos compuestos fenólicos típicos, monofenoles y *o*-difenoles: fenol y *o*-catecol respectivamente, por el biosensor basado en PPO con detección por amperometría de pulsos implica la siguiente secuencia de reacciones: (i) conversión de compuestos fenólicos a *o*-quinona por la PPO inmovilizada, y (ii) la reducción electroquímica de *o*-quinona producida enzimáticamente (Figura 6b). La corriente de reducción de *o*-quinona, proporcional a la concentración de analito. Sin embargo las orto-quinonas productos de estas reacciones enzimáticas, son sustancias muy reactivas y pueden reaccionar espontáneamente convirtiéndose en hidroquinonas que polimerizan fácilmente (polímeros coloreados) para formar una capa o película aislante de polímero ocasionando el

ensuciamiento y la pasivación del electrodo disminuyendo la precisión de las determinaciones [5].

4.2.2 Pruebas de ensuciamiento y regeneración de la superficie del electrodo

Varios autores han informado que el ensuciamiento del electrodo está asociado con la determinación de fenoles utilizando biosensores basados en la enzima PPO [6-10], No obstante, este proceso no ha sido objeto de alguna investigación. Por lo tanto, en este trabajo, se han realizado estudios y pruebas de ensuciamiento del electrodo con compuestos fenólicos. Diferentes métodos fueron utilizados para investigar el comportamiento de las *o*-quinonas durante el proceso de electropolimerización y para caracterizar la película polimérica formada incluyendo: voltametría cíclica (CV), amperometría, microbalanza de cristal de cuarzo electroquímica (EQCM), y microscopía óptica.

4.2.2.1 Voltametría cíclica

Considerando el comportamiento electroquímico y la inestabilidad de las *o*-quinonas producidas en la reacción enzimática, se ha realizado una serie de voltamogramas cíclicos con el fin de evidenciar, así la pasivación del electrodo por la película polimérica formada.

La Figura. 27a), muestra el voltamograma cíclico resultante de la reducción y la oxidación reversible de *o*-quinona en un electrodo de grafito espectralmente puro, con la producción de *o*-quinona *in situ* producto de la oxidación de catecol catalizada por la enzima PPO, a una velocidad de barrido de 0.1 V/s, y un intervalo de potencial de +0.4 V a -0.2 V vs Ag/AgCl(sat), en una disolución tampón de fosfato 0.1 mol L⁻¹ pH 6.0. La disminución de las corrientes del pico catódico I_{pc} y anódico I_{pa} , respectivamente, con sucesivos ciclos de barrido de potencial, permite suponer que se podría formar que una película de polímero aislante que impide la transferencia directa de electrones y/o la difusión de las moléculas de *o*-quinona a la superficie del electrodo. La Figura 28b) demuestra la dependencia del ensuciamiento del electrodo con el número de barridos de potenciales y la concentración del analíto. Como era de esperar, el aumento de la concentración del analíto favoreció el ensuciamiento del electrodo, que dio lugar a mayor disminución de la respuesta del biosensor. La corriente del pico catódico se redujo con 28.66% y 44.21%, y la corriente de pico anódico se redujo con 22.02% y 26.12%, respectivamente, con un aumento de la concentración de catecol 2 mmol L⁻¹ a 3 mmol L⁻¹ después de 25 ciclos de barrido de potencial.

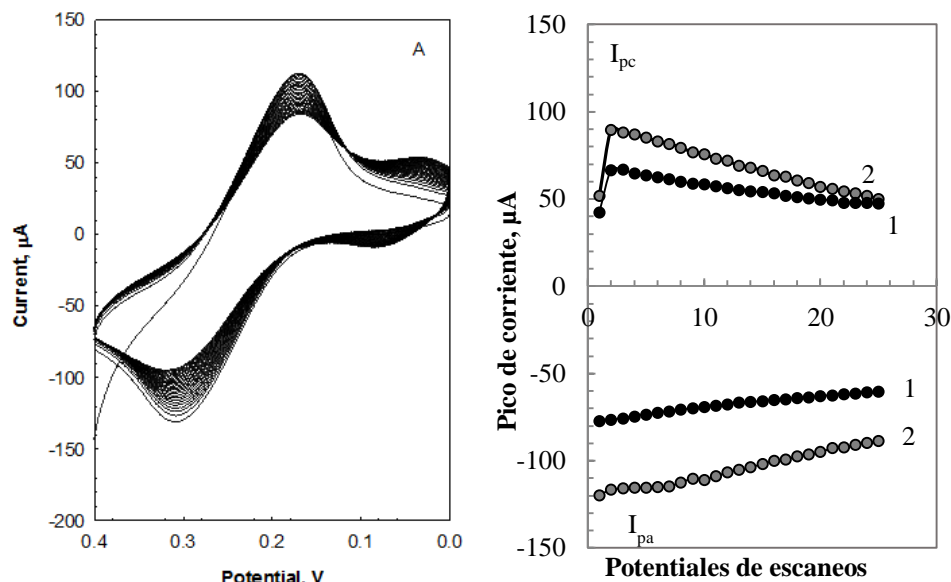


Figura 29. (A) Voltamograma cíclico resultante de la reducción y la oxidación reversible de *o*-quinona en un electrodo de grafito espectralmente puro a pH 6.5, 25°C, 25 barridos de potencial, velocidad de barrido de 0.1 V s⁻¹. (B) Corriente de pico catódico I_{pc} y corriente de pico anódico I_{pa} , dependencia del número de barridos de potenciales sucesivos y la concentración de catecol: 1) 2 mmol L⁻¹; 2) 3 mmol L⁻¹; PBS 0.1 mol L⁻¹.

4.2.2.2 Microbalanza de cristal de cuarzo (QCMB)

La microbalanza de cristal de cuarzo (QCMB, del inglés Quartz Crystal Microbalance) es un dispositivo en el que el efecto piezoeléctrico se usa como herramienta para detectar cambios muy pequeños de masa. (Figura 9). El cristal puede ser excitado hasta la resonancia cuando la frecuencia sea tal que el grosor del cristal es un número entero N de veces la mitad de longitud de onda. La frecuencia de resonancia del cristal (f_0) depende de la masa total resonante. La variación de la frecuencia es proporcional a la cantidad de masa añadida y el sensor tipo microbalanza opera como una balanza sensible [11]. Por otro lado, la microbalanza tiene incorporado un circuito oscilador donde la frecuencia de oscilación va disminuyendo conforme se va acumulando masa sobre la superficie del diseño.

Las QCMBs están constituidas por un delgado disco de cristal de cuarzo al cual se le fijan los electrodos para la estimulación y sensado. La aplicación de un potencial eléctrico externo al material piezoeléctrico, produce tensiones mecánicas internas. Un campo eléctrico oscilante aplicado en las caras del dispositivo induce una onda acústica que se propaga a través del cristal. Las dimensiones y geometrías tanto del cristal como de los electrodos son determinantes en las características

funcionales que la QCMB presenta. La ecuación de Sauerbrey (ver ec. (2)) relaciona el cambio en la f_0 con la masa acumulada sobre el cristal:

$$\Delta f = ks\Delta m \quad (2)$$

Donde Δf es el cambio en la f_0 , Δm es la masa depositada y ks es una constante que considera parámetros del cuarzo como la f_0 , el espesor, la densidad y el módulo de corte. La ecuación de Sauerbrey, se considera valida siempre que el grosor (o la masa equivalente) del material depositado sea inferior al 2% (5%) del valor del cristal.

La masa de los productos de las reacciones electro-enzimáticas, depositados sobre la superficie del electrodo, así como la tasa de ensuciamiento del electrodo fueron evaluados por medio de EQCM. Esta técnica es muy adecuada para la cuantificación de los cambios de masa electroquímicamente inducidas en las superficies de los electrodos, asociados a los procesos de crecimiento polímeros y los fenómenos interfaciales [12-16]. Para llevar a cabo las mediciones, se inyectaron 6 mmol L^{-1} de catecol en la celda EQCM que contenía PBS 0.1 mol L^{-1} , pH 6.5 y PPO libre. El catecol era enzimáticamente convertido a *o*-quinona, que a su vez se reduce a un potencial de 0.00 V frente a Ag, AgCl/KCl(sat), que se mantuvo constante.

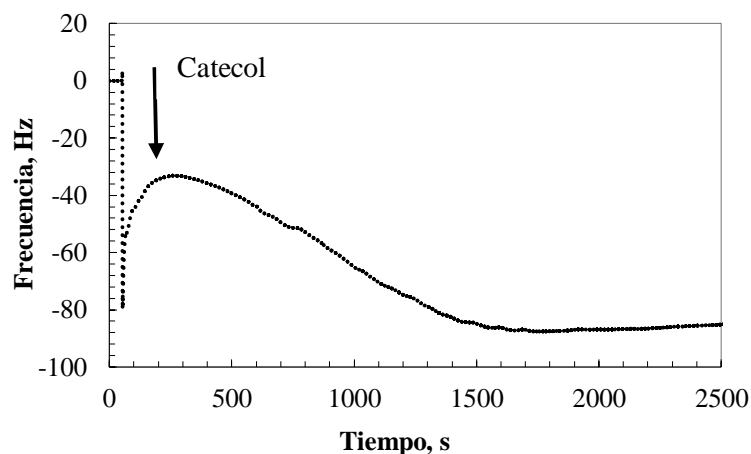


Figura 30. Respuesta Transitoria EQCM a catecol 6 mmol L^{-1} que ilustra el ensuciamiento del electrodo; PBS 0.1 mol L^{-1} , pH 6.5, $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

El cambio de frecuencia de resonancia del cristal de cuarzo se monitorizó de forma simultánea en el tiempo, como se muestra en la Figura 29. La disminución en la frecuencia de resonancia, y el aumento de la masa del electrodo respectivamente, confirman la formación de una película insoluble, que finalmente bloquea reducción de *o*-quinona. El valor del cambio de la masa en las condiciones de la Figura 29, se determinó mediante el uso de la ecuación de Sauerbrey. Se encontró que la masa

era igual a 57 ng. La velocidad de ensuciamiento del electrodo fue determinada por la pendiente de la parte lineal de la curva obtenida en coordenadas de cambio de frecuencia en función del tiempo y se estimó en 0.051 Hz s^{-1} , es decir, 0.0714 ng s^{-1} ó $0.035 \text{ ng s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$.

