



Universidad de Burgos

*Departamento de Química
Área de Química Analítica*

*Determinación electroquímica de
aluminio en matrices acuosas con
electrodos serigrafiados modifica-
dos con nanopartículas y enzimas*

Miriam Barquero Quirós

Burgos 2016

Tesis Doctoral



ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE BURGOS

Memoria de investigación titulada “*Determinación electroquímica de aluminio en matrices acuosas con electrodos serigrafiados modificados con nanopartículas y enzimas*” presentada para optar al Grado de Doctora en la Universidad de Burgos.

Fdo.: Miriam Barquero Quirós



Facultad de Ciencias
Pza. Misael Bañuelos, s/n
09001 Burgos



ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE BURGOS

Dña. M. Julia Arcos Martínez, Catedrática de Universidad del Departamento de Química de la Universidad de Burgos

INFORMA FAVORABLEMENTE sobre la presente Tesis Doctoral, titulada “*Determinación electroquímica de aluminio en matrices acuosas con electrodos serigrafiados modificados con nanopartículas y enzimas*” realizada en el Área de Química Analítica del Departamento de Química de la Universidad de Burgos por Dña. Miriam Barquero Quirós

Y para que así conste, firma el presente informe en Burgos, a 26 de septiembre de 2015.

Fdo.: M. Julia Arcos Martínez



Facultad de Ciencias
Pza. Misael Bañuelos, s/n
09001 Burgos

Dedicatoria

Al amado recuerdo de mis padres, a mi esposo e hijos que con su amor han guiado mi vida y a mis nietos que la llenan de alegría.

Agradecimientos

A la Dra. M. Julia Arcos-Martínez por haber asumido el reto de dirigir este trabajo a un océano de distancia y por sus acertadas correcciones, a Olga Domínguez-Renedo y a María Asunción Alonso-Lomillo por sus recomendaciones en la escritura de los artículos y por el suministro de electrodos. A Silvia, Marisol y demás compañeras de Química Analítica de la Universidad de Burgos por su ayuda en todo momento, a las autoridades de la Universidad de Costa Rica por medio del MSc. Carlos Herrera Ramírez exdirector y el Dr. Cristian Campos Fernández director de la Escuela de Química por su apoyo a los proyectos de investigación, a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica y al Dr. Carlos León Rojas director del CELEQ por suministrar los recursos necesarios para realizar este trabajo, a mi compañera Ana Lorena por su amistad y apoyo de tantos años, a la directora administrativa del CELEQ Marjorie por su ayuda con los presupuestos de mis proyectos de investigación, a Daniel por solucionar los problemas de mis equipos de computo, al Dr. Federico Muñoz por la realización de los AFM en CICIMA y al MSc. Orlando Marín Artavia su ayuda con la obtención de los parámetros de AFM, a Cynthia del CIEMIC por la realización de los SEM y XRF de mis electrodos. Agradezco al Dr. Orlando Bravo Trejos mi profesor, sus visitas al laboratorio y su interés en mi vida personal y profesional desde mis lejanos años de estudiante. A mis compañeros de la Sección de Química Analítica y del CELEQ por su colaboración durante el tiempo de investigación. Sin la ayuda de estas personas que Dios dispuso en mi camino, no habría podido concluir este trabajo. Para todas, mi agradecimiento sobre el tiempo y la distancia.

Determinación electroquímica de aluminio en matrices acuosas con electrodos serigrafiados modificados con nanopartículas y enzimas



Índice

Índice.....	1
Abreviaturas	7
Introducción	13
1. Introducción	15
1.1. Objetivos.....	19
2. Aluminio: un metal de interés	21
2.1. Propiedades y usos del aluminio.....	23
2.2. Aluminio y medio ambiente	24
2.3. Toxicidad del aluminio en organismos vivos	27
2.4. Inhibición enzimática por aluminio y relación con la enfermedad de Alzheimer	30
2.4.1. La cascada amiloidea.....	32
2.4.2. Hipótesis ion metal.....	35
2.4.3. La hipótesis del estrés oxidativo.....	37
3. Métodos analíticos para la cuantificación de aluminio en diferentes matrices	40
4. Sensores electroquímicos serigrafados	47
4.1. Biosensores amperométricos	47
4.2. Electrodo serigrafado.....	50
4.2.1. Elaboración de electrodos serigrafados	51
4.2.2. Tipos de electrodos serigrafados	55
4.3. Nanomateriales	58
4.3.1. Nanopartículas metálicas y nanotubos	60
4.3.2. Electrodo enzimático y nanomateriales.....	62
4.4. Técnicas de inmovilización enzimática	64
4.4.1. Adsorción física.....	65
4.4.2. Atrapamiento con inclusión.....	66
4.4.3. Microencapsulación.....	67
4.5. Inmovilización química	67
4.5.1. Enlace covalente.....	68
4.5.2. Entrecruzamiento.....	70

4.6. Referencias.....	71
5. Determinación de Al(III) por medio de un biosensor de α -quimotripsina con benzoil tirosina etil ester como sustrato	97
5.1. Introduction.....	99
5.2. Experimental Section	100
5.2.1. Reagents.....	100
5.2.2. Equipment.....	101
5.2.3. Construction of the biosensors	101
5.3. Results and discussion	103
5.3.1. Calibration and limit of detection	105
5.3.2. Precision	106
5.3.3. Trueness.....	108
5.3.4. Accuracy.....	108
5.3.5. Analytical application.....	109
5.3.6. Interferences	110
5.4. Conclusions.....	111
5.5. References.....	111
6. Determinación de Al(III) por medio de un biosensor de α -quimotripsina con acetil tirosina etil ester como sustrato	119
6.1. Introduction.....	121
6.2. Experimental Section	122
6.2.1. Reagents.....	122
6.2.2. Equipment.....	123
6.2.3. Screen Printed Electrodes Preparation	123
6.2.4. Modification of SPCEs with Gold Nanoparticles.....	124
6.2.5. α -chymotrypsin immobilization on AuNPs/SPCEs.....	125
6.2.6. Amperometric Determination of Aluminum	126
6.3. Results and Discussion	126
6.3.1. Selection of experimental conditions	127
6.3.2. Aluminum inhibition behavior	129
6.3.3. Calibration and detection limit	131
6.3.4. Precision	132
6.3.5. Accuracy.....	133

6.3.6. Interferences	135
6.4. Conclusions.....	136
6.5. References.....	137
7. Determinación de Al(III) por medio de un biosensor de acetilcolinesterasa con ioduro de acetil tiocolina como sustrato.....	145
7.1. Introduction.....	147
7.2. Experimental Section.....	148
7.2.1. Reagents	148
7.2.2. Equipment	149
7.2.3. Screen-Printed Electrodes Preparation	149
7.2.4. Modification of Screen-Printed Carbon Electrodes With Gold Nanoparticles.....	150
7.2.5. Acetylcholinesterase Enzyme Immobilization on Gold Nanoparticles Modified Screen-Printed Carbon Electrode	150
7.2.6. Chronoamperometric Determination of Aluminum	151
7.3.1. Calibration and Limit of Detection.....	155
7.3.2. Precision	156
7.3.3. Accuracy.....	157
7.3.4. Interferences	160
7.4. Conclusions.....	161
7.5. References.....	162
8. Determinación de Al(III) por medio de un biosensor enzimático de superóxido dismutasa utilizando epinefrina como sustrato	171
8.1. Introduction.....	173
8.2. Experimental Section.....	175
8.2.1. Reagents	175
8.2.2. Equipment	176
8.2.3. Nanoparticles Electrodeposition methods	176
8.2.4. SOD enzyme immobilization onto AuNps/TTF/SPCEs	177
8.3. Results and discussion	178
8.3.1. Optimization of experimental parameters.	178
8.3.2. XRF and SEM for NPs/SPC _{TTFE} study. METHOD A:.....	180
8.3.3. XRF and SEM for Nps/SPC _{TTFE} s study. METHOD B.....	181

8.3.4. AFM analysis of SPC _{TTFE} s prepared by method A and B	183
8.3.5. Inhibition behavior of Al(III) on SOD enzyme	185
8.4. Validation of SOD/PdNps/SPC _{TTFE} based biosensor	187
8.4.1. Limit of detection.	187
8.4.2. Precision	188
8.4.3. Accuracy	189
8.4.4. Study of interferences on SOD/PdNps/SPC _{TTFE} biosensor	190
8.5. Conclusions	191
8.6. References	192
9. Conclusiones	201



Abreviaturas

Abreviatura	Significado
AA	Ácido ascórbico
Aβ	Péptido β amiloide
AChE	Enzima acetilcolinesterasa
AChE/AuNPs/SPCE	SPCE modificado con Au NPs y AChE inmovilizada
AD	Enfermedad de Alzheimer
AdsSV	Voltamperometría adsortiva de redisolución
AdsASV	AdsSV con redisolución anódica
AFM:	Microscopía de fuerza atómica
ALS	Esclerosis lateral amiotrófica
APP	Proteína precursora de la cascada amiloide
ATEE	Acetil tirosina etil ester
ATI	Ioduro de acetil tiocolina
ARS	Rojo de alizarina S
AuNPs	Nanopartículas de oro
AuNPs/SPCE	SPCE modificado con AuNPs
AuNPs/SPC_{TTFE}	SPCE con TTF 5% en la tinta modificado con AuNPs
AV	Violeta de alizarina
BPTI	Inhibidor de la tripsina pancreática bovina
BSA	Albúmina de suero bovino
BTEE	N- α -benzoil-L-tirosina etilester
BR	Disolución reguladora de pH Britton Robinson
α-chymotrypsin	Enzima α -quimotripsina
α-chymotrypsin/AuNPs/SPCE	SPCE modificado con AuNPs y enzima α -quimotripsina
CNTs	Nanotubos de carbono

CPE	Electrodo de pasta de carbono
CPE/CNTs	CPE y CNTs
CV1	Voltamperometría cíclica condición 1
CV2	Voltamperometría cíclica condición 2
Cyt c	Citocromo c
DA	Dopamina
DASA	Ácido 1,2-dihidroxiantraquinona-3-sulfónico
DF	Factor de dilución
DFO	Desferrioxamina
DHA	Ácido docosahexanoico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOM	Materia orgánica disuelta
DPAdsSV	AdsSV con diferencial de impulso
DPP	Polarografía diferencial de impulso
DPV	Voltamperometría diferencial de impulso
Eap	Potencial aplicado
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EPA	Agencia de Protección Ambiental
EPI	Epinefrina
ETAAS	Espectroscopia de absorción atómica electrotérmica
GC	Carbón vitrificado
GCE	Electrodo de carbon vítreo
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GSH-Px	Glutation peroxidasa
GTLE	Extracto de hojas de té verde
HAuCl₄	Tetra cloroaurato ácido

HMDE	Electrodo de mercurio de gota suspendida
HPLC	Cromatografía líquida de alto desempeño
I	Corriente obtenida por adiciones de Al(III)
I₀	Corriente de estado estacionario del sustrato sin Al(III)
ICP	Plasma acoplado inductivamente
ICP-AES	Espectrometría de emisión atómica con ICP
ICP-MS	Espectrometría de masas con ICP
K_m(app)	Constante aparente de Michaelis Menten
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LSV	Voltamperometría de barrido lineal
M	MolL ⁻¹
MDA	Malondialdehido
MCM-41	Tamiz molecular mesoporoso No. 41
mM	10 ⁻³ M
MWCNT	Nanotubos de carbono de pared múltiple
NAA	Análisis por activación neutrónica
NaCl	Cloruro de sodio
NE	Norepinefrina
NFTs	Ovillos neurofibrilares
NMR	Resonancia magnética nuclear
OSHA	Administración de Seguridad Ocupacional y Salud
PC	Carbonilo de proteína
PCV	Violeta de pirocatecol
PdNPs	Nanopartículas de paladio
PdNPs/SPC_{TTFE}	SPCE con TTF 5% en la tinta modificado con PdNPs

PHFs	Filamentos pares helicoidales
PPy	Polipirrol
PR	Rojo de pirogalol
PdNPs/SPC_{TTFE}	SPCE con TTF 5% en la tinta modificado con PdNPs
PHF	Filamentos pares helicoidales
PMT	Poly (3-methylthiophene)/
PPy	Polipirrol
PR	Rojo de pirogalol
PtNPs	Nanopartículas de platino
PtNPs/SPC_{TTFE}	SPCE con TTF 5% en la tinta modificado con PtNPs
PVA	Alcohol polivinílico
PVC	Cloruro de polivinilo
RA	Rugosidad promedio
RhNPs	Nanopartículas de rodio
RKu	Coefficiente de kurtosis de la rugosidad
RhNPs/SPC_{TTFE}	SPCE con TTF 5% en la tinta modificado con RhNPs
Rmax	Altura del pico más alto sobre la línea media en el perfil
RMS	Raíz cuadrada de la rugosidad media
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RSD	Desviación estándar relativa
SAMs	Monocapas autoensambladas
SWAdsV	Voltamperometría adsorptiva de onda cuadrada
SWAdsSV	AdsV de onda cuadrada con redisolución
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SOD	Enzima superóxido dismutasa

SOD-1	Isoforma de SOD intracelular
SOD-3	Isoforma de SOD extracelular
SPCE	Electrodo serigrafiado de carbón
SPCEs	Electrodos serigrafiados de carbón
SOD/AuNPs/SPC_{TTFE}	SPCE con TTF 5% en la tinta modificado con AuNPs y SOD
SOD/PdNPs/SPC_{TTFE}	SPCE con TTF 5% en la tinta modificado con PdNPs y SOD
SOD/PtNPs/SPC_{TTFE}	SPCE con TTF 5% en la tinta modificado con PtNPs y SOD
SOD/RhNPs/SPC_{TTFE}	SPCE con TTF 5% en la tinta modificado con RhNPs y SOD
SPE	Electrodo serigrafiado
SPEs	Electrodos serigrafiados
S_{y/x}	Desviación estándar de la regresión de calibración lineal
SRM:	Material estándar de referencia
SVRS	Violeta de solocromo RS
SWCNT:	CNT de una sola pared
TAC	Capacidad antioxidante total
TCA:	Ácido tricarboxílico
TTF	Tetratiofulvaleno
UHT	Temperatura ultra alta
μM	10 ⁻⁶ M
UV	Ultravioleta
UVis:	Ultravioleta visible
XRF	Fluorescencia de rayos X



Introducción

1. Introducción

Existe en la sociedad actual un gran interés con respecto a la incidencia de contaminantes en los diversos ámbitos de la actividad humana, refiriéndose a la presencia de elementos tóxicos y sus implicaciones sobre la salud. Es bien conocido que la toxicidad de un elemento depende de su concentración. Dentro de los elementos algunos son considerados esenciales y su deficiencia puede provocar enfermedades, sin embargo la presencia de los mismos en concentraciones elevadas puede resultar tóxica. En algunos elementos esenciales, la diferencia en concentración entre el nivel esencial y la toxicidad no es muy grande, por lo que se hace necesario caracterizar los elementos y determinar su contenido.

Otros elementos no esenciales, como en el caso del aluminio, que se encuentra presente en general en la biosfera en rocas, suelo, aguas, atmósfera, es muy conocido como un metal empleado en muchos campos desde industriales a domésticos. Sus propiedades únicas le confieren ciclos de uso repetidos en la industria.

Su biodisponibilidad ambiental se genera por procesos naturales como lixiviado de los suelos, por la contaminación industrial, tratamiento de aguas potables, uso de utensilios domésticos o bien por contaminación del organismo durante el proceso de hemodiálisis.

Por muchos años fue considerado como no tóxico e inocuo, sin embargo la exposición humana crónica a bajas concentraciones o la intoxicación aguda en animales de laboratorio, ha conducido a un creciente interés en sus efectos nocivos.

La observación de algunos síntomas asociados con su uso y la relación de ellos con manifestaciones de la enfermedad de Alzheimer ha motivado la aplicación de numerosos métodos analíticos a su determinación en muestras biológicas.

Tradicionalmente, se ha determinado por métodos espectroscópicos y colorimétricos, siendo necesaria una gran sensibilidad y la ausencia de contaminación externa para poder cuantificarlo. Los métodos electroquímicos aunque poseen la sensibilidad adecuada para la cuantificación de metales traza, no son adecuados para la determinación de aluminio debido a su elevado potencial de reducción.

Para la determinación electroquímica del aluminio a bajos niveles de concentración, se hace necesario la formación de complejos con agentes quelatantes que permitan la reducción a potenciales más bajos. Los métodos electroquímicos han empleado de

forma extensa electrodos de mercurio de gota suspendida debido a sus ventajas sobre los electrodos sólidos. Existe una gran contaminación asociada al uso de este tipo de electrodos por lo que se hace necesaria la aplicación de nuevas técnicas electroquímicas.

Se ha desarrollado un creciente interés en la construcción de electrodos serigrafiados de bajo coste con el objetivo de aplicarlos a la determinación de contaminantes. Estos pueden ser modificados exitosamente con nanopartículas, mediadores electroquímicos o enzimas, lo que les confiere una gran versatilidad. Su carácter desechable evita los problemas de memoria asociados al uso de electrodos sólidos.

Este trabajo se ha centrado en la puesta a punto de nuevos métodos electroquímicos que permitan la determinación de aluminio en forma rápida y sensible en matrices acuosas. Por tal motivo se han desarrollado electrodos serigrafiados modificados con enzimas, para analizar aluminio por técnicas amperométricas, basándose en la inhibición que produce sobre las enzimas empleadas.

En consecuencia se han abierto otros campos del análisis electroquímico para la determinación de aluminio a bajos niveles de concentración.



1.1 .Objetivos

1.1. Objetivos

En esta Tesis Doctoral se pretende poner a punto diferentes biosensores electroquímicos para la determinación de aluminio a nivel micromolar en matrices acuosas. Para ello, se utilizarán sistemas electródicos serigrafiados modificados con nanopartículas y enzimas, como alternativa a los métodos descritos en la bibliografía, debido a su buen desempeño, bajo coste y producción sencilla.

Este objetivo global implica el logro inicial de los objetivos concretos que se describen a continuación:

1. Evaluar el efecto inhibitor del aluminio sobre diferentes enzimas y sus sustratos en la calidad de la respuesta amperométrica de biosensores construidos con ellas.
2. Funcionalizar los electrodos serigrafiados por medio de su modificación con nanopartículas, estudiando su generación electrolítica y con elementos biológicos empleando diferentes métodos de inmovilización enzimática.
3. Optimizar las variables experimentales para los biosensores construidos y proceder a su validación en términos de reproducibilidad, repetibilidad, límite de detección, exactitud, veracidad, aplicabilidad analítica etc.
4. Realizar enriquecimientos en matrices acuosas con un material de referencia certificado y emplear los diferentes biosensores para la determinar la recuperación del material de referencia con la exactitud requerida para el nivel de concentración verificado.
5. Realizar estudios de interferencias a concentración baja y alta bajo las condiciones experimentales optimizadas para cada uno de los biosensores construidos.

2. Aluminio: un metal de interés

2.1. Propiedades y usos del aluminio

El aluminio, cuyo símbolo químico es Al, es el tercero en abundancia de los elementos en la tierra, y se encuentra en forma ubicua en el medio ambiente. Sus estados de valencia son 0 y 3. Su reactividad hace que en ambiente se encuentre en el estado de oxidación (III). Es un pequeño ácido de Lewis, con alta densidad de carga y prefiere coordinarse con bases de Lewis duras como OH^- , SO_4^{2-} , COO^- , ROH, RO y PO_4^{3-} , así como enlazar aminas como parte de sistemas multidentados. Su radio iónico es similar al de Fe^{3+} y Mg^{2+} con los que podría competir en diversas reacciones.

Su exposición al aire, al oxígeno y a otros oxidantes fuertes, produce la formación de una capa superficial de óxido de aluminio que es muy resistente a la corrosión y es insoluble entre pH 4.5–8.5. Los compuestos de aluminio se encuentran presentes en la mayoría de las rocas y vegetales.

El aluminio comercial se obtiene de un mineral llamado bauxita que se encuentra en minas de depósito abierto, este material se tritura para obtener la alúmina, que es un material comercial de aluminio y se obtienen lingotes por medio del proceso de fundición.

Existen numerosos depósitos de bauxita principalmente en la zona tropical y subtropical de la tierra y en Europa en forma de estratos cerca del suelo o de una capa de vegetación. La bauxita comercial para ser explotada debe contener mínimo 40% de óxido de aluminio [1]. La bauxita se refina en alúmina por el proceso de Bayer, y se obtiene aluminio primario por el proceso electrolítico de Hall-Héroult (1886), para producir una aleación específica que se limpia y se funde.

Sus propiedades eléctricas hacen que sea un buen conductor, capaz de competir en coste y usos con el cobre. Se emplea en perfiles para uso industrial y en pistones de motor debido a su fortaleza, así como en pinturas. También se usa en carrocerías de automóviles, en aplicaciones estructurales, en la fabricación de latas de conservas y en el recubrimiento de envases UHT (Ultra High Temperature). Su uso doméstico en utensilios de aluminio, ya no es muy favorecido debido a que se considera que puede

contaminar los alimentos, siendo su uso más popular como papel de aluminio para envolver alimentos u hornearlos.

Se ha empleado con fines terapéuticos para combatir la hiperfosfatemia asociada a la hemodiálisis renal mediante la administración de $\text{Al}(\text{OH})_3$

En cosmética se emplea alúmina como ingrediente de polvos compactos, lápices labiales y antitranspirantes. Sin embargo una mayor ingesta, puede provenir de algunas drogas que no requieren prescripción, como aspirinas con buffer empleadas en pacientes artríticos. Se emplea en forma de sulfato de aluminio como coagulante en el proceso de purificación del agua potable en las plantas de tratamiento [2].

Se usa en la industria panificadora como fosfato ácido de aluminio y sodio, en las cremas no lácteas y sal de mesa como silico aluminato de sodio. Los alimentos que contienen las mayores concentraciones de aluminio son los aditivos alimentarios [3].

Su uso tan diverso y su presencia en el medio ambiente y en la litosfera hacen su determinación a nivel de ultrazas difícil, debido a su presencia ubicua.

2.2. Aluminio y medio ambiente

Hasta la década del 1980 se pensó que el aluminio era una sustancia casi segura, aunque se sabía que producía enfermedades pulmonares en trabajadores industriales expuestos al polvo de aluminio, que desarrollaban un engrosamiento y cicatrización del tejido pulmonar alrededor de la partícula inhalada, produciendo una condición similar al enfisema.

Entre los hechos que motivaron una reevaluación de su seguridad, se encuentran el descubrimiento de altas concentraciones de aluminio en cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer (AD) y que los pacientes de hemodiálisis renal presentaban una demencia con síntomas similares, debida al agua potable usada en las máquinas de diálisis, Sin embargo aún no se pensaba que a largo plazo significara un peligro para la salud pública, debido a que se absorbe poco en el tracto gastrointestinal y se elimina por los riñones.

En el agua potable el aluminio puede llegar a niveles relativamente altos a causa de la acción de la lluvia ácida que lixivia este elemento en suelos, rocas y sedimentos del fondo de lagos y arroyos, dirigiéndolos hacia los depósitos de agua dulce, elevando su concentración a niveles más altos. La creciente acidez de la lluvia también ha aumentado las concentraciones superficiales de aluminio, pero los valores en aguas subterráneas son inferiores a los superficiales [4]. Se considera que el contenido de aluminio en el agua superficial se ha incrementado cerca de diez veces en la pasada centuria [5].

Actualmente con el incremento de acidez de los mares por las emisiones de los vehículos que emplean combustibles fósiles, en el mar también se ha aumentado su concentración.

Se han reportado valores entre 0.1 y 20 $\mu\text{g/L}$ de Al para agua de mar no contaminada debido a sedimentos y arcilla suspendida. Estos valores son comparables a los de los ríos limpios pero menores que los de los lagos [6]. La concentración de Al en ríos es dependiente del pH con valores significativos a $\text{pH} < 5$, a pH entre 3 y 6 la materia orgánica soluble DOM (Dissolved Organic Matter) compuesta principalmente de ácidos húmicos y fúlvicos puede formar complejos solubles e insolubles, en tanto que en el intervalo de pH 6-9 se forman hidrox complejos de Al.

Las aguas potables tratadas por floculación con hidróxidos de Al presentan valores mayores y mayor contenido de especies de Al [7].

Las concentraciones atmosféricas de aluminio en áreas rurales y urbanas se encuentran entre 0.05-0.5 $\mu\text{g/m}^3$ y 0.1-5 $\mu\text{g/m}^3$ respectivamente [8, 9]. Se presentan en Tabla 2.1 concentraciones de aluminio encontradas en aire, agua y alimentos [5, 17].

Tabla 2.1. Concentraciones ambientales de aluminio.

Medio	Concentración
<i>Aire</i>	
Rural	50-500 $\eta\text{g}/\text{m}^3$
Urbano	100-5000 $\eta\text{g}/\text{m}^3$
<i>Agua</i>	
Ríos de Norte América	50 $\mu\text{g}/\text{L}$
Arroyos y lagos ácidos	100-800 $\mu\text{g}/\text{L}$
Aguas potables	> 14 $\mu\text{g}/\text{L}$
<i>Alimentos</i>	
Mayoría de alimentos no procesados	< 10 $\mu\text{g}/\text{g}$
Té (planta acumuladora)	> 20.000 $\mu\text{g}/\text{g}$

Por su parte la Agencia de Protección Ambiental (EPA), ha establecido criterios de calidad para su contenido en el agua del ambiente, para la protección de la vida acuática [10], mostrados en Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Criterios de toma de muestra para concentraciones ambientales de aluminio.

Criterio de toma de muestra	Concentración ($\mu\text{g}/\text{L}$)
Concentración promedio de 4 días	< 87
Concentración promedio de 1 hora	<750

La OSHA ha establecido también las concentraciones ambientales permitidas de aluminio en lugares de trabajo [5], se muestran en Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Concentraciones ambientales de aluminio de acuerdo con el criterio OSHA.

Límites establecidos de OSHA	Concentración (mg/m ³)
Aluminio metálico en polvo	10
Polvos pirolizados	5
Humos de fundición	5
Sales solubles	2
Alquil solubles	2

Se le puede encontrar como un componente natural de los alimentos y como un aditivo alimentario. La mayoría de los alimentos no procesados contienen < 10 mg/kg de Al. Algunas hierbas pueden acumular más de 3000 mg/kg [3].

El contacto de los alimentos durante el procesamiento y almacenamiento en recipientes de aluminio no recubiertos, sobre todo si estos son ácidos o con alto contenido de sales aumenta el contenido de aluminio, con riesgo para personas con problemas renales [11].

Algunas bebidas y jugos procesados pueden contribuir a la ingesta de aluminio [12], lo mismo la infusión de hojas de té contiene especies de alto peso molecular enlazadas al aluminio [13]. El contenido de Al es mayor en el café instantáneo que en café molido [14] y en fórmulas para infantes, comparado con leche materna [15].

2.3. Toxicidad del aluminio en organismos vivos

Se bioacumula con efectos tóxicos en la cadena alimenticia en plantas [16], en invertebrados acuáticos que lo adsorben en las conchas, los peces en sus agallas. En peces la acumulación de aluminio aumenta al disminuir el pH [17]. En los invertebrados, peces y anfibios disminuye la tasa de supervivencia y de reproducción de estos organismos acuáticos. Estudios sobre la toxicidad del aluminio realizados con crustáceos, larvas y ninfas de insectos, indican que es menor en aguas de pH neutro [18], bajo pH de 5.5 se rompe el equilibrio de K y Ca y se reduce el transporte de oxígeno, resultando tóxico a anfibios y peces a baja concentración, siendo los peces, más sensi-

bles a la intoxicación que los invertebrados, debido a pérdida de iones, asfixia y formación de especies coloidales que dañan las agallas [19], la toxicidad en huevos y embriones es mayor que en peces de mayor edad [18].

A pH menor a 5.8 es tóxico para las algas y su actividad biológica se disminuye. La toxicidad se atribuye a monómeros de aluminio y especies poliméricas de cationes y coloides.

Las plantas acuáticas presentan mayor tolerancia al aluminio que los organismos acuáticos, la concentración de Al se correlaciona de forma negativa con el pH y positiva con la concentración en los sedimentos [20].

En plantas terrestres puede cruzar la membrana de las raíces de la planta por unión del ion con un transportador como citrato y malato; se ha observado que la adición de Al^{3+} en solución de nutrientes se transforma en citrato y malato en las raíces, que luego se transportan a partes superiores de las plantas [21], el citrato es transportador a nivel celular [22].

Las plantas terrestres tienen mayor exposición debido al mayor contenido de aluminio en el suelo y a su bajo pH, los fluoruros presentan efectos mayores que los complejos con ácidos húmicos que no son absorbidos. Su presencia reduce el crecimiento de raíces y la absorción de Ca y Mg, inhibiendo la división celular [23] por aumento de la rigidez de las paredes [24].