4.2.2.3 Microscopía óptica

La superficie del electrodo fue analizada utilizando un microscopía óptico de alta resolución. En la figura 30. Se presentan las imágenes de un electrodo de grafito obtenidas antes y después de repetitivos barridos de potencial en el intervalo de 0.4 V a -0.2 V vs Ag/AgCl(sat) en solución tampón de fosfato (0.1 mol L^{-1} , pH 6.5) que contenía 8 mmol L^{-1} de catecol y PPO libre catalizando la oxidación enzimática a *o*-quinona. En la figura 30 (B) se observa la modificación de la superficie visible, atribuida al ensuciamiento.

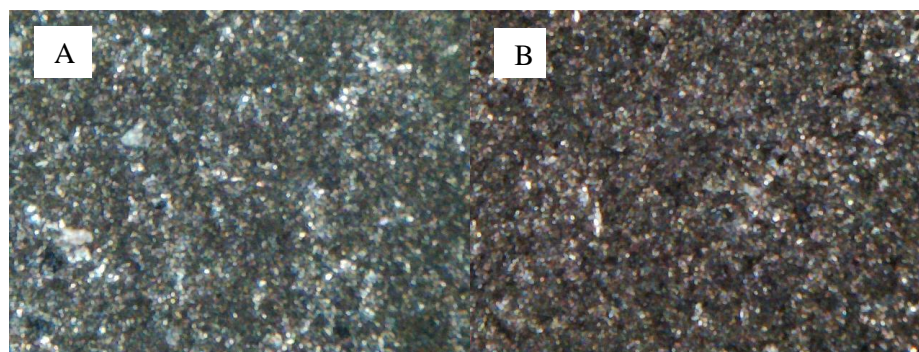
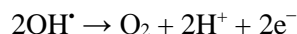


Figura 31. Imágenes de la superficie de un electrodo de grafito antes (A) y (B) después de reacciones consecutivas que conducen al ensuciamiento de la superficie.

La estrategia adoptada en este trabajo para superar los problemas de ensuciamiento del electrodo, consistió en la aplicación de una forma de onda de potencial de pulsos apropiada. Como el potencial de pico catódico para la reducción de la *o*-quinona es igual a $+0.170 \pm 0.001 \text{ V}$ frente Ag, AgCl(sat) (Figura 28), el potencial de detección se estableció mucho más negativo, en 0.00 V vs Ag/AgCl(sat) para asegurar una tasa de reducción más rápida. El potencial de limpieza óptimo para la regeneración *in situ* de la superficie del electrodo se encontró que era $+1.40 \text{ V}$ frente Ag/AgCl(sat).

De acuerdo a datos reportados en la literatura, los electrodos sucios podrían ser reactivados por la polarización anódica de potenciales. Se considera que la regeneración del electrodo podría atribuirse a la acción simultánea de los radicales hidroxilos producidos y el oxígeno liberado lo que

provoca, simultáneamente la oxidación y la destrucción mecánica de la película polimérica que obstruye la superficie.



Como se ha demostrado en la literatura, el prolongado tiempo de reactivación mejora la regeneración del electrodo [17]. Por lo tanto, el potencial de detección se aplicó sólo por 66.64 ms, pero la duración del potencial de la limpieza fue 166.6 ms. Estos valores fueron seleccionados como múltiplos del período de línea de energía eléctrica de 16.66 ms para minimizar el ruido.

La RSD, utilizada para representar la precisión de las determinaciones realizadas aplicando el conjunto de parámetros de potenciales de pulsos mencionados (potencial de detección: en 0.00V y potencial de limpieza +1.40 V), hallado fue 2.97% para n=5, y 0.6 mmol L⁻¹ de catecol. Mientras que la RSD de las determinaciones por amperometría de pulsos, aplicando un potencial de limpieza de 1.20 V/Ag, AgCl(sat) para n=5, 0.6 mmol L⁻¹ catecol fue 4.45%; y para las determinaciones amperométricas sin etapa de limpieza, es decir a un solo potencial para n=5, 0.6 mmol L⁻¹ catecol, la RSD fue 6.53%.

4.2.3 Determinación de compuestos fenólicos

La cuantificación de compuestos fenólicos por el biosensor basado en PPO con detección por amperometría de pulsos implicó la siguiente secuencia de reacciones: (i) conversión de compuestos fenólicos a *o*-quinona por la PPO inmovilizada, y (ii) reducción electroquímica de *o*-quinona. La corriente de reducción de *o*-quinona, se registró a un potencial de 0.00 V/Ag, AgCl(sat) durante 66.64 ms, seguido de la limpieza *in situ* de la superficie del electrodo y la reactivación, realizada aplicando un potencial de limpieza de 1.40 V/Ag, AgCl(sat) por 166.6 ms. La Figura 31A ilustra la respuesta del biosensor de PPO después de adiciones sucesivas de alícuotas de compuestos fenólicos a la PBS 0.1 mol L⁻¹ (pH 6.5) bajo agitación constante (750 rpm). Las curvas de calibración correspondientes se presentan en la Figura 31B.

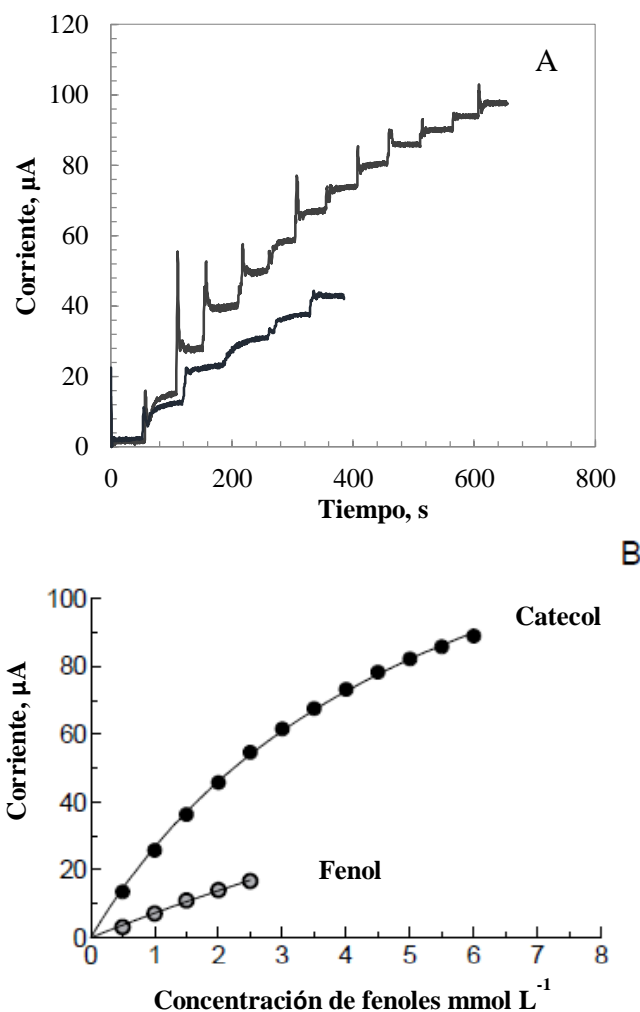


Figura 32. (A) Respuesta de tiempo real del biosensor basado en la PPO a concentraciones crecientes de compuestos fenólicos; (B) Gráfica de calibración para la determinación de fenol y catecol. 25°C, pH 6.5, 750 rpm. $E_d=0.00$ V vs Ag/AgCl(sat), $E_d=66.64$ ms, $E_c=+1.40$ V vs Ag/AgCl(sat) y $E_c=166.6$ ms.

Como se muestra en la Figura 31B, el fenol y catecol podrían ser controlados en un gran rango dinámico lineal de concentración: hasta 2.5 mmol L^{-1} para la catecol, y de hasta 2.0 mmol L^{-1} para el fenol. La sensibilidad de la determinación de catecol fue $22.94 \text{ } \mu\text{A mmol L}^{-1}$, con un coeficiente de correlación de $R^2= 0.9889$; fue mayor que la sensibilidad de la determinación de fenol con $7.10 \text{ } \mu\text{A mmol L}^{-1}$ y $R^2= 0.9980$, lo cual es consistente con los valores de la constante aparente de Michaelis-Menten K_M^{app} para la PPO inmovilizada en presencia de catecol (5.46 mmol L^{-1}) y fenol (9.65 mmol L^{-1}), establecida en este trabajo. El orden de disminución de sensibilidad está de acuerdo con los datos reportados en la literatura [7], [12-15], [18], [19].

El límite de detección, se calculó sobre la base de la relación señal-ruido=3, se encontró que era $2.1 \mu\text{mol L}^{-1}$ para la catecol, y $5.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ para el fenol. Estos LD son más altos que el reportado para los biosensores de PPO modificados con nanomateriales, que varían en el intervalo $0.2\text{-}0.84 \mu\text{mol L}^{-1}$ de catecol [19], [4], y $0.006\text{-}0.21 \mu\text{mol L}^{-1}$ para la determinación de fenol [20]. Sin embargo, son similares a los alcanzados con pasta de carbón, de óxido de indio y estaño, y sensores serigrafados de Pt y PPO para la cuantificación catecol ($1.0\text{-}1.7 \mu\text{mol L}^{-1}$) [4].

El principal aspecto considerado en esta investigación fue la precisión de la cuantificación de compuestos fenólicos garantizando la alta estabilidad operacional del biosensor, debido a la regeneración constante de la superficie del electrodo aplicando una forma de onda de potencial de pulsos apropiada. La RSD para 10 determinaciones consecutivas de catecol en el rango de $0.5\text{-}6 \text{ mmol L}^{-1}$ se encontró que era 3.06%, y la RSD para 10 determinaciones sucesivas de fenol en el intervalo de $0.5\text{-}2.5 \text{ mmol L}^{-1}$ se encontró que era 3.19%. Esta buena repetibilidad fue alcanzada por otros autores [19] aplicando detección amperométrica de un solo potencial sólo para bajas concentraciones de sustrato (0.1 a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ catecol). Tembe et al., reportan una disminución en la respuesta de electrodo enzimático para una alta concentración de catecol (7.0 mmol L^{-1}), lo que se atribuye al lento ensuciamiento de la superficie por el producto de la reacción [10].

La precisión de las determinaciones se evaluó mediante experimentos de recuperación catecol en las muestras de agua del grifo del laboratorio de electroquímica. Los resultados obtenidos se incluyen en la Tabla 9. Las altas recuperaciones de catecol mostraron resultados satisfactorios con un promedio en el rango de 98%-102%, 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 9. La recuperación de la catecol en el agua del grifo del laboratorio de electroquímica.

Muestra	Catecol agregado, $\mu\text{mol L}^{-1}$	Catecol encontrado, $\mu\text{mol L}^{-1}$	Recuperación %
Agua del grifo del laboratorio	250	254	101.6
de electroquímica	500	500	100.0
	1000	981	98.1

4.2.3.1 Estabilidad

La estabilidad del biosensor se evaluó mediante el registro periódico de la respuesta obtenida con 4 mmol L^{-1} de catecol, realizando las medidas en el medio de trabajo 0.1 mol L^{-1} PBS, pH 6.5 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 9 días, partir de ese día comienza a disminuir la corriente promedio medida. La respuesta estable se atribuyó a la buena inmovilización de la enzima en la estructura suave y húmeda del quitosano, lo que permite la preservación actividad de la enzima, y la regeneración y limpieza de la superficie del electrodo mediante la aplicación de amperometría de pulsos.

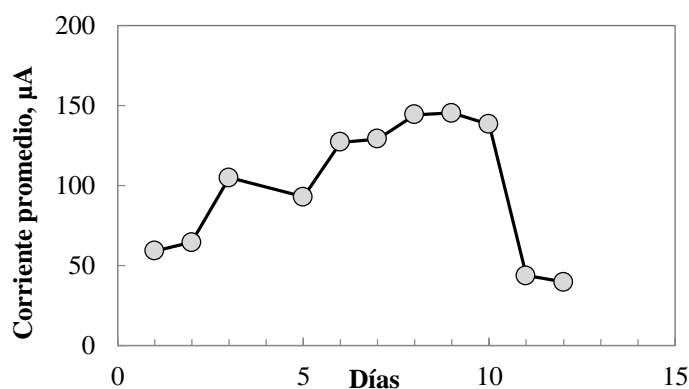


Figura 33. Estabilidad del biosensor de PPO

4.2.4 Determinación de atrazina

El método propuesto para la detección por amperometría de pulsos de compuestos fenólicos por un biosensor de PPO se extendió a la cuantificación del herbicida atrazina. La atrazina es un compuesto inactivo electroquímicamente, por ello la determinación de atrazina por biosensores amperométricos basados en PPO se basa en la cuantificación de la inhibición de la actividad biológica de la enzima PPO, mediante la medición de la disminución de la corriente de reducción de *o*-quinonas producidas enzimáticamente, en función de la concentración de atrazina [16], [21-24].

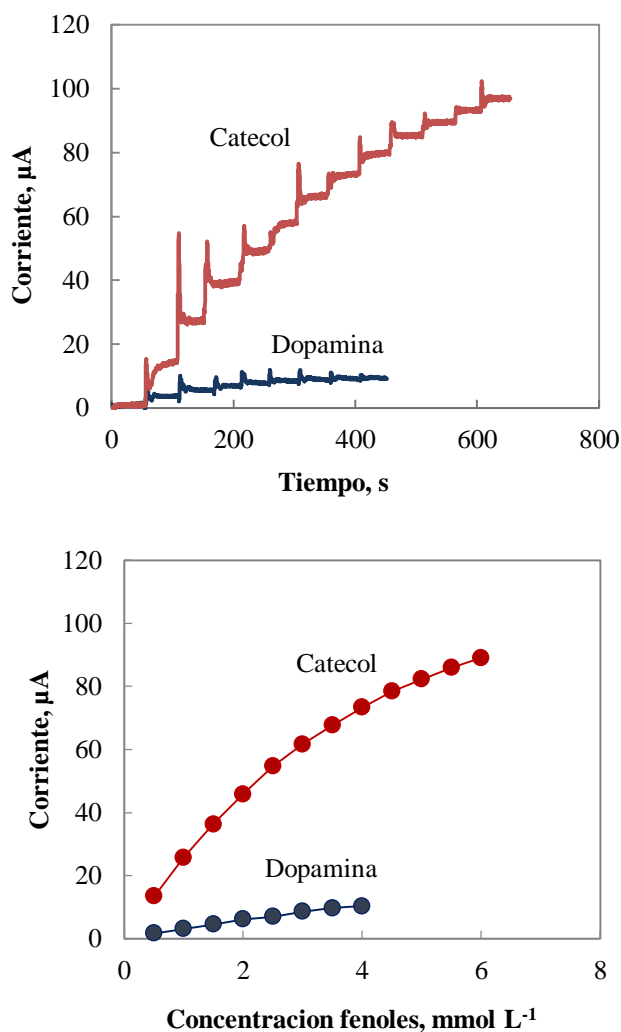


Figura 34. (A) Detección amperométrica de catecol y dopamina. (B) Gráfica de calibración para la determinación de catecol y dopamina a 25°C, pH 6.5, 750 rpm. $E_d=0.00\text{ V}$ vs Ag/AgCl(sat), $E_d=66.64\text{ ms}$, $E_{cl}=+1.40\text{ V}$ vs Ag/AgCl(sat) y $E_{cl}=166.6\text{ ms}$.

Se realizaron determinaciones de dos *o*-difenoles: catecol y dopamina con el biosensor de PPO basado en PAD (Figura 33), y posteriormente se realizaron estudios cinéticos. El valor de la K_M para la PPO usando dopamina y el catecol como sustratos la cual sigue un modelo cinético postulado por Michaelis-Menten, se estimó por la gráfica de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk (Figura 34), calculándose en 7.87 mmol L^{-1} y 5.46 mmol L^{-1} respectivamente.

Como se sabe a valores altos de la constante de Michaelis-Menten (K_M) indican menor afinidad por el sitio activo de la enzima (predominan las formas E y S libres) [17, 25], por lo tanto la dopamina

fue seleccionada como sustrato de la PPO para los ensayos de inhibición con atrazina debido a su menor afinidad por la enzima (K_M alto) en comparación con catecol.

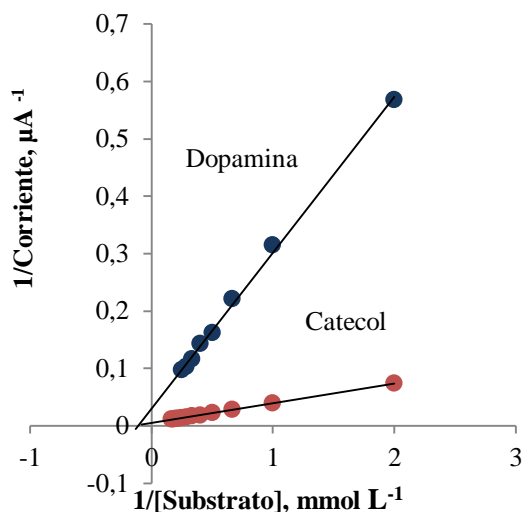


Figura 35. Gráfico dobles recíprocos de Lineweaver-Burk.

La determinación de atrazina influye en la disminución de la actividad de la PPO, la cual es expresada como la disminución de la corriente a una concentración de sustrato constante $[S]$. En la Figura 35A), se añadieron 0.5 mmol L^{-1} de dopamina a la celda electroquímica, y cuando la corriente permaneció estable se agregó atrazina y se observó una disminución de corriente con cada adición de atrazina. Esta disminución de la corriente es debida al efecto inhibitorio de la atrazina hacia la actividad de la PPO.

La curva de calibración correspondiente se presentan en la Figura 35B. La relación entre la corriente de reducción de dopamina I y disminución de la concentración de atrazina C_A , es lineal en el rango estudiado de 50 a 250 µmol L^{-1} con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.9861$ y una ecuación de regresión $I = 0.031C_A$, es decir, la sensibilidad de la determinación de atrazina fue de $31 \text{ µA mmol L}^{-1}$. El límite de detección, que se estimado sobre la base de la relación señal/ruido=3, resulto ser de 6 µmol L^{-1} . Este LD está cerca de los valores alcanzados aplicando sensores amperométricos de PPO basados en electrodos de carbono vítreo o de oro modificados con poli (pirrol) [16, 21], electrodos modificados con sol-gel [26], y electrodos de oxígeno tipo Clark [27] (Tabla 10).