La exposición al aluminio en disolución o nanopartículas conduce a cambios en la expresión de diferentes genes en las plantas [25], interfiriendo con la asimilación/especiación a nivel celular de los metales esenciales, perturbando el balance redox celular y aumentando la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS). En las plantas se desarrolla resistencia al aluminio, ya que se liberan agentes complejantes [26] como ácidos orgánicos, proteínas y sílice [16]. El estrés inducido por aluminio en las plantas, provoca la expresión de numerosos genes que pueden proteger a las células de la toxicidad [23] para regular la complejación de metales y defenderse contra el estrés oxidativo [27].

Animales vacunos y de laboratorio alimentados con dietas altas en Al disminuyen la ingesta de alimento, el peso, la absorción de Mg [28], las reservas de Fe y niveles de ferritina, sugiriendo alteración de la regulación del Fe [29].

Los humanos están expuestos a la contaminación por aluminio de fuentes naturales y antropomórficas. Estas incluyen desde antiácidos y vacunas, hasta recuperación de residuos de minería e inhalación de humos de fundición. El aporte por agua y alimentos es parte de la ingesta diaria [30].

Un resumen de las principales fuentes de contaminación con aluminio para los humanos se muestra en Tabla 2.4 [31].

Tabla 2.4. Fuentes de contaminación con aluminio para humanos.

Fuente de Al	Concentración Al	Exposición diaria al Al (μg)	Porcentaje absorbido estimado	Al absorbido diariamente ($\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$)
Agua	Promedio ~70 $\mu\text{g}/\text{L}$	100	0.3	0.005
Alimento	(por ingesta)	3000-10000	0.1-0.3	0.04-0.5
Aire Rural	0.2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	4	1.5-2 (pulmones) 0.1-0.3 (tracto gastrointestinal)	0.001 0.0001
Aire Urbano	1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	20	1.5-2 (pulmones) 0.1-0.3 (tracto gastrointestinal)	0.006 0.0006
Antitranspirantes	5-7.5 %	50000-75000	> 0,012	> 0.1
Vacunas	150-850 $\mu\text{g}/\text{dosis}$	1.4-8	100	0.07-0.4

Los infantes que ingieren fórmulas con alto contenido de aluminio y las personas que consumen antiácidos o tienen falla renal como ya se dijo, son más vulnerables a los efectos tóxicos [32] y presentan mayor acumulación de aluminio en hueso ilíaco y médula [33]. La acumulación aumenta con la edad [31] y en cerebros de pacientes con AD, algunos estudios han encontrado contenidos muy altos de aluminio [34]. El

aluminio puede ser absorbido por la cavidad nasal hasta el cerebro, o a través de la piel cuando se emplean antitranspirantes [35].

El aluminio disponible de diversas fuentes es acomplejado por los constituyentes de los alimentos en el tracto gastrointestinal, donde es absorbido en su mayor parte, en el medio ácido del estómago o en el duodeno proximal [36]. Los ligandos endógenos como ascorbato, gluconato, lactato facilitan este proceso [37], donde también participa el piruvato [38] y exógenos como fluoruro, glutamato, cafeato han mostrado aumentar la absorción intestinal de aluminio en ratas [39], debido a que aumentan la permeabilidad de la mucosa [40]. Algunos ligandos pequeños como citrato, isocitrato, ascorbato, lactato aumentan la excreción renal de este metal [41].

La absorción de aluminio ocurre en dos etapas, una rápida en la mucosa y una lenta que es la liberación en la sangre, el aluminio debe ingresar al cerebro por un mecanismo dependiente de la transferrina; pero complejos de bajo peso molecular influyen en la fracción del metal que ingresa a través de la barrera sangre-cerebro [42]. Una vez que el aluminio es transportado se acumula en las neuronas [43].

En relación con controles normales de la misma edad, el contenido de aluminio en los cerebros con AD es mayor; también la ferritina que es la mayor reserva de hierro a nivel celular, se encuentra alterada. Debido a lo anterior, se le considera capaz de interferir con la homeostasis normal del hierro celular y alterar los procesos dependientes de este en el sistema nervioso y cerebro [44].

Sus efectos tóxicos en los seres humanos se han documentado sobre todo en los pacientes con función renal disminuida y sobre pacientes neurológicamente afectados como en la AD.

2.4. Inhibición enzimática por aluminio y relación con la enfermedad de Alzheimer

Los primeros casos reportados de AD ocurrieron en Fráncfort donde se empleaba como clarificante de agua potable y se describieron las características más importantes de la enfermedad [45].

Algunas evidencias sugieren que los pacientes con AD tienen un nivel más alto de aluminio en sangre después de la ingestión de citrato de aluminio que controles de su misma edad. El hecho de que al suministrar ^{26}Al en un vaso de agua se encuentre en cerebro, aporta evidencia que el tejido cerebral vivo toma el aluminio del torrente sanguíneo. Asimismo contradice la suposición de que el aluminio en cerebro es una huella de su absorción pasiva en células enfermas o en proceso de apoptosis [45]. Sus efectos sobre el ADN, síntesis de proteínas, y la neurotransmisión colinérgica son similares a los efectos deficitarios de la AD [47]. También puede potenciar el efecto del daño oxidativo inducido por el Fe sobre las neuronas del hipocampo, células del cerebelo y la mielina, contribuyendo a los desórdenes neurodegenerativos [48, 49]. La degeneración neuronal está asociada con la disminución de las funciones celulares de dendrita, sinapsis y axón. La AD está caracterizada por placas amiloides y ovillos neurofibrilares, estas estructuras evidentemente disminuyen la función de los receptores de acetilcolina [50].

Hay tres principales hipótesis que se han emitido sobre el efecto tóxico de metales como el aluminio sobre el organismo humano:

- La cascada amiloidea.
- Hipótesis ion metal.
- El estrés oxidativo.

Es posible establecer una relación entre la AD y algunas enzimas inhibidas por el aluminio con estas hipótesis. Especialmente es interesante correlacionar las enzimas presentes en el organismo, con los metales que potencialmente pueden producir la inhibición de las mismas.

Existe una relación entre la acción del aluminio sobre la enzima quimotripsina y las proteasas del grupo de la serina [51] con manifestaciones de AD [52]. El aluminio facilita la hiperfosforilación de proteínas componentes de la placa β -amiloide, contribuyendo a su agregación [53]. Además de manera no-enzimática fosforila la proteína τ humana in vitro [54] e induce la agregación de filamentos pares helicoidales aumentando su resistencia a la degradación proteolítica. La proteína τ normal es sus-

tituida por proteína τ anormal, la cual aumenta con la concentración de aluminio [55, 56].

Otra enzima inhibida por su presencia es la acetilcolinesterasa. En animales de laboratorio la administración de aluminio produce deficiencias de aprendizaje y memoria [57] relacionadas con un deficiente metabolismo de la acetilcolina [58], además presentan disminución de neurotransmisores que también disminuyen en la AD, entre ellos la acetilcolina, sustrato de la enzima acetilcolinesterasa [57].

El aluminio también inhibe enzimas redox como la catalasa, superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa que eliminan radicales libres.

El papel del Al en las tres hipótesis enunciadas anteriormente se presentará a continuación, y su relación con los procesos donde interviene.

2.4.1. La cascada amiloidea

Esta hipótesis plantea que en la AD, el desbalance entre la producción de proteínas amiloides y su desaparición, produce acumulación, ya que los amiloides son las principales sustancias neurotóxicas asociadas con esta enfermedad, acompañadas por otras estructura que son las marañas neurofibrilares (NFTs).

Es un hecho conocido que el aluminio es inhibidor de las proteasas, se han propuesto varios modelos para explicar la toxicidad del Al(III), en ellos se ha considerado la inhibición de la actividad proteolítica de las proteasas de la serina como la tripsina y α -quimotripsina [59] promoviendo la acumulación de la placa β -amiloide y la formación de NFTs [60, 61].

Se ha comprobado que la inyección de filamentos pares de proteína β -amiloide y aluminio dentro del cerebro de ratas, induce codepósitos estables de β -amiloide y α -quimotripsina [62].

Un modelo termodinámico demostró que el Al(III) interactúa con los liposomas que simulan la membrana celular en dos sitios de enlace, el primero con la cabeza polar de los fosfolípidos, y el segundo con sitios periféricos [63], modificando la estructura de la membrana de los liposomas [64].

La α -quimotripsina, endopeptidasa estereoespecífica del grupo de la serina, es secretada por las células acinares del páncreas y activada por la tripsina en el duodeno. Tres residuos de aminoácidos, His 57, Asp 102 y Ser 195, forman la triada catalítica que hidroliza el enlace peptídico [65].

Los oligómeros de proteína β -amiloide ($A\beta$) son estructuras indicativas de toxicidad temprana, y su acumulación se inicia intracelularmente [66], la presencia de Al^{3+} promueve la acumulación intracelular de agregados Al^{3+} - β -amiloides y formación de estructuras hidrofóbicas expuestas al solvente, que evolucionan a agregados poliméricos debido al aumento en la conformación de la hoja β , acelerada por el Al^{3+} [67].

Los agregados presentan una mayor permeabilidad a través de la barrera sangre cerebro, promoviendo la acumulación intracerebral de $A\beta$. Estudios comparativos han demostrado que los complejos $A\beta$ y Al^{3+} muestran mayor agregación que la misma proteína $A\beta$ [68], además debido a que el aluminio en su unión con los péptidos β -amiloides causa un cambio conformacional, se aumenta su resistencia a la degradación por la catepsina D, otra enzima implicada en la proteólisis de la placa neurítica. [69], indicándose que el aluminio se asocia con los péptidos $A\beta$ como complejo soluble, entonces la catepsina D no realiza la degradación de los péptidos $A\beta$, debido a la interferencia estérica del complejo Al^{3+} y péptidos $A\beta$ [70].

El péptido β -amiloide ($A\beta$) se deriva por procesos proteolíticos de proteínas precursoras y algunas de estas contienen una parte homóloga en alto grado, al inhibidor de la tripsina pancreática bovina, (BPTI), el cual también inhibe a la α -quimotripsina.

Se propone que en el cerebro con AD, el Al^{3+} favorece el proceso proteolítico que genera el precursor β -amiloide [51], como el enlace de BPTI con la α -quimotripsina es favorecido por concentraciones de Al(III) del orden μM , se disminuye su capaci-

dad proteolítica aumentando el depósito de la placa amiloide e iniciándose la formación de la placa neurítica [52, 71].

Como el aluminio tiene afinidad por las proteínas y enzimas que enlazan calcio, su efecto inhibitor puede ser relacionado a que enlace dominios de calcio sobre las proteasas [72].

Los filamentos pares helicoidales, (PHFs) junto con las (NFTs) son estructuras que caracterizan la AD. Las PHFs están formadas de isoformas anormales de proteínas τ de bajo peso molecular, se encuentran en los microtubulos, están hiperfosforiladas en diferentes sitios. La fosforilación deriva de mayor actividad de la kinasa y de una menor de la fosfatasa. El ion Al(III) induce una catálisis no-enzimática de un enlace covalente, incorporando el ion fosfato de las bases nitrogenadas en la proteína τ . Los grupos fosfato negativos en la proteína y su enlace con el Al(III) producen NFTs, este proceso de agregación de la proteína fosforilada es irreversible [73], se forman oligómeros de proteína τ de mayor tamaño con Al^{3+} [74]. La administración de aluminio a ratas, produce lesiones en el hipocampo con células piramidales más pequeñas y carentes de microtúbulos [75].

El efecto de las proteasa de la serina, α -quimotripsina, y las enzimas catepsina D, SOD, la acción de radicales mediada por el Fe^{2+} , y el ion Al (III) se presenta en la Figura 2.1.

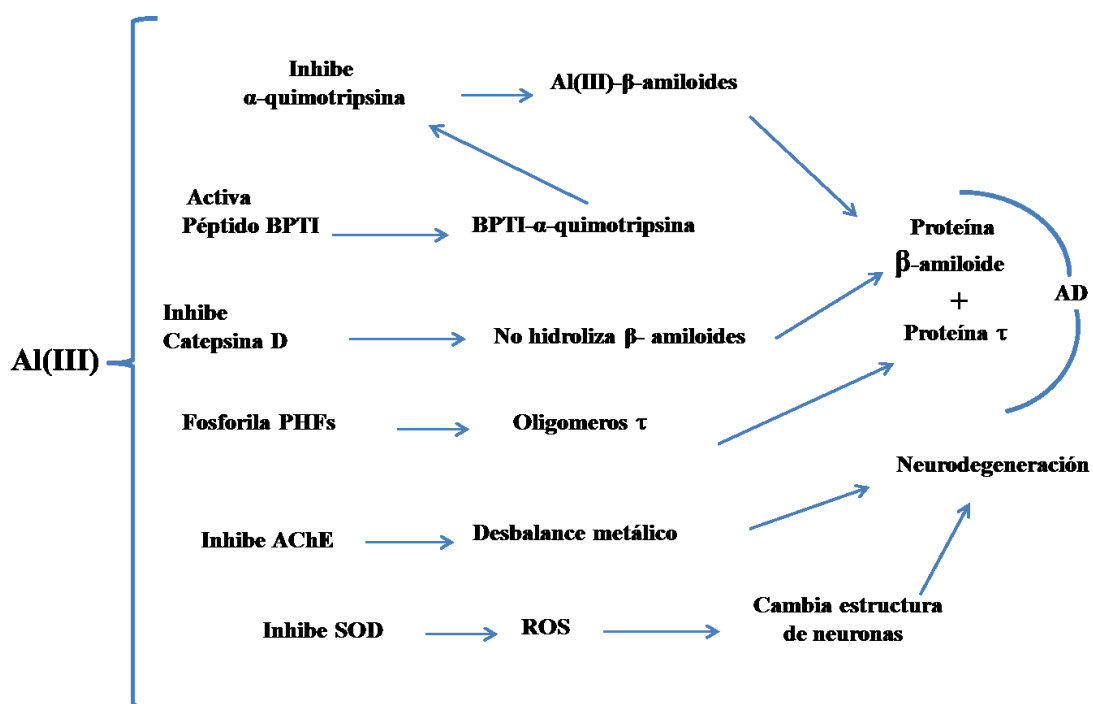


Figura 2.1. Relación de enzimas inhibidas por Al(III); β-amiloides, proteína τ, neurodegeneración y estrés oxidativo mediado por radicales libres.

2.4.2. Hipótesis ion metal

La hipótesis ion metal postula que una causa destacada de AD es una homeostasis metálica deficiente en particular de Zn, Cu y Fe, con un desbalance Aβ como consecuencia.

Las drogas antiamiloides no han tenido un éxito completo en el tratamiento de la enfermedad de AD, esto ha conducido a pensar en el rol de los iones metálicos.