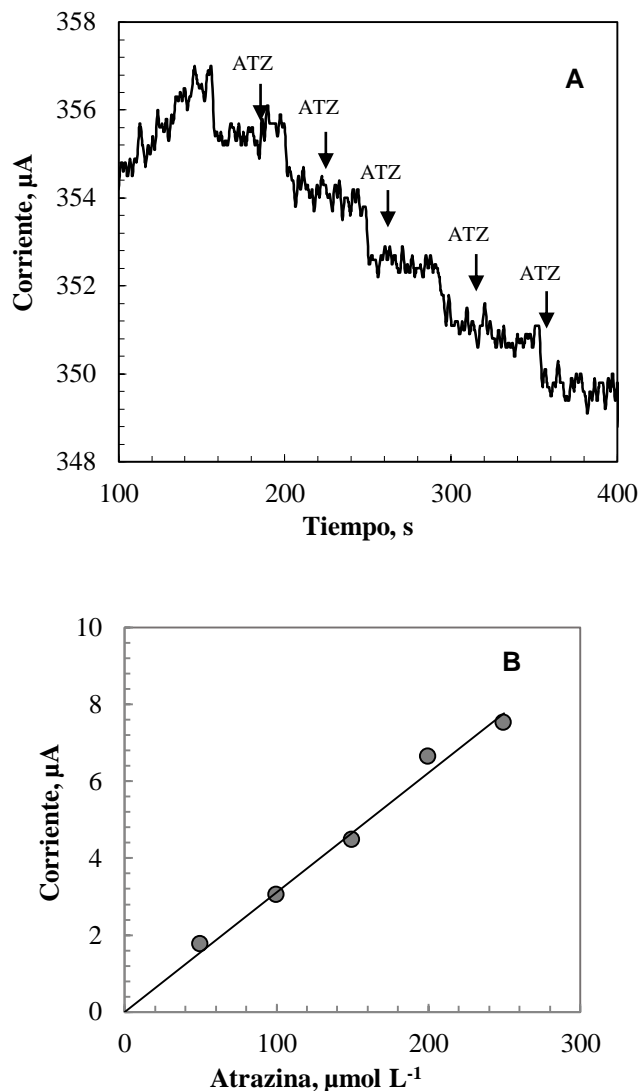


Figura 36. (A) Respuesta corriente vs tiempo del biosensor basado en PPO en presencia de dopamina y adiciones sucesivas de ATZ; (B) Curva de calibración para la determinación de ATZ. 25°C, pH 6.5, 750 rpm; $E_d=0.00$ V vs Ag/AgCl(sat), $\tau_d=66.64$ ms, $E_{cl}=+1.40$ V vs Ag/AgCl(sat) y $\tau_{cl}=166.6$ ms.

Tabla 10. Principales características analíticas de algunos biosensores amperométricos de PPO que aplican para la cuantificación de atrazina.

LD, µM	Rango lineal, µM	Ref.
4.0	-	[16]
4.6	-	[21]
5.5	10-100	[26]
10	20-130	[27]
6.0	50-250	Este trabajo

La Figura 36, muestra el gráfico lineal según Lineweaver-Burk en ausencia (sin inhibidor) y presencia de atrazina (inhibidor competitivo); en esta grafica el intercepto en el eje “y” es el mismo para ambos casos, es decir el inhibidor no afecta la velocidad máxima de la reacción enzimática, sin embargo, la pendiente de la curva se incrementa. Aquí, el valor de la $K_M = 8.72$ en ausencia y $37.43 \text{ mmol L}^{-1}$ en presencia de atrazina, el valor de la constante de Michaelis-Menten K_M es más grande en la situación en que el inhibidor está presente. Esto indica que la atrazina es un inhibidor competitivo de la PPO, por lo que la atrazina sólo se une a la enzima libre en lugar del complejo enzima-sustrato. Debido a que el sustrato y el inhibidor compiten por el mismo lugar, el grado de inhibición de la PPO inmovilizada se incrementa al aumentar la concentración del inhibidor y disminuye con la concentración del sustrato.

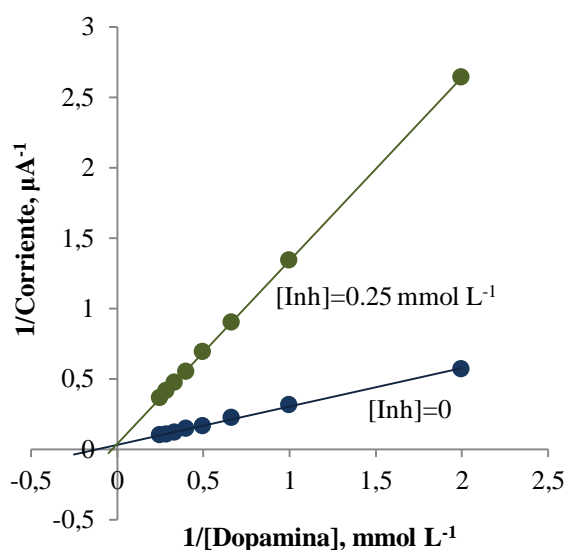


Figura 37. Representación de Lineweaver-Burk, curva de $1/V$ vs $1/S$ (inserción) con y sin inhibidor (atrazina).

La reversibilidad del proceso inhibitorio permitió la recuperación de la actividad enzimática el lavado de la película de hidrogel con la enzima con solución, amortiguadora, es decir que el biosensor puede ser usado múltiplemente. La desviación estándar relativa (RSD) de la respuesta del biosensor para sucesivas determinaciones ($N=5$), se llevó a cabo en las mismas condiciones y se encontró que era 4.84% para concentración de $[S]=0.5 \text{ mmol L}^{-1}$.

REFERENCIAS CAPITULO IV

- [1] Takka, S., and Gurel, A. Evaluation of chitosan/alginate beads using experimental design: formulation and in vitro characterization. *AAPS PharmSciTech.* (2010), 11:460.
- [2] Toscano, L., Montero, G., Stoytcheva, M., Cervantes, L., and Gochev, V. Comparison of the performances of four hydrophilic polymers as supports for lipase immobilization. *Biotechnol Biotechnol Equip.* (2014), 28: 52.
- [3] Lee, J., Xu, G., Kim, B., and Choi, W. Amperometric tyrosinase biosensor based on carbón nanotube-doped sol-gel-derived zinc oxide-nafion composite films. *Electroanalysis.* (2011), 23:962.
- [4] Vicentini, F., Janegitza, B., Brett, C., and Fatibello-Filhoa, O. Tyrosinase biosensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and 1-butyl-3-methylimidazolium chloride within a dihexadecylphosphate film. *Sensors and Actuators B.* (2013), 188:1101.
- [5] Faria, R., Moure, V., Amazonas, M., Krieger, N., and Mitchell, D. The biotechnological potential of mushroom tyrosinases. *Food Technol. Biotechnol.* (2007), 45, p. 287.
- [6] Bieganski, A., Michota, A., Bukowska, J., and Jackowska, K. Immobilization of tyrosinase on poly(indole-5-carboxylic acid) evidenced by electrochemical and spectroscopic methods, *Bioelectrochemistry.* (2006), 69: 41.
- [7] Yildiz, H., Castillo, J., Guschin, D., Toppare, L., and Schuhmann, W. Phenol biosensor based on electrochemically controlled integration of tyrosinase in a redox polymer, *Microchim Acta.* (2007), 159: 27.
- [8] Nistor, C., Emnéus, J., Gorton, L., and Ciucu, A. Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds, *Anal. Chim. Acta.* (1999), 387, 309.
- [9] Cosnier, S., Szunerits, S., Marks, R., Lellouche, J., Perie, K. Mediated electrochemical detection of catechol by tyrosinase-based poly(dicarbazole) electrodes, *J. Biochem. Biophys. Methods.* (2001), 50, 65.

- [10] Tembe, S., Inamdar, S., Haram, S., Karve, M., Souza, S. Electrochemical biosensor for catechol using agarose–guar gum entrapped tyrosinase, *J Biotechnol.* (2007), 128, 80.
- [11] Sauerbrey, G. The use of quartz crystal oscillator for weighing thin layers and for microweighing applications. *Z. Phys. Chem.* (1959), 155, 206.
- [12] Qu, Y., Ma, M., Wang, Z., Zhan, G., Li, B., Wang, X., Fang, H., Zhang, H., Li, C. Sensitive amperometric biosensor for phenolic compounds based on graphene–silk peptide/tyrosinase composite nanointerface. *Biosens. Bioelectron.* (2013), 44, 85.
- [13] Song, W., Li, D., Li, Y., and Long, T. Disposable biosensor based on graphene oxide conjugated with tyrosinase assembled gold nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* (2011), 26, 3181.
- [14] Hedenmo, M., Narváez, A., Domínguez, E., and Katakis, I. Improved mediated tyrosinase amperometric enzyme electrodes. *J. Electroanal. Chem.* (1997), 425, 1.
- [15] Li, N. Xue, M., Yao, H., and Zhu, J. Reagentless biosensor for phenolic compounds based on tyrosinase entrapped within gelatine film. *Anal. Bioanal. Chem.* (2005), 383, 1127.
- [16] Besombes, J. Cosnier, S., Labbé, P., and Reverdy, G. A biosensor as warning device for the detection of cyanide, chlorophenols, atrazine and carbamate pesticides. *Anal. Chim. Acta.* (1995), 311, 255.
- [17] Wang, J., and Shari, M. Mixed plant tissue-carbon paste bioelectrode. *Anal. Chem.* (1988), 40, 1545.
- [18] Fan, Q., Shan, D., Xue, H., He, Y., and Cosnier, S. Amperometric phenol biosensor based on laponite clay–chitosan nanocomposite matrix. *Biosens. Bioelectron.* (2007), 22, 816.
- [19] Lee, J. Xu, G., Kim, B., Choi, H., and Lee, W. Amperometric tyrosinase biosensor based on carbon nanotube-doped sol-gel-derived zinc oxide–nafion composite films. *Electroanalysis.* (2011), 23, 962.
- [20] Carralero, V. Mena, M., González-Cortes, A., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J. Development of a high analytical performance-tyrosinase biosensor based on a composite graphite–Teflon electrode modified with gold nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* (2006), 22, 730.
- [21] McArdie, F. and Persaud, K. Development of an enzyme-based biosensor for atrazine detection. *Analyst.* (1993), 118, 419.

- [22] Wang, J., Nascimento, V., Kane, S., Rogers, K., Smith, M., and Angnes, L. Screen-printed tyrosinase-containing electrodes for the biosensing of enzyme inhibitors. *Talanta*. (1996), 43, 1903.
- [23] Védrine, C., Fabiano, S., and Tran-Minh, C. Amperometric tyrosinase based biosensor using an electrogenerated polythiophene film as an entrapment support. *Talanta*. (2003) 59, 535.
- [24] Yu, Z., Zhao, G., Liu, M., Lei, Y., and Li, M. Fabrication of a novel atrazine biosensor and its subpartper - trillion levels sensitive performance. *Environ. Sci. Technol.* (2010), 44, 7878.
- [25] Navaratne, A., Shan, M., and Rechnitz, G. Eggplant-based bioamperometric sensor for the detection of catechol *Anal. Chim. Acta*, (1990), 237, 107.
- [26] Majidi, M., Asadpour-Zeynali, K., and Gholizadeh, S. Sol-gel-derived biosensor based on plant tissue: The inhibitory effect of atrazine on polyphenol oxidase activity for determination of atrazine. *J. Chin. Chem. Soc.* (2008), 55, 522.
- [27] Mazzei, F., Botrè, S., Lorenti, G., Simonetti, G., Porcelli, F., Scibona, G., Botrè, C. Plant tissue electrode for the determination of atrazine. *Anal. Chim. Acta*. (1995), 316, 79.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES GENERALES

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

1. Los biosensores de PPO diseñados mediante los dos tipos de sistemas de inmovilización enzimáticos considerados, atrapamiento en membrana enzimática desechable y atrapamiento con quitosano entrecruzado con glutaraldehído, proporcionan respuestas adecuadas y repetibles en la determinación de compuestos fenólicos.
2. Se desarrolló y probó un método sencillo y eficaz para la determinación de fenoles, utilizando un electrodo tipo Clark con membrana enzimática desechable. Las membranas de la enzima desechables fueron elaboradas con filtros de acetato de celulosa y con recubrimiento de PPO mediante el uso de un hidrogel biocompatible. La estrategia propuesta permitió el alcanzar una RSD de 1.22% para la cuantificación catecol con sensibilidad $0.89 \mu\text{A mmol L}^{-1}$. Las membranas obtenidas se pueden almacenar por separado y utilizarse en el montaje del biosensor cuando sea necesario. La sustitución de la membrana de la enzima es muy simple y se puede realizar en condiciones de campo.
3. Un nuevo biosensor con detección por PAD ha sido desarrollado para la determinación de la atrazina y compuestos fenólicos: catecol y fenol; mediante la aplicación de un potencial de $+1.4 \text{ V vs Ag/AgCl(sat)}$ con una duración de 166.66 ms para la limpieza *in situ* y reactivación de la superficie del electrodo. El biosensor mostró no sólo buenas propiedades electrocatalíticas hacia los fenoles, sino también como un biosensor inhibición para la atrazina. Las determinaciones de fenol y catecol se puede realizar en el intervalo de 0.5 a 2.0 mmol L^{-1} y 0.5 a 2.5 mmol L^{-1} respectivamente; con un límite de detección de 5.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ y 2.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. La determinación de la atrazina se puede realizar en el intervalo de 50-250 $\mu\text{mol L}^{-1}$, se obtuvo un límite de detección de 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$. La buena estabilidad, la reutilización, la selectividad y la vida útil del biosensor, además, de su bajo costo y fabricación simple y rápida, hacen que sea superior a otras técnicas.

4. La formación de la película de polímero sobre la superficie del electrodo de trabajo durante las determinaciones de fenoles fue demostrada experimentalmente aplicando diversas técnicas (voltametría cíclica, amperometría, EQCM, y microscopía óptica).
5. Las altas recuperaciones de catecol en agua del grifo del laboratorio de electroquímica mostraron resultados satisfactorios con un promedio en el rango de 98%-102%, 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.
6. La aplicación del enfoque propuesto (limpieza electroquímica por PAD) permitió la obtención de una RDS de 2.97% para la determinación 0.6 mmol L^{-1} catecol en comparación con el de 6.53% obtenido por amperometría de un solo potencial.

Con base en las observaciones realizadas y en función a los problemas presentados a lo largo del desarrollo del trabajo se plantea:

- Se debe perfeccionar el método de preparación de membranas enzimáticas, en aspectos tales como: explorar con hidrogeles de otros polímeros y otros agentes entrecruzante, además, de ensayar con otro rango concentraciones diferentes a las empleadas en esta tesis.
- Determinar otros compuestos fenólicos y pesticidas con interés ecológico y analizar su interacción con las membranas enzimáticas.

El siguiente paso será probar muestras reales y las posibles interferencias en la determinación de los compuestos mencionados por los dos biosensores amperométricos.

ANEXO A

PUBLICACIONES

Capítulos de libro

1. **M. T. Beleño**, M. Stoytcheva, R. Zlatev, G. Montero, R. Torres, B. Jaramillo. Biosensors for Atrazine Determination: A Review. Nova Science Publishers. 2015. ISBN: 978-1-63463-652-0.

Artículos indexados

1. M. Stoytcheva, R. Zlatev, V. Gochev, Z. Velkova, G. Montero, **M.T. Beleño**. Amperometric biosensors precision improvement. Application to phenolic pollutants determination. J. Electrochimica Acta. 2014, 147: p. 25-30.

2. M. Stoytcheva, R. Zlatev, **M.T. Beleño**, G. Montero. Detection of phenolic compounds by tyrosinase modified Clark type electrode. J. Current Analytical Chemistry, 2015, 11, 50-55.

OTROS PRODUCTOS

Artículos en extenso

1. **Beleño Mary Triny**, Stoytcheva Margarita, Zlatev Roumen, Montero Gisela, Torres Ricardo., (2014). Determinación de atrazina aplicando amperometría de pulsos y usando un sensor basado en polifenol oxidasa. En XVII Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas Agricultura sustentable: Uso eficiente del agua, suelo y fertilizantes del Instituto de Ciencias Agrícolas, pp. 309-313. Mexicali, México. UABC. ISBN 978-0-9908236-1-2.

2. **Beleño Mary Triny**, Stoytcheva Margarita, Zlatev Roumen, Montero Gisela, Torres Ricardo., Jaramillo Beatriz. Aplicaciones de la amperometría de pulsos para la determinación precisa de contaminantes ambientales. XXXVI encuentro nacional de la AMIDIQ. Cancún. Quintana Roo, 5 al 8 de mayo 2015.

3. Margarita Stoytcheva, Roumen Zlatev, Gisela Montero, **Mary Triny Beleño**, Benjamín Valdez, Michel schorr., (2014). Phenolic compounds determination using enzyme modified Clark type electrode. En materials for Biosensor Applications Symposium at the XXIII International Materials Reasch Congress held in Cancún México. ISBN: 978-607-8272-18-1.
4. Torres Ricardo, Montero Gisela, **Beleño Mary Triny**, Toscano Lydia, Pérez Laura Janet, Romero Erick Enrique., (2014). Evaluación de taninos condensados en paja de trigo y corteza de vara de algodón del valle de Mexicali, México. En XVII Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas Agricultura sustentable: Uso eficiente del agua, suelo y fertilizantes del Instituto de Ciencias Agrícolas, pp. 510-514. Mexicali, México. UABC. ISBN 978-0-9908236-1-2.
5. Torres Ricardo, Montero Gisela, **Beleño Mary Triny**, Toscano Lydia, Valdez Benjamín, Jaramillo Beatriz Eugenia., (2014). Efectos de la aplicación de ceniza lignocelulósica sobre el contenido de nitrógeno en suelo orgánico. En XVII Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas Agricultura sustentable: Uso eficiente del agua, suelo y fertilizantes del Instituto de Ciencias Agrícolas, pp. 70-73. Mexicali, México. UABC. ISBN 978-0-9908236-1-2.
6. Ricardo Torres Ramos, Gisela Montero Alpírez, Beatriz Eugenia Jaramillo Colorado, Marcos Alberto Coronado Ortega, Erick Enrique Romero Uscanga, **Mary triny Beleño Cabarcas**. (2014). Estudio preliminar para la caraterizacion de paja de trigo del valle de Mexicali. En XXXV Encuentro Nacional de la Academida Mexicana de Investigacion y Docencia en Ingenieria Química, pp 2083-2088. Puerto Vallarta, Jalisco, Mexico. ISBN 978-607-95593-2-8.
7. Romero Erick, Montero Gisela, Toscano Lydia, Pérez Laura, Torres Ricardo, **Beleño Mary Triny**. (2014). Determinación de los principales componentes de la biomasa lignocelulosica; celulosa, hemicelulosa y lignina de la paja de trigo para su posterior pretratamiento biológico. En XVII Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas Agricultura sustentable: Uso eficiente del agua, suelo y fertilizantes del Instituto de Ciencias Agrícolas, pp. 114-118. Mexicali, México. UABC. ISBN 978-0-9908236-1-2.
8. Torres Ricardo., Montero Gisela., Jaramillo Beatriz E., **Beleño Mary Triny.**, Pérez Laura., Romero Erick, Ayala Ramon, Coronado Marcos. Determinación del contenido energético de la lignina obtenida a partir de vara de algodón del Valle de Mexicali, México. XXXVI encuentro nacional de la AMIDIQ. Cancún. Quintana Roo, 5 al 8 de mayo 2015.

9. Cesar Iñiguez, Roumen Zlatev, Margarita Stoytcheva, Jean-Pierre Magnin, Esmeralda Rodriguez, Ana Cecilia Mares, **Mary Triny Beleño**. Comparacion de la produccion fotosintetica de hidrogeno por dos variedades de la cepa bacteriana *R. Capsulatus*. XXXVI encuentro nacional de la AMIDIQ. Cancún. Quintana Roo, 5 al 8 de mayo 2015.

10. Margarita Stoytcheva, Roumen Zlatev, Gisela Montero, José Ángel León, **Mary Triny Beleño**. Nuevo método espectrofotométrico para la medición de la actividad de las lipasas. XXXVI encuentro nacional de la AMIDIQ. Cancún. Quintana Roo, 5 al 8 de mayo 2015.

In: Advances in Biosensors Research
Editor: Thomas G. Everett

ISBN: 978-1-63463-652-0
© 2015 Nova Science Publishers, Inc.