Los niveles de hierro se han reportado más altos en las neuronas de AD que en neuronas de personas sanas [76]. La transferrina transporta hierro y aluminio, pero en los enfermos de AD, la transferrina transporta más hierro dejando más aluminio en suero sanguíneo disponible para alcanzar el cerebro, además la ferritina es más alta en los pacientes de AD que en los controles y forma complejos con aluminio, disminuyendo la velocidad de incorporación de hierro [71, 77]. La proteína precursora de la cascada

amiloide (APP) es regulada y reacciona con iones metálicos. Existen dos reservorios de iones metálicos, los “libres” (enlazados débilmente) y quelatables y los fuertemente enlazados a proteínas o a residuos de aminoácidos [78]. El ion zinc que participa en la cascada amiloide presenta cambios entre su contenido en hipocampo de pacientes de AD [79] y líquido cerebroespinal de pacientes de Parkinson [80], sugiriendo que las reservas de zinc libre y enlazado están en constante cambio [81].

Las evidencias apoyan que biometales endógenos como cobre, hierro, zinc y exógenos como aluminio [82], pueden estar involucrados como factores o cofactores en las etiopatogénias neurodegenerativas.

Hay nuevos hallazgos a favor, como el hecho de que las estrategias terapéuticas que restauran la homeostasis de los metales pueden retrasar y modificar el desarrollo neurodegenerativo asociado con AD [83].

El efecto del aluminio en la hipótesis del balance homeostático ion metal se documenta en animales de laboratorio. Se encuentran cambios en la homeostasis endógena de los metales Ca, Cu, Zn Al en tejidos de cerebro e hígado. Los contenidos de Al en hipocampo son significativamente mayores y son menores en la corteza, lo mismo el Zn, pero el Cu disminuye comparados con los controles lo mismo el Ca [84]. El Zn ha sido relacionado con las enzimas que participan en la cascada amiloide y el Cu regula el nivel de radicales libres a través de la enzima superóxido dismutasa (SOD) [85]. Diferentes complejos de Al con citrato hacia cultivos de células de hipocampo, muestran diferente toxicidad hacia las células [86].

En el caso de AD se ha encontrado mejoría en los pacientes usando deferrioxamina (DFO), agente quelatante de aluminio y hierro [87]. Antes de los años 90, se empleaban bajas dosis intramusculares de DFO, para reducir el exceso de hierro y aluminio en los pacientes de hemodiálisis renal [88].

Las políticas de salud pueden aprovechar información existente sobre la participación del Al en la AD para disminuir sus efectos tóxicos [89]. Se ha enfocado la prevención y tratamiento del AD en el uso de antioxidantes y otros nutracéuticos como

azafrán, curcumina, resveratrol, que contrarrestan los efectos tóxicos del Al y se emplean junto con drogas anticolinérgicas [60].

2.4.3. La hipótesis del estrés oxidativo

La edad, los factores genéticos y ambientales acumulan defectos en los genes, que disminuyen las funciones de la mitocondria y se presentan desórdenes neurológicos graduales, al alcanzar un nivel mínimo se inicia apoptosis de las neuronas. Estos cambios son inducidos por ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) que producen radicales libres provocando mutaciones [90] y estrés oxidativo [91]. El papel de las enzimas removedoras de radicales libres se altera.

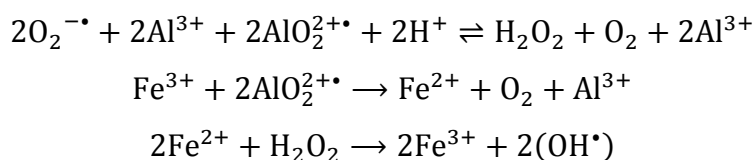
Una defensa contra el estrés oxidativo es la SOD en sus isoformas SOD-1 (intracelular) y SOD-3 (extracelular) las cuales dependen de Cu(I)/Cu(II) y Zn(II) en sus sitios activos respectivamente [92]. Es conocido que mutaciones en esta enzima causan esclerosis lateral amiotrófica (ALS) [93, 94] que presenta similitudes con la AD, destacando la importancia del estrés oxidativo en la neurodegeneración.

Los iones metálicos participan en el estrés oxidativo de la AD, además intervienen en la aparición y desaparición de ROS y RNS en medios celulares [95, 96].

La agregación de complejos de A β -Al produce disfunción mitocondrial, debido a que aumenta la actividad de las enzimas implicadas en la cadena de transporte electrónico en la mitocondria y producción de ROS en las neuronas. Además, promueve alteraciones en el citoesqueleto neuronal y aparición de estructuras globulares debido a que provoca una mayor expresión de las enzimas que causan cambios conformacionales en las neuronas [97].

Debido a que hay una relación entre procesos cerebrales inflamatorios y la AD, se ha planteado una hipótesis de que el aluminio puede activar la generación de ROS e iniciar una cascada inflamatoria [98]. Las especies reactivas de oxígeno conducen al estrés oxidativo y de allí a los correspondientes daños neurológicos.

Se plantea la posibilidad de que el Al forme un complejo estabilizado AlO_2^{2+} -superóxido, que reduzca Fe^{3+} a Fe^{2+} y luego el Fe^{2+} producido se oxide a Fe^{3+} generando daño oxidativo por la formación de radicales ($\bullet\text{OH}$) en la reacción de Fenton. Debido a que la reacción entre el complejo Al-superóxido y Fe^{3+} para producir Fe^{2+} es espontánea, se produce pérdida de un electrón desde el ion radical en el complejo Al-superóxido y se disocia oxígeno molecular del aluminio, recobrándose un complejo hexahidratado de Al^{3+} , este proceso es cíclico. Otras especies como $\text{Al}(\text{OH})_2^{2+}$ y $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ siguen esta misma consideración. Se sugiere que la actividad oxidante de Al^{3+} en sistemas biológicos es a través del mecanismo de formación de un superóxido [99] y recobrándose las especies iniciales Al^{3+} y Fe^{3+} como se expresa en las reacciones siguientes.



La combinación de estos eventos puede conducir al daño neurodegenerativo en reacciones donde intervengan ROS.

Las interacciones entre aluminio e hierro, el cual es iniciador de procesos de oxidación se han estudiado en tejidos cerebrales midiendo velocidades de generación de ROS, el compuesto $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ empleado en diversas concentraciones, no potencia la producción de ROS. El quelato aluminio-deferrioxamina en ausencia de hierro tampoco potencia la formación de ROS. El uso combinado de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ y FeSO_4 potencia la velocidad de aparición de los ROS [100], la presencia de ferritina, que se liga a la biodisponibilidad de hierro mitocondrial produce un exceso de Fe^{2+} que en presencia de oxígeno, produce radicales que inducen modificación proteica, peroxidación lipídica, formación de la placa neurítica [101] y agregación de péptidos asociados con la neurodegeneración. Su participación con el ácido desoxirribonucleico (DNA) se relaciona con alteraciones en la expresión de los genes [102].

El metabolismo mitocondrial es el sitio de la acción toxicológica de sistemas redox dependientes de aluminio e hierro. Las enzimas sensibles a procesos redox en el ciclo

del ácido tricarbóxico (TCA) y la fosforilación oxidativa son dramáticamente disminuidas por la exposición al aluminio [103].

El aluminio se concentra en regiones cerebrales que se conoce son afectadas por AD como la amígdala, la corteza cerebral y el hipocampo [104] donde afecta las células piramidales y neuronales, encontrándose en lesiones típicas del AD como las NFTs [105].

El aluminio interfiere con el transporte en los neurofilamentos de los impulsos nerviosos, debido a que fosforila las proteínas y altera su capacidad para transportarse a lo largo del axón, como resultado la proteína precursora β -amiloide se acumula dentro del axón y lo distiende [106].

3. Métodos analíticos para la cuantificación de aluminio en diferentes matrices

Existe un interés creciente en la determinación de aluminio. Considerando que causa problemas de salud a bajo nivel de concentración, es necesario disponer de métodos de análisis sensibles, rápidos y precisos para enfrentar este hecho.

Actualmente se cuenta con un compendio elaborado de los métodos de análisis de Al en aire, suelo, plantas, rocas y en muestras biológicas de interés en la salud humana [107].

Los métodos para determinar aluminio se dividen en los que determinan aluminio total que corresponden a las técnicas espectrométricas como la absorción en visible (UVVis), la fluorescencia y los que determinan especies, mencionados a continuación.

Para determinar especies de aluminio, se requieren fraccionamientos previos, empleando resinas de intercambio iónico a diferente pH y el análisis de las fracciones por las técnicas espectrométricas. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) puede acoplarse con técnicas espectrométricas para determinar especies de aluminio. Los métodos electroquímicos voltamperométricos con agentes complejantes permiten especiar aluminio [108].

Tradicionalmente los métodos de análisis de aluminio total en muestras biológicas, se han realizado por técnicas espectrométricas como la absorción electrotérmica con horno de grafito (ETAAS), espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inducido (ICP-AES), espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inducido con detección de masas, (ICP-MS) y análisis por activación neutrónica (NAA). Los límites de detección inferiores a $\mu\text{g/L}$ corresponden a los métodos espectrofotométricos, espectrofluorométricos, y absorción electrotérmica; son menores para ICP-AES con plasma axial y para ICP-MS [108, 109].

Algunos métodos espectrofotométricos y espectrofluorométricos han utilizado reactivos cromogénicos y han permitido determinar aluminio en agua a concentraciones inferiores a $\mu\text{g/L}$ [110, 111].

Hay disponibles métodos oficiales que permiten analizar aluminio por las técnicas, colorimétrica con aluminón, gravimétrica en desodorantes usando 8-hidroxiquinoleína, por absorción atómica con llama en polvos de hornear y acidificantes de suelo tipo sulfatos, con un ámbito dinámico del orden de mg/L en Al, también en residuos sólidos usando ICP-AES se obtiene un límite de detección de 0.045 mg/L, en aguas por la técnica ICP-MS se han logrado límites de detección de 1 ug/L [112].

La espectrometría de masas se aplica a la determinación de la relación isotópica de $^{26}\text{Al}/^{27}\text{Al}$ con el objetivo de estudiar los efectos fisiológicos de la exposición al aluminio en estudios realizados con plantas y animales [35].

Para determinar aluminio en algunas muestras, es necesaria una mineralización previa que elimine la materia orgánica, estas se pueden reducir a cenizas en una mufla, posteriormente se disuelven [113]. Los métodos de digestión húmeda emplean HNO_3 o cualquier otro ácido, la digestión con microondas acelera los procesos de descomposición de muestras sólidas como minerales, metales, hueso, tejidos y líquidas como bebidas y orina. Se emplean recipientes de Teflon debido a sus ventajas inherentes [114].

Cuando se utiliza ETAAS, se deben evaporar los ácidos para evitar el daño a los tubos de grafito. Las muestras biológicas que contienen lípidos en cantidad considerable deben digerirse con H_2O_2 o HClO_4 para reducir la carbonización de los ácidos grasos durante el proceso de evaporación. El HClO_4 debe evaporarse antes de la ETAAS [115]. En la determinación de Al por ETAAS se recomienda el uso de sales de Mg que se usan como modificadores de matriz, el $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ durante el proceso de pirólisis puede atrapar elementos de la matriz, que se volatilizarían con pérdida del aluminio.

En los métodos de NAA es posible encontrar interferencias como el Na y Cl, que deben ser removidos antes de la determinación. Si hay Ca presente contribuye a la señal de fondo y eleva los límites de detección [113]. La acidificación estabiliza el aluminio, pero lo puede solubilizar de los recipientes de vidrio, por lo que la cristalería debe ser tratada de forma especial para descontaminarla [116].

Los métodos que determinan Al de manera total, antes mencionados no son muy informativos. Existen métodos de fraccionamiento que distinguen grupos de especies de Al, en lugar de especies. El método de Driscoll está basado en la reacción de Al con oxina, ferrón o violeta de pirocatecol, posteriormente se hace una separación con resinas de intercambio iónico para determinar el Al reactivo al ácido, el Al reactivo y el Al que no es intercambiable. El Al soluble en ácido se piensa que contiene fuertes compuestos orgánicos de aluminio, poliméricos y coloidales, el Al libre o lábil se considera que se encuentra como $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{+3}$ y complejos de Al como F^- , SO_4^{-2} y Al-OH . También hay una fracción monomérica no lábil de Al que se encuentra acomplejado con ácidos orgánicos disueltos provenientes de las sustancias húmicas [117].

Una vez que las fracciones se han separado, se aplican diferentes métodos analíticos, como HPLC con derivatización post columna que ha permitido separar $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{+3}$, especies de Al-F y complejos de ácidos orgánicos pequeños. Se acopla la cromatografía de HPLC con técnicas de detección de elementos como ICP-MS, ICP-AES, ETAAS, o con electrodos selectivos de ion F^- , y se desarrollan metodologías que separan diferentes especies de Al y complejos de Al con hidróxidos, fluoruros fosfatos y también con transferrina y desferrioxamina.

Se emplea la técnica NMR con ^{27}Al para determinar $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{+3}$ y $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_x^{(3-x)+}$ y complejo con ligandos inorgánicos, orgánicos pequeños y aminoácidos. El análisis electroquímico entre pH 5.0 y pH 8.5 puede detectar especies reactivas totales y especies totales disueltas de forma similar al método de Driscoll [118].

Se han aplicado técnicas de tinción con aluminon y azurina de solocromo para visualizar el proceso de la mineralización de aluminio en hueso. La tinción con lumogallion se ha combinado con microscopia de láser para visualizar aluminio en células cultivadas conjuntamente con $\text{AlO}(\text{OH})$ [119].

También se ha investigado la presencia de aluminio, por medio de microsondas combinadas con otras técnicas como espectrometría de masas de ion secundario, espectrometría de masas con microsonda de láser, microanálisis de rayos X de longitud de onda dispersiva [120].

Debido a la ubicuidad del Al en ambiente es necesario extremar las precauciones en su determinación, puede ocurrir contaminación desde múltiples fuentes como material particulado del aire; por lo que el uso de filtros para el aire de los laboratorios de análisis, sistemas de aire acondicionado, cristalería lavada con HNO₃ y EDTA, el uso de reactivos Suprapuros y ácidos de calidad Suprapur es necesario. La manipulación de la muestra debe ser minimizada. Los procedimientos de control de calidad deben incluir los blancos para controlar la contaminación, un estudio externo realizado de aseguramiento de calidad indica la necesidad de mejora en muchos laboratorios para conseguir un desempeño apropiado en su determinación [121].

Las técnicas electroquímicas empleadas en la determinación de aluminio reúnen las ventajas de una buena sensibilidad, con rapidez y bajo coste, aunque presentan el problema de ser altamente contaminantes, cuando se emplean electrodos de mercurio. De hecho, el electrodo de mercurio de gota suspendida (HMDE) ha sido de los más empleados para determinar aluminio empleando complejantes como cupferron [122, 123] y ácido 1,2-dihidroxi-antraquinona-3-sulfónico (DASA) [124,125] por medio de voltamperometría de redisolución adsortiva (AdSV). Otros agentes complejantes como rojo de alizarina [126, 127], violeta de alizarina [128], violeta de solocromo [128, 130, 131], lumogallion [132], violeta de pirocatecol [132, 134] arsenafo [135], norepinefrina [136], pirogallol [137] se han empleado en su determinación por medio de voltamperometrías adsortivas como voltamperometría de redisolución adsortiva (AdsSV) y voltamperometría de onda cuadrada con redisolución adsortiva (SWAdsSV).

También se han utilizado enzimas como la glutamato deshidrogenasa en la determinación de aluminio con HMDE, así como polarografía diferencial de impulsos (DPP), [138] consiguiendo un límite de detección menor de 3×10^{-5} M.

También está descrita la utilización de electrodos de carbono. Así, neurotransmisores como L-dopa, empleados como ligando, se han usado para determinar aluminio [139] con un electrodo de carbón vítreo (GCE) por DPV, consiguiendo detectar cantidades del orden de 10^{-7} M. Se ha empleado ditióxamida para determinar aluminio con muy bajos límites de detección [140]. Igualmente, ha sido utilizado un electrodo de pasta de carbono modificado con hematoxilina [141].

También se han empleado técnicas potenciométricas para la determinación de aluminio [142]. Un resumen de los métodos electroquímicos para la determinación de aluminio se presenta en la Tabla 2.5.

Todo lo expuesto pone de manifiesto la necesidad de poner a punto otros métodos electroquímicos que ofrezcan la posibilidad de cuantificar el aluminio a bajos niveles de concentración y que ofrezcan ventajas adicionales sobre los anteriormente mencionados. Sería importante contar con métodos electroquímicos alternativos para la determinación de aluminio en aguas y muestras de interés biológico o ambiental.

En este sentido la utilización de electrodos serigrafiados modificados con enzimas se presenta como una alternativa de interés en la puesta a punto de sensores desechables para la determinación de aluminio. Cabe destacar que en la literatura consultada no se reporta ningún biosensor enzimático para la determinación de aluminio en aguas.

Tabla 2.5. Técnicas electroquímicas para la determinación de aluminio

Técnica	Electrodo	Modificación	Rango dinámico	LOD	Potencial	pH	Interferencias	Muestras	Ref.
SWV	Pasta de carbono	Hematoxilina	1.0×10^{-9} a 1.010^{-2} M	1.0×10^{-9} M	0.0 V			Agua subterránea	[141]
Potenciometría	Sensor de membrana	Policloruro de vinilo (PVC) y Al MCM-41	1.0×10^{-7} a 1.0×10^{-1} M	8.6×10^{-8} M				Drogas, alimentos	[142]
SWAdsV	HMDE	Rojo de pirogalol (PR)	0.0 a 1.10×10^{-6} M	3.7×10^{-8} M	-1.25 V	8.5		Agua de mar sintética, material de referencia CRM-SW, orina	[137]
AdsV	HMDE	Cupferron	7.0×10^{-11} a 1.5×10^{-9} M	3×10^{-8} M	-1.18 V vs. SCE	7.0		Alimentos y agua	[122]
LSV	HMDE	Norepinefrina (NE)			-1.32 V vs. SCE			Agua y muestras biológicas sintéticas	[136]
AdsV	HMDE	Ácido 1,2-dihidroxiantraquina-3-sulfónico (DASA)	3.0×10^{-8} a 1.1×10^{-6} M	3.0×10^{-8} M	-0.9 V		Zn(II)	Concentrados de diálisis	[124]
DPP	HMDE	Glutamato deshidrogenasa (GDH)	30 a 80×10^{-6} M	$<30 \times 10^{-6}$ M		6.5 y 7.5		Biológicas y ambientales	[138]
Amperometría	Electrodo de carbón	Ácido 1,2-dihidroxiantraquina-3-sulfónico (DASA)	0 a 5.9×10^{-5} M		0.6 V vs. Ag/AgCl		Fe(III)	Agua potable	[125]
DPV	Carbón vítreo	Rojo de alizarina S sol-gel sílica (ARS)	4×10^{-7} a 1.4×10^{-6} M	8×10^{-8} M	0.4 V	4.5		Muestras de agua	[127]
AdsASV	CPE/CNTs	Violeta de alizarina (AV)	1×10^{-9} M a 1×10^{-7} M	6.0×10^{-10} M	0.530 V	4.5		Zn(II), V(V) y Mo(VI)	[128]
DPV	Electrodo de carbón vítreo	L-dopa	1 a 16×10^{-6} M	8.9×10^{-7} M	0.4 V vs. ECS	8.5		Cabello, órganos de puerco, agua potable, dializado renal sintético.	[139]

Continuación de la Tabla 2.5.

Técnica	Electrodo	Modificación	Rango dinámico	LOD	Potencial	pH	Interferencias	Muestras	Ref.
AdsSV	HMDE	Ditioxamida	0.011×10^{-6} a 2.59×10^{-6} M	4×10^{-10} M	-0.050 V	6.5	Fe(II), Co(II), Ni(II), Sb(III), Bi(III), Cr(III), Sn(III)	Patatas, agua de laboratorio, HCl Merck, tomates	[140]
DPAdsSV	HMDE	Violeta de pirocatecol (PCV)	1.99×10^{-7} a 9.89×10^{-6} M		-0.80 V	5.5	Cr(VI)	Metales en agua de río	[133]
AdsSV	HMDE	Lumogallion	1.5×10^{-9} a 1.5×10^{-7} M	1.5×10^{-9} M					[132]
AdsSV	HMDE	Arsenazo III	0 a 6×10^{-6} M		-0.330 V	3.6	U(VI) como UO_2^{2+} , Cr(III) y Cr(VI), F ⁻ .	(SRM 1575 agujas de pino)	[135]
DPAdsSV	HMDE	Violeta de solo-cromo RS (SVRS)	7.4×10^{-7} a 3.7×10^{-5} M	1.1×10^{-7} M	-0.60 V vs. Ag/AgCl	5.3		Agua de hemodíalisis	[130]
AdsSV	HMDE	Violeta de solo-cromo RS (SVRS)	0 a 1.1×10^{-6} M	5.5×10^{-9} M	-0.61 V	4.5	Fe(III)	Muestras de nieve.	[131]
SWAdsSV	HMDE	Cupferron	1.9×10^{-7} a 1.1×10^{-6} M	7.4×10^{-8} M	-1.30 V	7.0	Fe(III), Cr(III)	Solución de hemodíalisis	[123]
SWAdsV	HMDE	Rojo de alizarina S	3.0×10^{-7} a 4×10^{-6} M	1.1×10^{-7} M	0.788 V	9.2		Agua potable	[126]
AdsSV	HMDE	Cupferron	7.4×10^{-11} a 1.5×10^{-9} M	3.0×10^{-8} M	-1.18 V vs. SCE	5.4		Arroz, té, pan, patatas fritas, galletas,	[122]
LSV	HMDE	Violeta de pirocatecol (PCV)	3.7×10^{-8} a 9.3×10^{-7} M	3.7×10^{-9} M	-0.90 V	6.5	V(IV), V(V)	Muestras acuosas	[134]
AdsSV	HMDE	Violeta de solo-cromo RS (SVRS)	1.0×10^{-8} a 1.0×10^{-7} M 1.0×10^{-8} a 1.0×10^{-6} M	5.1×10^{-9} M 3.8×10^{-9} M	-0.60V	5.2 8.5	F ⁻ , Mg(II), Fe(II), Fe(III), Ca(II), Zn(II), In(II), Bi(II), Pb(II), Ba(II), N ₂ , CO ₂ , Na ⁺ , K ⁺ , NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ⁼	Aguas naturales	[129]

4. Sensores electroquímicos serigrafiados

4.1. Biosensores amperométricos

Un biosensor se puede definir como la unión de un transductor y una unidad específica de reconocimiento biológico. La clasificación de los biosensores puede realizarse desde dos puntos de vista diferentes. Una clasificación más general y lógica es aquella basada en *la naturaleza del proceso biológico*. Pueden clasificarse en dos grandes grupos [143]:

- a) Biosensores catalíticos, cuyos receptores pueden ser enzimas, tejidos o microorganismos.
- b) Biosensores de afinidad, entre los que se encuentran los inmunosensores, los basados en quimiorreceptores y los que utilizan ácidos nucleicos.

Una segunda clasificación es la que se basa en el *fundamento del transductor*. Atendiendo a este criterio, los biosensores pueden clasificarse en:

- a) Electroquímicos, que a su vez se dividen en potenciométricos, amperométricos y conductimétricos.
- b) Ópticos, que pueden ser espectroscópicos de absorción, fluorimétricos o fosforimétricos y otros.
- c) Térmicos.
- d) De masa.

Los biosensores electroquímicos poseen una serie de ventajas: las medidas electroquímicas pueden ser realizadas en volúmenes pequeños pudiendo aplicarse a la monitorización “in vivo”. La señal eléctrica puede ser transducida de acuerdo con la velocidad de reacción y este hecho permite cuantificar productos “online” o “in situ”. Los límites de detección que se obtienen, del orden de 10^{-9} mol L⁻¹ y 10^{-6} mol L⁻¹ son adecuados para la detección de numerosos analitos de interés. La instrumentación electroquímica es simple y de bajo coste, con capacidad de inclusión en sistemas integrados, facilidad de automatización, versatilidad que permite el diseño a la carta, integración del sistema de tres electrodos en un solo dispositivo, el consumo de reac-

tivos es mínimo y estos son poco contaminantes, pero debido a su pequeño tamaño la instrumentación asociada debe ser muy sensible.

Las técnicas electroanalíticas poseen una baja selectividad comparadas con otras técnicas analíticas, este inconveniente se elimina mediante la incorporación de un sistema selectivo de reconocimiento biológico. Los biosensores amperométricos enzimáticos reúnen la especificidad de las enzimas con la simplicidad de los transductores amperométricos.

Los biosensores amperométricos más utilizados son los electrodos enzimáticos y registran corrientes faradaicas debidas a intercambios electrónicos entre el sistema biológico y un electrodo mantenido a un potencial constante. El buen funcionamiento de un biosensor depende de la inmovilización de la enzima sobre el transductor como primer tipo; manteniendo su estabilidad. Los métodos de inmovilización comprenden métodos físicos, como adsorción o atrapamiento, y métodos químicos, como unión covalente y entrecruzamiento. Otra forma de inmovilizar es polimerizar capas sucesivas en una disolución que contiene la enzima o atraparla en una membrana de Nafion [144].

El segundo tipo de inmovilización, la inclusión de la enzima en la matriz del transductor, se usa para la fabricación de electrodos enzimáticos compósitos, consiste en preparar una mezcla de la enzima y grafito en polvo, que es el transductor, a la que se agrega un aglutinante. Se homogeneiza la mezcla para formar una pasta de carbono modificada y se coloca en un molde con un contacto eléctrico. Con este procedimiento se obtienen biosensores con un depósito tridimensional de enzima, enzimas o mediadores.

Existen tres generaciones de biosensores amperométricos los que se clasifican por la manera de transferir electrones entre el electrodo y la enzima [145]:

- La primera generación incluye a los que están basados en la medida de uno de los productos o del cofactor de la reacción enzimática. Por tanto es necesario que la sustancia analizada tenga propiedades electroquímicas.

- La segunda generación incorpora un mediador que se encarga de la transferencia electrónica entre el centro redox de la enzima y el electrodo, minimizando la competencia con el cofactor, el mediador debe tener un bajo potencial redox para minimizar las interferencias. Se pueden clasificar en transportadores naturales como la ubiquinona, citocromo c y artificiales como ferroceno y tetratiofulvaleno (TTF).
- La tercera generación de biosensores enzimáticos, es aquella donde la transferencia de electrones entre el centro activo de la enzima y la superficie del electrodo se realiza de manera directa [146], debido a que el centro redox en la mayoría de las enzimas no está expuesto, la transferencia electrónica es muy difícil entre el centro redox y la superficie del electrodo.

Por su tamaño los biosensores amperométricos pueden construirse con minielectrodos serigrafiados o bien con electrodos sólidos convencionales inertes de carbón, carbón vítreo, oro y platino.

Una clasificación general de acuerdo con el material empleado en el electrodo está descrita en [147]:

- Electrodos basados en polímeros donde se usa una película polimérica para inmovilizar la enzima [148].
- Electrodos de pasta de carbono [149] y carbón vítreo [150].
- Electrodos basados en nanomateriales [151, 152], debido a que estos proporcionan alta actividad catalítica por su tamaño.
- Electrodos basados en mono capas autoensambladas (SAMs), que son ensamblajes moleculares ordenados formados por adsorción de un surfactante activo sobre una superficie sólida [153]. Las SAMs de alkanotioles sobre oro y sistemas basados en silano son las más empleadas, aunque se han obtenido monocapas de tioles con platino.
- Electrodos serigrafiados [154], son biosensores desechables con usos clínicos, ambientales e industriales, confeccionados por la impresión sucesiva de diferentes tintas sobre una superficie sólida. Las técnicas empleadas en la cons-

trucción de sistemas integrados son las fotolitográficas de película delgada (thin film) y serigráficas de película gruesa (thick film).

- Electrodo basado en películas de Langmuir–Blodgett [155]: son películas ultradelgadas altamente organizadas que se forman en la interfase agua-aire y pueden crecer por sucesivos depósitos de las monocapas.

Como se puede ver, los principios de la detección junto con la gran variedad de enzimas empleadas, las técnicas de inmovilización enzimática, los tipos de electrodos empleados, la incorporación de nanomateriales en los electrodos; hacen la aplicación de una clasificación general muy difícil.

4.2. Electrodo serigrafiado

El problema más común de las técnicas electroquímicas que emplean los electrodos sólidos convencionales es la falta de reproducibilidad de los resultados, lo que fundamentalmente se debe a la dificultad de tener superficies electródicas exactamente iguales para cada medida. Los electrodos de gota de mercurio son los que han presentado menores problemas en este sentido, pero su toxicidad justifica la búsqueda de otras alternativas.

La sustitución de los clásicos electrodos y celdas por dispositivos serigrafiados desechables aporta numerosas ventajas:

- Permite disponer de electrodos idénticos, por lo que se mejora la reproducibilidad con un esfuerzo mucho menor.
- Al ser electrodos desechables evitan todo el proceso de limpieza habitual en los electrodos sólidos.
- Los electrodos se pueden construir de acuerdo con las características de cada problema de análisis, pudiéndose seleccionar la composición de los electrodos al imprimir la pasta elegida modificada convenientemente (con enzimas,

agentes complejantes etc.), aumentando así la afinidad con el analito que se investiga. De igual manera, pueden incorporarse nanomateriales.