Chapter 4

**BIOSENSORS FOR ATRAZINE
DETERMINATION: A REVIEW**

M. T. Beleño¹, M. Stoytcheva^{1}, R. Zlatev¹, G. Montero¹,
R. Torres¹ and B. Jaramillo²*

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

²University of Cartagena,
Faculty of Exact and Natural Sciences, Cartagena, Colombia

ABSTRACT

Atrazine is one of the most widely used herbicides for weeds treatment in crops. Nevertheless, its toxicity, high persistence and low biodegradation rate provoke serious environmental and health problems. Having in mind that atrazine use is not restricted in USA and Latin America, the analytical determination of atrazine residues in food, drinking water, and environmental samples is of primary importance. Thus, in this report different methods currently applied for atrazine analysis are reviewed, emphasizing those that use biosensor technology. The principle of functioning of the electrochemical, optical and piezoelectric biosensors is detailed, considering these devices as a reliable tool for atrazine quantification.

* Address correspondence to this author at the Autonomous University of Baja California, Engineering Institute, Mexicali, Mexico. Tel: 52 686 5664150; Fax: 52 686 5664150; E-mail: margarita.stoytcheva@uabc.edu.mx.



Contents lists available at ScienceDirect

Electrochimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/electacta

Amperometric biosensors precision improvement. Application to phenolic pollutants determination



M. Stoytcheva^{a,*}, R. Zlatev^a, V. Gochev^b, Z. Velkova^c, G. Montero^a, M.T. Beleño^a

^a Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería, México, México

^b Plovdiv University, Dep. Biochemistry and Microbiology, Plovdiv, Bulgaria

^c Medical University of Plovdiv, Dep. Chemistry and Biochemistry, Plovdiv, Bulgaria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 July 2014

Received in revised form 14 September 2014

Accepted 22 September 2014

Available online 28 September 2014

Keywords:

Phenols

Polyphenol oxidase

Biosensor

Pulsed amperometric detection

ABSTRACT

Electrodes fouling associated with the electroenzymatic phenols determination was characterized in this work, applying various techniques such as cyclic voltammetry, amperometry, EQCM, and optical microscopy. An approach to overcome the fouling effects and hence to improve the precision of the phenolic compounds determination was suggested and tested. This approach consists of pulsed potential waveform application with a cleaning potential step of +1.4 V vs. Ag/AgCl/KCl_{sat} with a duration of 166.66 ms, while the determination was carried out at 0.0 V vs. Ag/AgCl/KCl_{sat} applied for 66.64 ms. As a result a RSD of 2.97% for 0.6 mmol L⁻¹ o-catechol determination was achieved, compared with 6.53% without the cleaning step application. The method was successfully used for the precise phenolic and triazine pollutants determination.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Phenols or phenolics are a large group of compounds of natural and anthropogenic origin [1]. The indiscriminate release of wastes generated during dyes, chemicals, textiles, resins, and plastics production, as well as during the processes of wood preservation, and petroleum refining causes phenolic compounds pollution [1]. Since phenolics are persistent in the environment and highly toxic [1], they are included in the EPA list of priority pollutants [2]. EPA sets the maximum concentration limit of phenol in water for the protection of public health at 3.5 µg L⁻¹ [3], while in the European Community the maximum admissible concentration of phenolic compounds in drinking water is 0.5 µg L⁻¹ for the total content and 0.1 µg L⁻¹ for the individual content [4]. The maximum levels of phenolics in surface water for drinking purposes should be in the 1–10 µg L⁻¹ range, depending on how it is treated [5]. Hence, a number of high sensitive chromatographic methods were suggested for phenolic compounds determination [6,7]. Nevertheless, they are not well suited for *in situ* analysis. Therefore, recent trends in analytical chemistry rely on the use of biosensors as an alternative to the above mentioned traditional techniques. Several biosensors were developed for phenolic compound determination

[8]. Most of them are amperometric and are based on tyrosinase. This enzyme catalyzes the *o*-hydroxylation of the monophenols to *o*-diphenols (monophenolase or cresolase activity), and the oxidation of the *o*-diphenols to the corresponding *o*-quinones (diphenolase or catecholase activity) in the presence of O₂. The analytical signal is the current of *o*-quinone reduction, proportional to the phenolic compound concentration. Since tyrosinase is an instable enzyme, current efforts are devoted to the development of appropriate immobilization protocols using various approaches and immobilization matrices to guarantee the operational and storage stability of the biosensors. These protocols typically involve enzyme entrapment in polymers [9–11] and hydrogels [12–14], incorporation within carbon paste [15], or immobilization onto nanomaterials modified electrodes [16–24]. Nevertheless, little attention is paid to another important drawback of the tyrosinase-based amperometric sensors for phenolics determination, namely sensitivity and precision alterations resulting from electrode fouling induced by the polymerization of the radicals formed during the enzymatic and electrochemical reactions sequence [25]. Hence, tyrosinase sensors based on the mediated reduction of *o*-quinone [26–33], and tyrosinase sensors which monitor the consumption of the oxygen cofactor applying Clark type electrode [34–36] were developed to bypass this problem. In contrast to these strategies, a simple and effective way to overcome electrode fouling problems is suggested in this work. It is based on the registration of the quinone reduction current in the absence of any mediator, along with the continuous

* Corresponding author. Tel.: +52 686 5664150; fax: +52 686 5664150.
E-mail address: margarita.stoytcheva@uabc.edu.mx (M. Stoytcheva).

[†] ISE member

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

50

Current Analytical Chemistry, 2015, 11, 50-55

Detection of Phenolic Compounds by Tyrosinase Modified Clark Type Electrode

Margarita Stoytcheva*, Roumen Zlatev, Mary Triny Beleño and Gisela Montero

Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería, 21280 Mexicali, México

Abstract: In this work is suggested a Clark type electrode with disposable enzyme membrane for phenols determination. This approach allows avoiding the electrode fouling by recording the oxygen reduction current, and obtaining a stable and reproducible sensor response. An appropriate method for enzyme membrane fabrication by cellulose acetate filters coating with tyrosinase through the use of biocompatible hydrogels was proposed and tested. The sensitivity of the catechol determination, as an example, was found to be $0.89 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{L}$. The detection limit equaled $1 \mu\text{mol L}^{-1}$. The achieved RSD was 1.22%.



Keywords: Clark type electrode, tyrosinase, catechol, disposable membrane, hydrogel.

1. INTRODUCTION

Phenol and its derivatives are a group of industrial pollutants. They enter the environment as by-products of the processes associated with dyes, chemicals, textiles, resins, and plastics production, wood preservation, and petroleum refining [1]. Because of their toxicity and persistence, most of them are included in the EPA list of priority pollutants [2]. To assess the risks which phenolic compounds pose, rapid and reliable methods for their determination have to be developed. The commonly applied chromatographic and immunoassays techniques [3, 4] are suitable for phenols determination in terms of sensitivity and accuracy, but they are not appropriate for *in situ* and *on line* measurements. In addition, they are expensive and time consuming. Therefore, the implementation of simple, portable, easy to use, and cost effective devices for the rapid and sensitive phenols determination is needed. The biosensors do satisfy these requirements.

Most of the biosensors for phenolics analysis are amperometric [5]. They quantify the quinoid products generated upon tyrosinase catalyzed oxidation of phenols by recording their reduction current, proportional to the phenols concentration (Fig. 1a). One of the main drawbacks of the biosensors based on the mentioned detection principle is associated with the electrode fouling. It is induced by the polymerization of the radicals formed during the enzymatic and electrochemical reactions sequence [6], and alters the sensitivity and the precision of the determinations. Hereafter, tyrosinase sensors which monitor the consumption of the oxygen cofactor applying Clark type electrode [7-9] were suggested to address this issue (Fig. 1b).

The Clark type electrode used as a transducer is portable and commercially available. The measurement is simple and free of interferences, since the unique electrochemical reaction taking place is the oxygen reduction occurring behind the polymer membrane of the oxygen probe, which is permeable for gases only. Typically tyrosinase is immobilized by cross linking with glutaraldehyde or by covalent bonds on the surface of polyamide netting [7, 9]. The obtained enzyme membranes are stretched over the polymer membrane of the oxygen electrode. However, the application of the suggested biosensors is restricted by the low stability and the limited enzyme binding to solid surfaces [10]. Therefore, tyrosinase containing plant tissue was confined between the polymer membrane of the oxygen probe and an external dialysis membrane [8]. Since the biological membrane can be substituted by another one, the biosensor was defined as "partially disposable". Nonetheless, the use of plant tissues with unpredictable enzyme activity may cause a lack of reproducibility.

Thus, in this work is suggested a Clark type electrode with disposable enzyme membrane for phenols determination. This approach allows avoiding the electrode fouling by recording the oxygen reduction current, and obtaining a stable and reproducible sensor response by using prefabricated disposable enzyme membranes. An appropriate method for enzyme membrane fabrication by cellulose acetate filters coating with tyrosinase through the use of biocompatible hydrogels was proposed and tested in this work.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagents

Tyrosinase (EC 1.14.18.1) was supplied by Spectrum Chemical, USA. Catechol, analytical grade, was purchased from Sigma. Catechol stock solution was prepared in deionized water and stored in darkness at 4°C. Various hydrosols were obtained by dissolving gelatin in distilled water at 60°C

*Address correspondence to this author at the Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería, 21280 Mexicali, México; Tel: +52 686 5664150; Fax: +52 686 5664150; E-mail: margarita.stoytcheva@uabc.edu.mx

XVII Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas
Agricultura sustentable: Uso eficiente del agua, suelo y fertilizantes
9 y 10 de Octubre de 2014

DETERMINACIÓN DE ATRAZINA APLICANDO AMPEROMETRIA DE PULSOS Y USANDO UN SENSOR BASADO EN POLIFENOL OXIDASA

Beleño Cabarcas Mary Triny¹, Stoytcheva Stilianova Margarita¹, Koytchev Zlatev Roumen¹, Montero Alpírez Gisela¹, Torres Ramos Ricardo¹.