- Un gran número de unidades de tres electrodos de pequeño tamaño, se imprimen simultáneamente en una hoja de celulosa por medio de unas pantallas prediseñadas que tienen grabado el circuito elegido (forma y tamaño del sistema de los tres electrodos). Estas unidades se conectan fácilmente a un potencióstato portátil, constituyendo así un medio adecuado para hacer análisis “in situ”. Serán por tanto susceptibles de ser aplicados en la construcción de “biosensores de bolsillo” similares a los que utilizan los enfermos de diabetes para el control de la glucosa.

En la actualidad, esta tecnología se está empezando a aplicar con notable éxito a la construcción de electrodos para la determinación de moléculas de interés biológico, pesticidas, metales pesados, insecticidas, sulfuros y otras sustancias contaminantes o de interés en diversos campos [156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165]. Una revisión bibliográfica en la que se muestra las aplicaciones de los electrodos serigrafados en diversos campos ha sido realizada [166]. El hecho de que la “tinta” o pasta de impresión pueda ser modificada con partículas metálicas, mediadores, biocomponentes etc., permite la construcción de sensores y biosensores específicos y desechables de gran utilidad. A pesar de que hay un creciente interés por este tipo de dispositivos, son muy pocos los grupos de investigación que se dedican a la construcción de los mismos por las dificultades que lleva consigo el proceso.

4.2.1. Elaboración de electrodos serigrafados

En la construcción de los electrodos serigrafados se emplean tres tipos de materiales: el sustrato, las pastas o tintas y el material sensor en el caso en que se trabaje con electrodos de trabajo modificados.

El sustrato es el material de soporte sobre el que se imprimen los elementos funcionales del sensor. En general, el sustrato debe ser robusto, de bajo coste, ser compatible con los demás elementos del sensor y por supuesto ser de un material inerte. Los materiales más utilizados son la cerámica de alúmina y el PVC, pero pueden emplearse también acero esmaltado, policarbonato o bien una cartulina recubierta con pintura acrílica.

En cuanto a las pastas o tintas, existe una gran variedad de ellas y muchas se pueden obtener de casas comerciales especializadas que ofrecen productos con una amplia gama de propiedades fisicoquímicas (viscosidad, conductividad, resistencia térmica, resistencia al agua, etc.). Sin embargo, se realizan modificaciones en las mismas de acuerdo con el objetivo analítico deseado.

Comúnmente, las pastas contienen un agente aglomerante (vidrio pulverizado, resinas, etc.), disolventes (etilenglicol, ciclohexanona, et.) y los aditivos que le confieran sus características funcionales. Si se requiere una pasta conductora se agregan metales pulverizados como platino, plata/paladio, carbono dopado con rodio o platino e incluso pastas de grafito.

Por otra parte, en caso de ser necesario el uso de pastas dieléctricas debe incorporarse aditivos basados en óxidos metálicos o agentes aglomerantes de carácter aislante, como la alúmina.

Finalmente, el material sensor puede incorporarse directamente en la pasta, o es posible fijarlo a la superficie del electrodo empleando otros procesos de inmovilización como adsorción, entrecruzamiento, enlace covalente, etc. En los dos casos es preferible aplicar estos materiales en las últimas etapas del proceso de fabricación.

Las láminas utilizadas en este caso son de PVC con unas dimensiones de 30 mm x 15 mm x 0.5 mm. Para construir los electrodos se emplearon cuatro pantallas diferentes con el diseño correspondiente. El procedimiento seguido, para construir los electrodos empleados, fue el siguiente:

1. En primer lugar se deposita una capa de plata o de carbono para proporcionar conductividad eléctrica a los electrodos. Tras depositar esta capa se deja curar durante 15 minutos a una temperatura de 90° C. Sobre uno de los electrodos, concretamente el de la derecha del sistema, no se deposita posteriormente ninguna capa adicional, constituyendo este electrodo el contraelectrodo del sistema.
2. En segundo lugar mediante el serigrafiado de una capa Ag/AgCl se imprime el electrodo de referencia, (electrodo de la izquierda en la figura). Una vez depositada se realiza el mismo proceso de curado que en la etapa anterior.
3. A continuación se deposita una capa de grafito en la parte central del sistema, lo que constituye el electrodo de trabajo. También en este caso se realiza la etapa de curado del electrodo.
4. Finalmente, toda la superficie, excepto el área de los tres electrodos y los contactos eléctricos situados en la parte superior del sistema, se recubre con una capa de aislante. Esta capa en función de las características de la tinta empleada puede requerir una etapa de curado a temperatura elevada, o puede ser suficiente secarla a temperatura ambiente.

La Figura 4.1 muestra un diagrama esquemático de las etapas de preparación enumeradas anteriormente junto con la depositación de nanopartículas y la inmovilización de enzima sobre un electrodo serigrafiado, en la Figura 4.2 se muestran distintos electrodos construidos por el grupo de investigación de la Universidad de Burgos por medio del procedimiento ya descrito, en la Figura 4.3 se muestra el detalle de un sistema de tres electrodos.

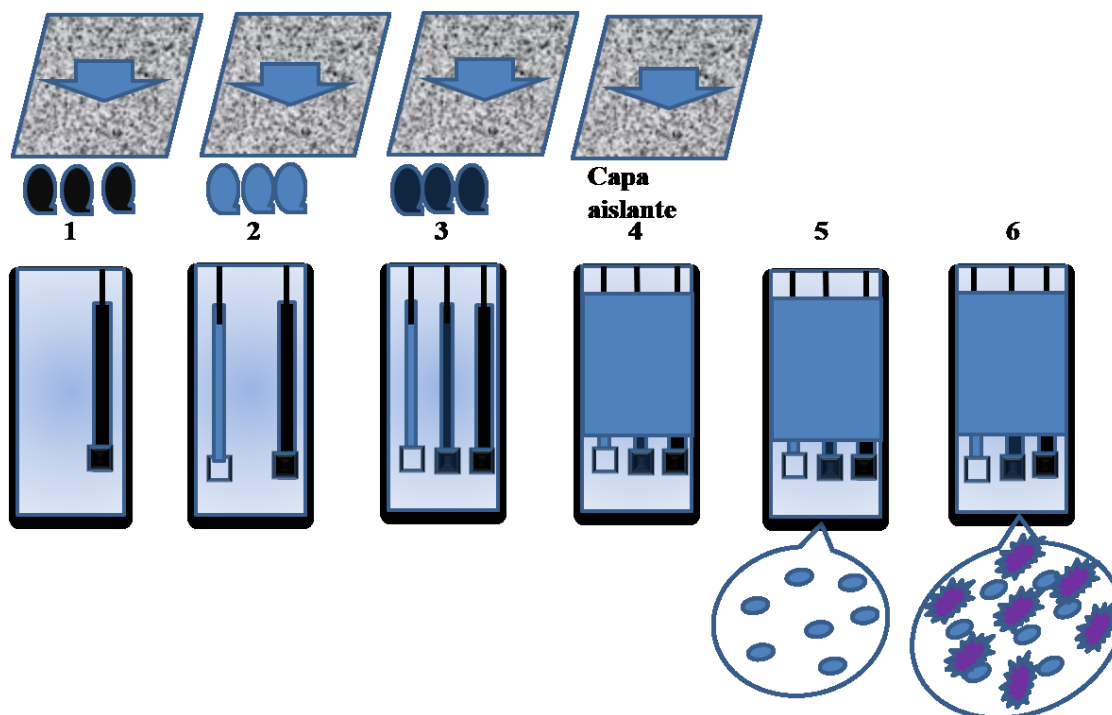


Figura 4.1.1. Capa conductora sobre sustrato de PVC y contraelectrodo, 2. Impresión de electrodo de Ag/AgCl, 3. Impresión de electrodo de trabajo, 4. Capa aislante, 5. Depósito de nanopartículas, 6. Inmovilización de enzima.

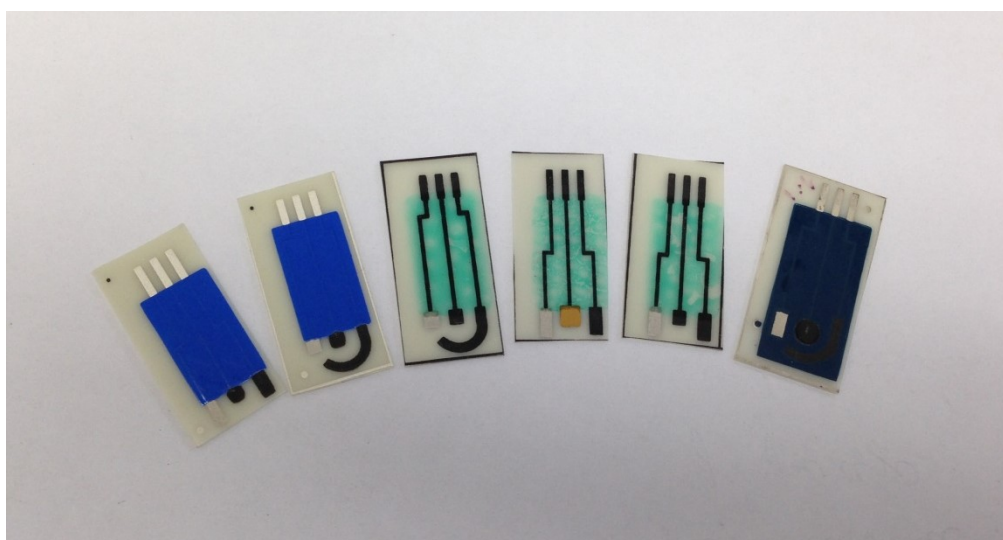


Figura 4.2. Tipos de electrodos serigrafiados fabricados de acuerdo con el procedimiento descrito.



Figura 4.3. Diagrama del sistema electródico usado en un electrodo serigrafiado de carbón. 1. Electrodo de referencia; 2. Electrodo de trabajo de carbón; 3. Contra electrodo; 4. Conexiones eléctricas; 5. Capa aislante dieléctrica.

Estos electrodos serigrafiados (SPEs) pueden utilizarse sin modificar, o modificados con películas de metales, nanomateriales o biomoléculas. A continuación se describen someramente estos tipos.

4.2.2. Tipos de electrodos serigrafiados

La elaboración de electrodos modificados desechables es sin duda uno de los objetivos más importantes del empleo de esta tecnología. No obstante, algunos trabajos muestran que el uso de los electrodos serigrafiados no modificados, representa una alternativa extremadamente atractiva frente al uso de los electrodos convencionales de mercurio, carbono vitrificado, metales nobles y pasta de carbono en electroanálisis.

En la bibliografía se encuentran referencias en las que se utilizan electrodos serigrafiados sin modificar para el análisis de metales. Como por ejemplo, se ha determinado plomo y plata a nivel trazas usando voltamperometría de redisolución adsorptiva [167]. Asimismo, se ha llevado a cabo el análisis de cobre en muestras de agua y suero de bovino.

Otro campo de aplicación de este tipo de electrodos es el análisis de compuestos de interés farmacológico. De esta manera, se ha determinado aurotiomalato [168], empleado en el tratamiento de artritis reumatoide, en muestras de orina, empleando electrodos serigrafiados de pasta de carbono. Otra aplicación interesante es la propuesta [169] para el análisis de vitamina B₂ en muestras alimentarias.

La mayoría de los electrodos serigrafiados se construyen utilizando pasta de carbono, pero también existen trabajos descritos en los que el electrodo de trabajo se serigrafía utilizando pastas de metales nobles como oro y plata. De este modo, se consigue determinar plomo y otros metales potencialmente tóxicos [170] y arsénico [171] mediante un electrodo de oro, al igual que se analiza plomo [172] usando un electrodo serigrafiado con pasta de plata.

Desde hace algunas décadas hay un creciente interés en la utilización de electrodos modificados. Modificar un electrodo consiste en introducir y controlar nuevas propiedades fisico-químicas a un electrodo inerte mediante acoplamiento de especies químicas activas a su superficie. Las posibles modificaciones se pueden clasificar de acuerdo con el material empleado en las siguientes:

- SPEs modificados con películas de metales como:
 - Hg
 - Au
 - Ag
 - Ni
 - Bi
- SPEs modificados con nanopartículas metálicas de:
 - Pt
 - Au
 - Ag
 - Pd
 - Rh
- SPEs modificados con enzimas

Los procesos de modificación más comunes implican la depositación de una película metálica o enzimas. La modificación de los electrodos serigrafiados puede realizarse durante la construcción de los mismos, incluyendo el aditivo modificador en la propia tinta, como en el caso de los mediadores electroquímicos o bien de forma posterior.

Películas Metálicas

Este tipo de modificación, en la que se deposita una fina capa de mercurio sobre un electrodo de grafito, es una de las más utilizadas. Los electrodos así modificados se utilizan fundamentalmente para la determinación de metales, que se pueden analizar fácilmente mediante técnicas de redisolución.

Una de las primeras aplicaciones de este tipo de electrodos fue el análisis de plomo a nivel de trazas mediante voltamperometría de redisolución y potenciometría [173]. Desde entonces numerosos autores han dedicado sus investigaciones al análisis de metales como zinc y cadmio [174, 175] empleando electrodos serigrafiados modificados con película de mercurio.

Debido a la toxicidad del mercurio, como ya se dijo, su incorporación en sensores puede provocar problemas ambientales, por lo que la modificación de los electrodos con películas de otros metales menos contaminantes está cobrando un creciente interés. Por esta razón uno de los metales más utilizado para la modificación de electrodos serigrafiados ha sido el bismuto.

Los electrodos modificados con película de bismuto han sido utilizados sobre todo para el análisis de metales pesados. Un ejemplo de la aplicación de este tipo de electrodos es la determinación simultánea plomo y cadmio empleando cronopotenciometría [176]. También se han empleado otros metales para modificar la superficie de los electrodos como oro [177] y níquel [178].

Nanopartículas

El diseño de nuevos materiales a nanoescala ha adquirido una gran importancia en los últimos años debido a su gran variedad de aplicaciones en diversos ámbitos. Entre estos materiales, las nanopartículas metálicas son de gran interés debido a sus importantes propiedades y múltiples aplicaciones.

Enzimas

Las enzimas se han utilizado en la construcción de biosensores porque a pesar de su elevado coste de extracción, aislamiento y purificación, se unen rápidamente y de forma selectiva a los analitos.

Las enzimas son capaces de catalizar reacciones químicas de manera específica; esta especificidad es la clave principal de sus uso en la construcción de biosensores ya que las enzimas presentan una especificidad mucho mayor que la de los catalizadores químicos debido a que solo ciertos sustratos son capaces de acceder a los sitios activos de la enzima.