¹Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Blvd. Benito Juárez y calle de la Normal S/N 21280 Mexicali, Baja California, México. matribecal1504@hotmail.com

Resumen

En el presente estudio se describe un nuevo enfoque para el análisis y determinación de residuos del herbicida atrazina, aplicando la técnica amperometría de pulsos y usando un sensor basado en polifenol oxidasa. La determinación de atrazina se basa en la cuantificación de la inhibición de la polifenol oxidasa, mediante la medición de la disminución de la corriente de reducción de *o*-quinonas en función de la concentración del herbicida. Las condiciones óptimas fueron 0.1 M de tampón de fosfato (pH 6.5), un escalón de potencial de limpieza de +1.4V/Ag, AgCl con una duración de 166.66 ms, mientras que la determinación se llevó a cabo a 0.0 V/Ag, AgCl para 66.64 ms. El límite de detección fue 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para la atrazina y la respuesta fue lineal en el rango de 50 a 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$. El biosensor fue estable incluso después de dos semanas de uso continuo.

Palabras claves: *Polifenol oxidasa, Atrazina, Amperometría de pulsos*

Abstract

A new approach to the analysis of the residues of the herbicide atrazine is described and tested in the present work. Namely, a polyphenol oxidase-based sensor with pulsed amperometric detection was applied, thus eliminating electrode fouling and passivation. The determination is based on the quantification of the polyphenol oxidase inhibition, which atrazine provokes, by measuring the decrease of the reduction current of the enzymatically generated quinones. Optimal conditions were 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5), cleaning potential of 1.4V/Ag, AgCl with a duration of 166.66 ms, whereas the determination was performed at 0.0 V/Ag, AgCl for 66.64 ms. The detection limit was 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for atrazine and the response was linear in the range of 50 to 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The biosensor was stable even after two weeks of continuous use.

Keywords: *Polyphenol oxidase, Atrazine, Amperometry pulse*

Introducción

Los herbicidas son ampliamente utilizados en la agricultura moderna con el fin de mantener y alcanzar una alta producción en los cultivos. La atrazina (ATZ) (3,5-triazina 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1, CAS 1912-24-9) pertenece al grupo de los herbicidas triazínicos. Es eficaz para detener un amplio espectro de maleza pre y post-emergencia de hoja ancha y gemíneas en cultivos de caña de azúcar, maíz, sorgo y trigo (Golla *et al.* 2011). Dado que la ATZ y sus metabolitos son persistentes en el medio ambiente, y altamente tóxicos para los seres humanos y animales; es importante el control continuo y el seguimiento de sus residuos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció un límite máximo admisible de 2 mg L^{-1} para ATZ y 100 mg L^{-1} para la ATZ, más sus metabolitos en agua para consumo humano (WHO, 2011), mientras que en los Estados Unidos de América (EUA) se fijó este límite en 3 $\mu\text{g/L}$ para agua del mismo uso (USEPA, 2003). Varios métodos instrumentales están disponibles para la

Mater. Res. Soc. Symp. Proc. Vol. 1763 © 2015 Materials Research Society
DOI: 10.1557/opl.2015.133

Phenolic Compounds Determination Using Enzyme Modified Clark Type Electrode

M. Stoytcheva, R. Zlatev, G. Montero, M.T. Beleño, B. Valdez, M. Schorr

Presenting author's email: mschorr2000@yahoo.com

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

ABSTRACT

Public health and environmental protection concerns provoked by phenolic compounds pollution impose the development of sensitive, rapid and cost effective methods for *in situ* phenols monitoring. Given that biosensors based techniques could face these challenges, a variety of such devices was suggested and applied for phenolic compounds quantification. Their majority are based on the polyphenol oxidase (PPO) catalyzed phenols oxidation to catechol and then, to quinones, coupled with the registration of the quinones reduction current. Nevertheless, quinoid products polymerization involving electrode passivation corrupts the biosensors operational stability. Thus, to avoid this drawback, in this work is proposed another approach for phenolic compounds quantification based on the electrochemical detection of the oxygen depletion during PPO catalyzed catechol oxidation using a Clark type electrode with a disposable active enzyme membrane. The oxygen probe was modified in comparison to the commercial ones: its flat front allowed ensuring a good contact with the active enzyme membrane and the gold multicathode uniformly dislocated on the surface of the flat front permitted eliminating O_2 diffusional constraints. The active enzyme membrane was prepared by drop-coating of a mixture of PPO and gelatin onto a gelatin-saturated cellulose filter. A linear calibration graph for catechol determination was obtained in the range up to 0.7 mM with a slope of 0.902 $\mu A/mM$, at pH 6.5 and ambient temperature. The steady-state response to catechol of the biosensor was reached in 120 s. The biosensor had an excellent reproducibility (RSD < 3%) due to the reliable enzyme immobilization technique, allowing the preparation of active enzyme membranes with identical characteristics. The proposed biosensor provided stable response and free of interferences measurements since the unique possible electrochemical reaction is O_2 reduction. Another biosensor advantage is associated with the use of disposable prefabricated active enzyme membranes.

INTRODUCTION

Phenolic compounds are important contaminants of groundwater and surface water. Many of them are toxic, which poses serious health risks to humans and animals. Because of their persistence in the environment these substances are considered as priority pollutants [1, 2]. The prolonged oral or subcutaneous exposure to catechol, as an example, damages liver, kidney and genitourinary tract [3]. Accordingly, phenols detection in low concentrations is of environmental and public concerns. Different analytical techniques for the quantification of phenol and its derivatives are proposed. The commonly used methods are gas chromatography [4, 5], high performance liquid chromatography [6], capillary electrophoresis [7], and spectrophotometry [8]. These methods, however, require tedious sample pretreatment and expensive instrumentation. Additionally, they are time consuming and not suitable for *in situ* monitoring. These drawbacks limit their practical application. In contrast, amperometric sensors based on enzymes provide an excellent alternative due to their advantages including compact

XVII Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas
 Agricultura sustentable: Uso eficiente del agua, suelo y fertilizantes
 9 y 10 de Octubre de 2014

EVALUACIÓN DE TANINOS CONDENSADOS EN PAJA DE TRIGO Y CORTEZA DE VARA DE ALGODÓN DEL VALLE DE MEXICALI, MÉXICO

Torres Ramos Ricardo¹, Montero Alpírez Gisela¹, Beleño Cabarcas Mary Triny¹, Toscano Palomar Lydia², Pérez Pelayo Laura Janet¹, Romero Uscanga Erick Enrique¹

¹ Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Blvd. Benito Juárez y calle de la normal S/N 21280 Mexicali, Baja California, México. ricardo_torres89@hotmail.com

² Instituto Tecnológico de Mexicali, Av. tecnológico S/N Mexicali, Baja California, México.

Resumen

Los cultivos de la agricultura herbácea generan grandes cantidades de material vegetal que podrían ser una fuente importante para la obtención de taninos condensados. El estado de Baja California es el segundo estado productor de trigo y algodón en México. La preponderante actividad agrícola que se desarrolla en el estado tiene lugar en el Valle de Mexicali. Dicha actividad generó en 2013 alrededor de 527,103 t de paja de trigo y 142,377 t de vara de algodón. El objetivo de esta investigación fue evaluar el contenido de taninos condensados en la corteza de vara de algodón del género *Gossypium hirsutum* L. y en la paja de trigo del género *Triticum aestivum* L., residuos del Valle de Mexicali, usando el método gravimétrico Número Stiasny y etanol como solvente de extracción. Los extractos etanólicos secos se caracterizaron por espectrofotometría infrarroja. Los resultados experimentales indican que el porcentaje de extraíbles en etanol fue 15.29 % para corteza de vara de algodón y 10.36 % para paja de trigo. Mientras el rendimiento de taninos condensados en la corteza de vara de algodón fue 8.71 % y en la paja de trigo fue 5.53 %. Los espectros obtenidos revelan los grupos funcionales característicos de los polifenoles en los extractos etanólicos secos.

Palabras claves: Número Stiasny, residuos agrícolas, polifenoles.

Abstract

The crops of the herbaceous agriculture generate great amounts of vegetal material might be an important source for the production of condensed tannins. Baja California is the second state producer of wheat and cotton in Mexico. The main agricultural activity that the state develops has place in the Mexicali Valley. In 2013, around of 527,103 t of wheat straw and 142,377 t of cotton stalk were generated. The aim of this research was to evaluate the content of tannins condensed in the bark of the cotton stalk of the genus *Gossypium hirsutum* L. and wheat straw *Triticum aestivum* L., from the Mexicali Valley using the gravimetric Stiasny Number and ethanol was used as solvent in the extraction. The dried ethanolic extracts obtained were characterized by infrared spectrophotometry. The experimental results indicate that the percentage of the extracts of ethanol was 15.29 % for the bark of the cotton stalk and 10.36 % for wheat straw. While the performance of condensed tannins in the bark of cotton stalk was 8.71 % and wheat straw was 5.53 %. The spectrums obtained showed the characteristic functional groups of polyphenols in the dried ethanolic extracts.

Keywords: Stiasny number, agricultural residues, polyphenols.

Introducción

Los taninos o compuestos polifenólicos constituyen una clase de metabolitos secundarios presentes en todos los tejidos vegetales de muchas plantas, se pueden encontrar en las flores, frutos, semillas, hojas,

XVII Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas
Agricultura sustentable: Uso eficiente del agua, suelo y fertilizantes
 9 y 10 de Octubre de 2014

EFFECTOS DE LA APLICACIÓN DE CENIZA LIGNOCELULÓSICA SOBRE EL CONTENIDO DE NITRÓGENO EN SUELO ORGÁNICO

Torres Ramos Ricardo¹, Montero Alpírez Gisela¹, Beleño Cabarcas Mary Triny¹, Toscano Palomar Lydia², Valdez Salas Benjamín¹, Jaramillo Colorado Beatriz Eugenia³

¹Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Blvd. Benito Juárez y Calle de la Normal S/N, Col. Insurgentes Este, Mexicali, Baja California, CP 21280, México. ricardo_torres89@hotmail.com

²Academia de Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Mexicali, Av. Tecnológico, Mexicali, México.

³Grupo de Investigaciones Agroquímicas, programa de Química, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia.

Resumen

Los cultivos agrícolas herbáceos generan grandes cantidades de residuo vegetal que tienen generalmente como disposición final la quema, a cielo abierto *in situ* o en plantas termoquímicas. En ambos casos, el residuo inorgánico que se genera tras la combustión, las cenizas, suelen regresar a su lugar de origen. Las cenizas devuelven al suelo minerales que contribuyen a mantener el equilibrio de los mismos. Sin embargo, la cenizas poseen un carácter fuertemente alcalino, el cual podría aumentar el pH de los suelos y favorecer las pérdidas de nitrógeno por volatilización del amoníaco. La composición química de las cenizas depende en gran medida de la temperatura de combustión. El objetivo de esta investigación fue evaluar los efectos de la aplicación de ceniza lignocelulósica obtenida a 550 °C sobre el contenido de nitrógeno, el % CaCO₃ equivalente y el pH en suelo orgánico. Los análisis se realizaron según la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Los resultados experimentales muestran que la adición de cenizas al suelo derivó en un aumento de 0.74 unidades de pH, el % CaCO₃ equivalente pasó de 1.36 % a 2.09 %. La cantidad de ceniza agregada al suelo no fue suficiente para elevar su pH por encima del valor neutral. Por tanto, no se observaron pérdidas de nitrógeno en el suelo. Contrario a esto, se observó un ligero incremento en el contenido de nitrógeno atribuido al porcentaje de este elemento presente en la cenizas. El pH de las cenizas fue 10.53 y el % CaCO₃ equivalente fue 45.93 %.

Palabras claves: cenizas, nitrógeno en el suelo, alcalinidad.

Abstract

The crops of herbaceous agriculture generate great amounts of vegetable residue whose disposal is generally the burning, open pit *in situ* or thermochemical plants. In both cases, the inorganic residue generated upon combustion, ash, often return to their place of origin. Ashes returned to soil minerals that help maintain the balance thereof. However, the ashes have a strongly alkaline nature, which could increase the pH of the soil and promote the loss of nitrogen through volatilization of ammonia. The chemical composition of the ash largely depends on the combustion temperature. The aim of this research was to evaluate the effects of application of lignocellulosic ash obtained at 550 °C on the content of nitrogen, the equivalent % CaCO₃ and pH of organic soil. Experimental results show that the ash addition to soil led to a rise in 0.74 units of pH, the equivalent % CaCO₃ step 1.36 % to 2.09 %. This increase was not enough to raise the pH of the soil above the neutral value, so they were not observed loss of nitrogen in the soil. A slight increase in the nitrogen content attributable to the percentage of the element present in the ash was observed. The pH of the ash was 10.53 and the equivalent % CaCO₃ was 45.93 %.

Memorias del XXXV Encuentro Nacional de la AMIDIQ
6 al 9 de Mayo de 2014, Puerto Vallarta, Jalisco, México

ESTUDIO PRELIMINAR PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA PAJA DE TRIGO DEL VALLE DE MEXICALI

Ricardo Torres Ramos^a, Gisela Montero Alpírez^a, Beatriz Eugenia Jaramillo Colorado^b, Marcos Alberto Coronado Ortega^a, Erick Enrique Romero Uscanga^a, Mary Triny Beleño Cabarcas^a

^aInstituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Blvd. Benito Juárez y Calle de la Normal S/N, Col- Insurgentes Este, Mexicali, Baja California, CP 21280, México. ricardo_torres89@hotmail.com

^bFacultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Cartagena, Av. del Consulado, Calle 30 No. 48 – 152, Cartagena, Bolívar, Colombia.

Resumen

El cultivo de trigo es el más importante del Valle de Mexicali, con una superficie cultivada de 72,206 ha en 2012, y representa el 12.5% de la superficie destinada al trigo en México. La cosecha de dicho cultivo genera alrededor de 527,103 toneladas anuales de paja de trigo. La mayor parte de este recurso es incinerado a cielo abierto *in situ* al final de cada ciclo agrícola, sin ningún aprovechamiento productivo, provocando serios problemas de contaminación. Sin embargo, debido a su alto contenido energético, la paja de trigo es susceptible de ser utilizada en procesos de generación de electricidad o biocombustibles entre otros. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio preliminar para la caracterización fisicoquímica de la paja de trigo del Valle de Mexicali, mediante la metodología de análisis próximo que incluye: la determinación del contenido de humedad, materia volátil, cenizas y carbono fijo expresados en porcentaje másico. Esto resulta de vital importancia dado que hace posible proponer aplicaciones y seleccionar tecnologías para la explotación de la energía contenida en la biomasa residual. Los resultados experimentales preliminares indicaron que la paja de trigo presenta 6.65% de humedad, 67.32% de materia volátil, 7.48% de cenizas y 18.45% de carbono fijo.

Introducción

En el Valle de Mexicali (VM), el trigo es considerado el cultivo más importante, debido a las extensas áreas que se destinan anualmente para este fin. La superficie cosechada alcanzó 72,206 hectáreas en 2012 [1], esto dio origen a la generación de aproximadamente 527,103 toneladas de paja, considerando un índice de generación de 7.3 toneladas por hectárea [2]. Después de la cosecha, el 85% del residuo es incinerado a cielo abierto *in situ* provocando serios problemas de contaminación [3]. Se estimó que en 2010, se emitieron a la atmósfera 41,913 toneladas de metano, monóxido de carbono y material particulado [4]. No obstante, la paja del trigo, biomasa perteneciente al grupo de biomasa herbácea con un alto contenido energético, es susceptible de ser utilizada en procesos de generación de electricidad o transformación en biocombustibles, lo cual representa una importante oportunidad para el abastecimiento de energía en la región.

Las características físicas y químicas de la paja de trigo, como todo material biomásico, son afectadas por las condiciones propias de la región donde se produce, es decir, su composición varía según las propiedades del suelo, el tipo de clima, el agua, el sistema de riego, etc. [5] [6]. Por lo tanto, cada región en particular debe estudiar y llevar a cabo la caracterización física y química de sus residuos agrícolas, más aun cuando estos estudios

2083

© 2014 Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química
ISBN 978-607-95593-2-8

XVII Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas
 Agricultura sustentable: Uso eficiente del agua, suelo y fertilizantes
 9 y 10 de Octubre de 2014

DETERMINACIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES DE LA BIOMASA LIGNOCELULOSICA; CELULOSA, HEMICELULOSA Y LIGNINA DE LA PAJA DE TRIGO PARA SU POSTERIOR PRETRATAMIENTO BIOLÓGICO

Romero-Uscanga Erick¹, Montero-Alpírez Gisela¹, Toscano-Palomar Lydia² Pérez-Pelayo Laura¹
 Torres-Ramos Ricardo¹ Beleño-Cabarcas Mary Triny¹

Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California¹ Email: iq.iker182@gmail.com

²Instituto Tecnológico de Mexicali

Resumen

En este trabajo se caracterizó la paja de trigo del valle de Mexicali, con el fin de conocer el porcentaje de celulosa, hemicelulosa y lignina existente en este tipo de biomasa para futuros estudios como el uso de pretratamientos biológicos con hongos celulolíticos para el mejoramiento de hidrólisis enzimática. En la caracterización de la paja de trigo se realizaron determinaciones de propiedades físicas como pH, humedad y cenizas; y la determinación de propiedades químicas como nitrógeno total y extracciones con solventes orgánicos. La biomasa lignocelulosa está constituida por tres componentes principales que se encuentran en mayor por celulosa, hemicelulosa y lignina. La biomasa también está compuesta por componentes minoritarios como son aceites, resinas, taninos, azúcares, gomas, colorantes y almidones. Para lograr acceder a los tres principales componentes de la biomasa se realizaron extracciones al material lignoceluloso basándose en los métodos TAPPI, esto con el fin de poder acceder posteriormente a los componentes de mayor proporción. Los solventes utilizados en las extracciones fueron acetona y agua, logrando extraer todos los componentes que se encuentran en menor proporción en la paja de trigo. Una vez libre de extraíbles, se realizó el análisis de lignina, celulosa y hemicelulosa respectivamente, los porcentajes encontrados fueron, celulosa 57%, hemicelulosa 17% y Lignina 19%. Con los posteriores resultados, se podría comenzar con el pretratamiento biológico con cepas de hongos celulolíticos para conocer la degradación de los principales componentes de la paja de trigo.

Palabras clave: *Caracterización, Biomasa lignocelulosa, Celulosa, Hemicelulosa, lignina.*

Abstract

In this paper wheat straw from Mexicali Valley was characterized, in order to know the percentage of cellulose, hemicellulose and lignin existing in this type of biomass this for future studies as the use of biological pretreatment with cellulolytic fungi for improving hydrolysis enzyme. In the characterization of wheat straw physical property determinations as pH, moisture and ash were carried out; and the determination of chemical properties as total nitrogen and extraction with organic solvents. Lignocellulosic biomass is made up of three main components that are most of cellulose, hemicellulose and lignin. Biomass is also composed of minor components such as oils, resins, tannins, sugars, gums, colors and starches. To gain access to the three major components of lignocellulosic biomass materials extractions were performed based on TAPPI methods, this in order to subsequently access components larger proportion. The solvents used in the extractions were acetone and water, managing to extract all the components found in smaller proportions in wheat straw. Once free of extractables, analysis of lignin, cellulose and hemicellulose respectively performed, the percentages found were, 57% cellulose, 17% hemicellulose and 19% lignin. With the subsequent results, it could start with the biological pretreatment with strains of cellulolytic fungi for the degradation of the major components of wheat straw.

Keywords: *Characterization, lignocellulosic biomass, cellulose, hemicellulose, lignin.*