4.3. Nanomateriales

Las nanotecnologías se han convertido recientemente en uno de los retos más interesantes para muchos investigadores de diversas áreas entre las que se incluye la química analítica. En los últimos años, la elaboración de nuevos materiales a nanoescala está adquiriendo cada vez más importancia debido a su gran número de aplicaciones en diversos campos [179]. El gran interés por los nanomateriales se debe a sus propiedades únicas, y también a la posibilidad de diseñar a medida el tamaño y la estructura de los mismos, lo que ofrece excelentes perspectivas para plantear nuevos sistemas analíticos con mejores posibilidades.

Desde el principio de los años 90 existe un creciente interés en el estudio de la transferencia electrónica entre diversos analitos y electrodos modificados con nanomate-

riales debido a las favorables condiciones que presentan. Específicamente, la combinación entre nanomateriales y biomoléculas es de considerable importancia en los campos de la biotecnología y la química bioanalítica.

La utilización de nanomateriales en sensores y biosensores químicos puede desempeñar diversas funciones que se pueden resumir en las siguientes [180]:

- Inmovilización de biomoléculas: Debido a su gran área y alta energía superficial, los nanomateriales pueden adsorber fuertemente biomoléculas y jugar un importante papel en la inmovilización de éstas para la construcción de biosensores. Existen muchos ejemplos descritos en bibliografía de inmovilización de proteínas [181], enzimas [182], anticuerpos y antígenos [183] y ADN [184] que permiten la construcción de biosensores de gran sensibilidad.
- Catálisis de reacciones electroquímicas: Este hecho ha permitido la detección de sustancias como azúcares, aminoácidos, y especies de interés farmacológico o medioambiental en concentraciones muy bajas de forma rápida y selectiva [185, 186, 187].
- Aumento de la transferencia electrónica: Este aspecto es especialmente relevante en los biosensores enzimáticos de tercera generación. El aumento de la transferencia electrónica se pone de manifiesto en que la velocidad de transferencia electrónica puede aumentar 7 veces [188].
- Marcado de biomoléculas: Las biomoléculas marcadas con nanopartículas metálicas pueden retener su bioactividad e interactuar de la misma forma que si no estuvieran marcadas. La posterior detección electroquímica de estas nanopartículas de metal facilita la determinación de las biomoléculas [189]. Esta propiedad ha sido muy utilizada en la construcción de biosensores de ADN [190].

- Reactividad: Los nanomateriales presentan una actividad mucho mayor que los correspondientes materiales, lo que se aprovecha para aumentar las posibilidades de muchos biosensores [191].

La incorporación de nanomateriales en los sensores electroquímicos se presenta como una vía importante para abrir expectativas en la sensibilidad y selectividad de estos dispositivos. Diversas nanoestructuras, uni, bi y tridimensionales, han sido investigadas para determinar sus propiedades y posibles aplicaciones en biosensores. Estas estructuras incluyen películas, nanotubos, nanofibras, nanobarras y nanopartículas. De todas ellas, las nanopartículas metálicas han sido de las más estudiadas.

4.3.1. Nanopartículas metálicas y nanotubos

La investigación sobre la síntesis y propiedades de nanopartículas de metales y de semiconductores metálicos ha dado lugar a numerosas publicaciones [192]. Diferentes clases de nanopartículas, incluso la misma clase en ocasiones, pueden jugar papeles diversos en elementos sensitivos tales como sensores enzimáticos, inmunosensores y sensores de ADN [193, 194]. Generalmente las nanopartículas de plata tienen excelente conductividad y propiedades catalíticas, lo que las hace adecuadas para actuar como soportes electrónicos, aumentando la transferencia electrónica entre centros redox en proteínas y en superficies electródicas, y como catalizadores, incrementando la velocidad de las reacciones electroquímicas.

La posibilidad de obtener electrodos modificados con nanopartículas de distintos metales ha sido objeto de atención en los últimos años. Las nanopartículas de oro, plata, paladio y platino se han convertido en las más utilizadas para la modificación de electrodos debido a su facilidad de obtención, estabilidad y amplio rango de aplicaciones. Nanopartículas de otros metales como níquel, cobre y hierro son más difíciles de obtener y utilizar debido a su relativa facilidad para oxidarse tanto en el aire como en solución. Sin embargo, se han desarrollado agentes protectores y estabilizantes que permiten su utilización [195, 196].

En la bibliografía aparecen numerosos métodos que describen la síntesis de nanopartículas metálicas en disolución, así como la depositación sobre superficies sólidas. Estos incluyen síntesis química por medio de reducción con diferentes reactivos [197], la luz ultravioleta o la irradiación de haz de electrones [198] y métodos electroquímicos [199]. Estos últimos proporcionan alternativas fáciles y rápidas para la preparación de electrodos de nanopartículas metálicas. La combinación de la electrodeposición y los procesos de impresión está empezando a proporcionar una producción de sensores electroquímicos que poseen actividad catalítica. Los sensores fabricados por este proceso presentan límites de detección más sensibles respecto a los electrodos sin modificar.

La incorporación de nanopartículas de Au y Pt SPCE se aplica a la determinación de H_2O_2 [200]. El poli(L-lactato) estabiliza las nanopartículas de oro cuando se utiliza para modificar los electrodos SPCE para la detección de As(III) por DPASV. La sensibilidad es tan buena que detecta As(III) a nivel de $\mu\text{g/L}$ y proporciona un método directo y selectivo para determinar As(III) en aguas naturales [201].

También se han preparado electrodos de pasta de carbono modificados, introduciendo metales coloidales en la pasta [202]. Recientemente se ha descrito la modificación de electrodos serigrafados con nanopartículas metálicas [203, 204] siendo esta opción de gran interés debido a múltiples aplicaciones de este tipo de electrodos.

Este tipo de partículas ha encontrado aplicación en muchas formas de seguimiento de esquemas biológicos [205]. Numerosas revisiones bibliográficas ponen de manifiesto la utilidad de los sensores electroquímicos modificados con nanopartículas metálicas para el análisis de biomoléculas, elementos contaminantes etc. [191, 206, 207, 208, 209, 210, 211].

También nanoestructuras tridimensionales como los nanotubos de carbono (CNTs), son particularmente atractivas en la detección bioelectrónica. Debido a su alta relación superficie/volumen, su conductividad electrónica está influenciada por pequeñas perturbaciones en la superficie, como las asociadas al enlace o interacción con macromoléculas. Además, son capaces de empaquetar un amplio número de elementos

sensitivos en serie en una superficie reducida. Los nanotubos de carbono han generado un considerable interés, debido a sus singulares propiedades mecánicas y a la única estructura electrónica del sistema π deslocalizado, accesible electroquímicamente [212]. Los nanotubos de carbono pueden ser de una sola pared [SWCNT] o multipared [MWCNT].

Los nanotubos de una sola pared poseen una nanoestructura cíclica formada por el enrollamiento de una sola lámina de grafito sobre un tubo. Los de multipared comprenden una serie de nanotubos de una sola pared que se sitúan concéntricamente como anillos en el tronco de un árbol.

Los trabajos existentes sobre el estudio de electrodos serigrafiados modificados con nanopartículas metálicas y otros materiales han abierto grandes expectativas en este campo [213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222].

4.3.2. Electroodos enzimáticos y nanomateriales

Los electrodos enzimáticos han sido ampliamente usados para el seguimiento de un gran número de sustratos de interés clínico, agroalimentario y medioambiental. El uso combinado de nanopartículas y enzimas ofrece una amplia oportunidad de reconocimiento molecular [223].

La necesidad de poner a punto sensores específicos que permitan llevar a cabo análisis selectivos de distintas sustancias orgánicas como aditivos, fármacos, drogas, y otras sustancias de interés biológico, etc. en muestras complejas ha dado lugar en los últimos años al desarrollo de distintos sensores electroquímicos entre los que destacan los biosensores con transductores electroquímicos. Los elementos biológicos más utilizados en la construcción de los biosensores son las enzimas [223, 224, 225, 226, 227, 228].

Efectivamente fue demostrado por primera vez en 1962 que una enzima podía ser integrada en un electrodo para formar un biosensor, y desde entonces el desarrollo de estos dispositivos ha hecho considerables progresos [229, 230]. Las ventajas asocia-

das con estos mecanismos son su alta selectividad, la simplicidad de uso, así como la posibilidad de desarrollar sistemas de análisis compactos y portátiles.

Sin embargo, la inmovilización de biomoléculas en microelectrodos, suele implicar la disminución de sus propiedades de reconocimiento biológico, y es éste el problema más importante que se presenta en el desarrollo de estos dispositivos miniaturizados. En la búsqueda de soluciones a este problema, la inmovilización de biomoléculas en películas electropolimerizadas está incrementando su importancia [231, 232, 233, 234]. Efectivamente, la formación de capas de polímeros de espesor controlado electroquímicamente, es una alternativa no manual y posee una mayor reproducibilidad en la respuesta del biosensor resultante. Este procedimiento, que ha recibido una importante consideración debido al incremento de la demanda de biosensores miniaturizados [235, 236, 237] implica el atrapamiento de biomoléculas en polímeros orgánicos durante su electrogeneración en la superficie electródica. La formación del polímero se lleva a cabo por electrólisis, a potencial controlado, de una solución acuosa conteniendo monómeros y biomoléculas.

Frente a métodos que implican la adsorción de monómeros y biomoléculas antes de la etapa de electropolimerización [238], otros métodos, implican inicialmente la electropolimerización de polímeros conductores funcionalizados. En estos casos el enlace de las biomoléculas a las superficies poliméricas se obtiene por injerto químico o por afinidad de la biomolécula al grupo funcional [239, 240, 241, 242]. Comparado con el atrapamiento físico de las enzimas en películas de polímeros tales como polipirrol, politiofeno, poliacetileno o polianilina, este método preserva mejor el acceso del sustrato a la biomolécula inmovilizada, facilitando las interacciones intramoleculares. Sin embargo, la cantidad de biomoléculas inmovilizadas se restringe en este caso a una monocapa en la interfase polímero-disolución.

Se ha realizado una interesante revisión de los polímeros conductores más frecuentemente utilizados en la construcción de biosensores [243]. Uno de los polímeros más empleado es el polipirrol (PPy), por lo que aparecen descritos en la bibliografía diversos métodos para la formación electroquímica del mismo [244, 245, 246, 247, 248, 249, 250].

4.4. Técnicas de inmovilización enzimática

Una etapa clave en la construcción de un biosensor es la inmovilización del elemento de reconocimiento sobre la superficie del transductor, este puede actuar como un soporte o bien participar en la señal de transducción, como cuando se incluyen mediadores de redox.

Las técnicas más usadas para la inmovilización son la adsorción física, la encapsulación, el atrapamiento, el entrecruzamiento y la formación de enlace covalente. La selección del procedimiento depende de la naturaleza de la enzima, el tipo de transductor, las propiedades fisicoquímicas del analito y las condiciones de trabajo del biosensor.

En general los métodos de inmovilización pueden clasificarse en dos grupos que son la adsorción física y la inmovilización química.

La adsorción física se logra por simple deposición, atrapamiento o inclusión del elemento biológico en una superficie o en una matriz de gel, en tanto que en la inmovilización química se consigue por entrecruzamiento en una matriz polimérica o la formación de un enlace covalente entre la enzima y un reactivo que a su vez se encuentra retenido sobre la superficie.

La inmovilización de la enzima es el proceso, por el cual se localiza la enzima en una región del espacio para originar formas insolubles que retienen su actividad biológica y pueden reutilizarse. Es el proceso más importante en la construcción de un biosensor, debido a que la enzima debe retener su actividad catalítica y con ella la sensibilidad, durante el tiempo de vida de la aplicación propuesta. Como ventaja de la inmovilización se obtiene una mayor estabilidad.

Sin embargo la inmovilización presenta algunas desventajas debido a que ocurre una pérdida de la actividad enzimática durante el proceso de inmovilización, se presenta un cambio en la configuración inicial de la enzima, además el procedimiento de inmovilización puede cambiar los parámetros aparentes de la reacción catalizada por la enzima, comparados con su comportamiento en una disolución homogénea. Es un

sistema heterogéneo debido a que se presentan diferentes tipos de unión enzima-superficie.

Se presentan los métodos de inmovilización más comunes en la Figura 4.4.

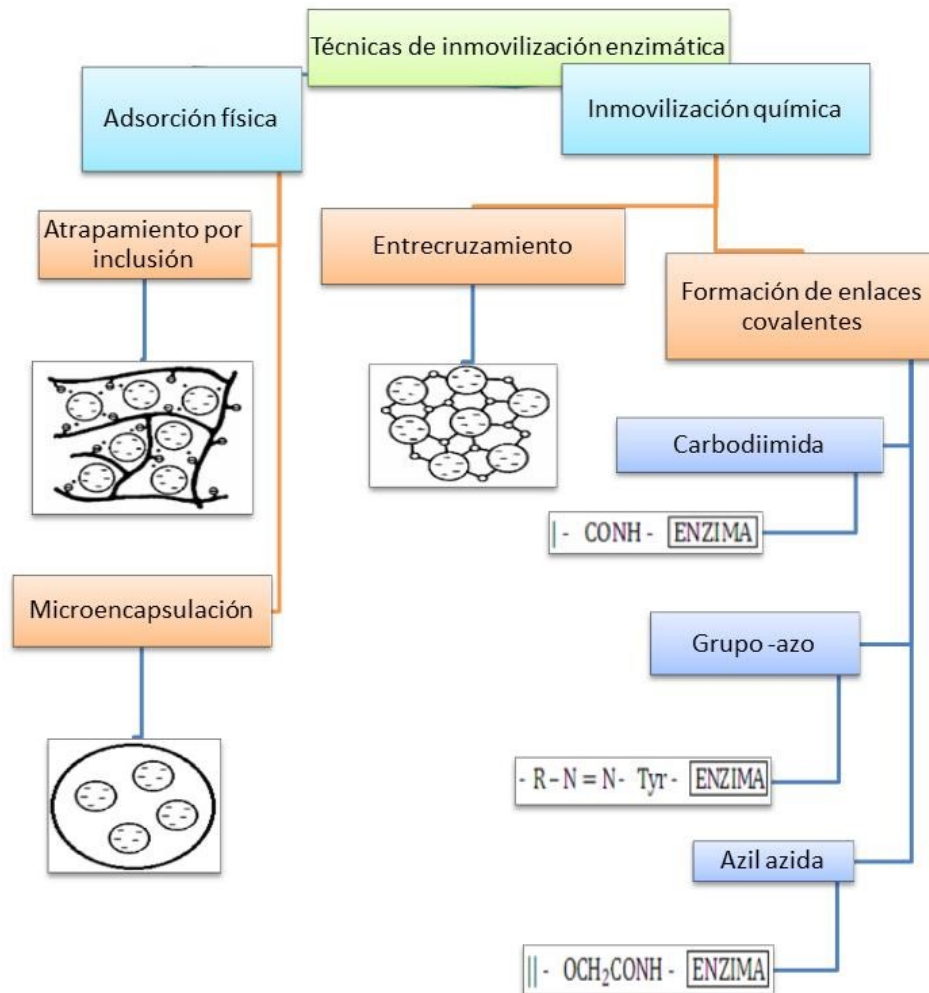


Figura 4.4. Técnicas para lograr la inmovilización enzimática.

4.4.1. Adsorción física

En la adsorción, la enzima se une a un soporte sin funcionalizar mediante puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones iónicas, hidrofóbicas y atracción electrostática. Es el método más simple y menos desnaturalizante y se realiza por medio de la colocación de la enzima sobre el electrodo serigrafiado [251, 252, 253].

Los principales factores que controlan la adsorción son:

El diámetro de poro que debe ser cercano al doble del tamaño del eje mayor de la enzima.

El pH del medio debido a que controla la cantidad y naturaleza de las cargas sobre la enzima y la superficie.

La fuerza iónica ya que al aumentar la fuerza iónica se produce la desorción, debido a que los iones compiten con los sitios de adsorción de la enzima.

La presencia de iones que actúen como cofactores de la enzima, ya que estos pueden aumentar la fuerza iónica.

Como ventajas de este tipo de inmovilización pueden mencionarse:

- Preparación sencilla, bajo coste.
- Se puede usar en condiciones muy suaves.
- Causa poco o ningún cambio en la conformación de la enzima y no modifica su centro activo.
- Estabilidad de las uniones con bajo contenido acuoso.

Como desventajas de este método o de inmovilización pueden mencionarse:

- Se deben optimizar las variables de adsorción.
- La unión a la superficie es poco estable desde el punto de vista mecánico.
- La unión al soporte es débil y los cambios de pH, temperatura o la presencia del sustrato en la disolución la afectan.

Esta técnica es la menos empleada para fijar enzimas sobre los biosensores.

Dentro de la técnica de adsorción se pueden emplear resinas de intercambio iónico con grupos funcionales y contraiones que pueden intercambiarse con iones de la disolución, mejorando la estabilidad de la enzima sobre la superficie electródica.

4.4.2. Atrapamiento con inclusión

La enzima queda retenida por inclusión física dentro de los intersticios de una matriz porosa, en el interior de un polímero que puede fotopolimerizar [254] o polímeros

como colágeno, alginato, carragenina o resinas de poliuretano. El proceso de inmovilización se lleva a cabo colocando una disolución de la enzima en una disolución del monómero, o bien, la enzima y mediadores, aditivos y monómero se mezclan y depositan sobre el electrodo. La polimerización se logra con un cambio de temperatura, irradiación con luz UV, de neón, o adición de un reactivo químico que inicie el proceso [255, 256]. Es un procedimiento sencillo, que requiere poca cantidad de enzima, esta no sufre cambios estructurales. Por otro lado las condiciones del proceso de polimerización deben ser establecidas, verificándose que el proceso no altere la actividad enzimática.

4.4.3. Microencapsulación

Esta técnica consiste en rodear las moléculas de enzima con membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de la enzima. Las membranas pueden ser obtenidas con surfactantes, denominadas micelas reversas o por medio de la polimerización interfacial. En este caso se originan partículas esféricas de diámetro menor a 100 μm .

Se pueden microencapsular diversas enzimas, biomoléculas, células de tejidos, para lograr reacciones secuenciales. Por otro lado se necesitan elevadas concentraciones de enzima en disolución para aplicar esta técnica.

4.5. Inmovilización química

Son los métodos más utilizados y de los que existe mayor información. Con ella se logra aumentar la estabilidad enzimática, disminuir de la inhibición, minimizar la contaminación por bacterias y mejorar el intervalo de pH en el que la enzima tiene una actividad óptima. Sin embargo, de la elección del soporte y del método de inmovilización depende la posterior actividad enzimática.

El soporte elegido debe poseer resistencia mecánica y química y ser fácilmente separable del medio líquido para poder ser utilizado de nuevo.

Los soportes pueden clasificarse en orgánicos, inorgánicos. A su vez, los soportes orgánicos pueden ser:

Polímeros naturales o polisacáridos como celulosa, almidón, dextranos, agar, quitina, quitosano, también proteínas fibrosas como colágeno o queratina.

Polímeros sintéticos pueden ser acrílicos como poli y metacrilatos o poliacril amida, poliolefinas como poliestireno u de otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas, vidrio poroso).

Por su parte los soportes inorgánicos pueden ser:

Naturales como arcillas (silicatos, bentonita).

Manufacturados como vidrio poroso, silica gel, óxidos metálicos.

Las enzimas se pueden unir a estos soportes por adsorción física, como se dijo antes o enlace covalente.

4.5.1. Enlace covalente

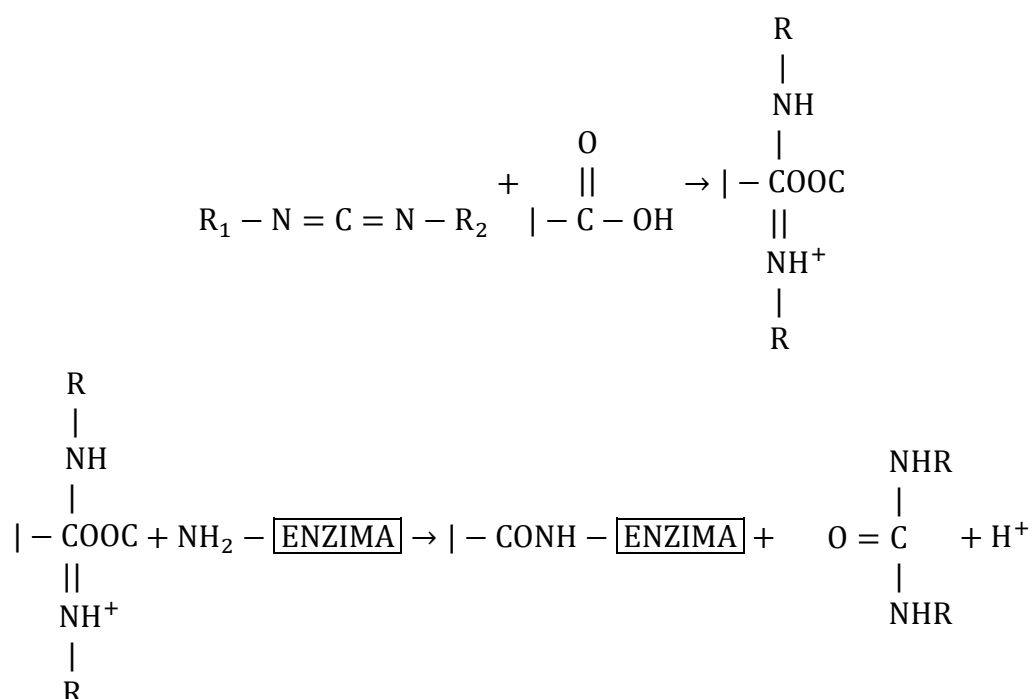
Este método de inmovilización entre el transductor y enzima, está basado en la activación de los grupos del soporte para que reaccionen con los grupos nucleofílicos de las proteínas. La inmovilización covalente puede modificar la configuración de la enzima conduciendo a una mejor actividad y mayor estabilidad [257]. De los aminoácidos presentes en las proteínas los que participan en la unión covalente son lisina, histidina, arginina y cisteína y en menor grado la metionina, arginina, triptófano y los ácidos aspártico y glutámico. Los otros aminoácidos por su carácter hidrófobo no están expuestos en la superficie de la proteína y no pueden formar uniones covalentes.

Se debe controlar el pH y la fuerza iónica de la disolución, pero se consiguen uniones muy estables que mantienen la actividad enzimática. Como ventaja, elimina la difusión, inestabilidad y agregación que puede ocurrir en el atrapamiento o en las técnicas de adsorción. El desempeño de la enzima con diversos métodos de inmovilización ha demostrado que el enlace covalente es más sensible [258].

Dentro de ellos se encuentran:

Método de la carbodiimida para unión a grupos ácidos del soporte.

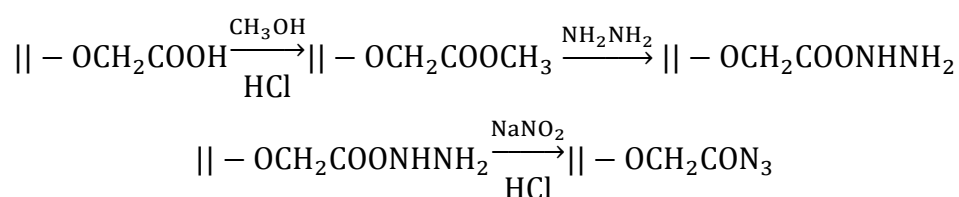
La enzima reacciona con carbodiimida para producir un derivado acilisourea que reacciona con la enzima. Los aminoácidos de la enzima que reaccionan preferentemente son lisina, tirosina, cisteína, serina y metionina. La adición de un derivado de N-hidrosuccinimida durante la etapa de formación del soporte, mejora la selectividad, debido a la formación del ester de N-hidrosuccinimida que forma un enlace amida con los residuos de lisina.



Método de la unión acil-azida para unión a grupos ácidos del soporte.

Se lleva a cabo en dos pasos

1. Activación del soporte para obtener un grupo acil-azida.

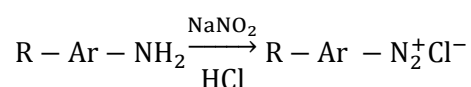


2. Ataque nucleofílico a la acil-azida para producir un enlace amida. En este caso son más reactivos los aminoácidos con aminas primarias.

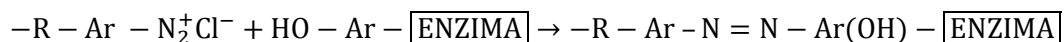


Unión por la formación de un grupo azo.

1. Se genera un grupo azo sobre el soporte.



2. Se une posteriormente a la enzima a través de un residuo de tirosina y se evita el entrecruzamiento de enzimas.



4.5.2. Entrecruzamiento

Se produce debido a que se generan enlaces covalentes entre moléculas de enzima (intermoleculares) y entre estas y el soporte [259]. Se obtienen altas cantidades de enzima inmovilizada. La técnica del entrecruzamiento hace a la enzima muy resistente a los cambios de pH y temperatura. Las redes que se forman impiden el acceso del sustrato al centro activo de la enzima, por lo que se puede producir una disminución de la actividad enzimática [260]. Se usan reactivos bifuncionales entre ellos glutaraldehído, diazobencina, hexametileno-bis(iodoacetamida), bis(N-hidroxisuccinimidil) ditiopropionato [261]. Otra forma de inmovilizar es la enzima es por la unión covalente de grupos amino con metacrilatos [262].

El entrecruzamiento con glutaraldehído es un método muy simple y rápido [263]. Es conveniente para evitar la pérdida de la actividad enzimática, emplear una proteína

extra como la albúmina de suero bovino (BSA) que es rica en lisina, para producir el entrecruzamiento entre el BSA y la enzima y evitando cruces enzima-enzima .

4.6. Referencias

1. T. Kelly, G. Matos, Historical Statistics for Mineral and Material Commodities in the United States. U.S. Geological Survey Data Series 140, (2014). Disponible en: minerals.usgs.gov/minerals/pubs/historical-statistics/
2. W. Sleppy, Aluminum Compounds. In: Howe–Grant M, (Ed). Kirk Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Wiley-Interscience Publication, New York, (1992) 252–267.
3. J.A.T. Pennington, Aluminum contents of foods and diets. *Food Addit. Contam.*, 5 (1987) 161–232.
4. J.R. Sorenson, J.R. Campbell, L.B. Tepper, R.D. Lingg, Aluminum in the environment and human health. *Environ. Health Persp.*, 8 (1974) 3–95.
5. J. Harte, Ch. Holdren, R. Scheneider, Sh. Cristine, TOXICS A TO Z. A GUIDE TO EVERY DAY POLLUTION HAZARDS. University of California Press, Berkeley, (1991) 210–213.
6. M. Manuel-Vez, C. Moreno, D. Gonzalez, M. Garcia-Vargas, Direct fluorimetric determination of dissolved aluminum in sea water at nanomolar levels. *Anal. Chim. Acta*, 355 (1997) 157–161.
7. B.D. Lazerte, G. Van Loon, B. Anderson, Aluminum in water. In: Yokel Ra, Golub MS (Eds), Research issues in aluminum toxicity. Taylor and Francis, Washington DC, (1997) 17–45.
8. K.C. Jones, B.G. Bennett, Exposure of man to environmental aluminum-an exposure commitment assessment. *Science Total Environ.*, 52 (1986) 65–82.
9. C.W. Spicer, B.E. Buxton, M.W. Holdren, D.L. Smith, T.J. Kelly, S.W. Rust, A.D. Pate, G.M. Sverdrup, J.C. Chuang, Variability of hazardous air pollutants in urban area. *Atmos. Environ.*, 30 (1996) 3443–3456.
10. Health Effects Assessment for aluminum. Environmental Protection Agency, EPA/600/8-88-016. Springfield, VA: National Technical Information Service U.S. Department of Commerce (1987).

11. J.L. Lin, Y.J. Yang, S.S. Yang, M.L. Leu, Aluminum utensils contribute to aluminum accumulation in patients with renal failure. *Am. J. Kidney Dis.*, 30 (1997) 653–658.
12. A. Sepe, S. Constantini, I. Ciarelli, I. Ciprotti, R. Giordano, Evaluation of aluminum concentrations in samples of chocolate and beverages by electrothermal absorption spectrometry. *Food Addit. Contam.*, 18 (2001) 788–796.
13. T.P. Flatten, Aluminum in tea-concentration, speciation and bioavailability. *Coordin. Chem. Rev.*, 228 (2002) 385–395.
14. M. Müller, M. Anke, H. Hilling-Gunther, Aluminum in foodstuffs. *Food Chem.*, 61 (1998) 419–428.
15. J.R. Fernandez-Lorenzo, J.A. Cocho, M.L. Rey Goldar, M. Couce, M. Fraga, Aluminum contents of human milk, cow milk and infants formula. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 28 (1999) 270–275.
16. S. Jansen, M.R. Broadley, E. Robbecht, E. Smets. Aluminum hyperaccumulation in angiosperms: A review of its phylogenetic significance. *Bot. Rev.*, 68 (2002) 235–269.
17. D. Sparling, T. Lowe, Environmental hazards of aluminum to invertebrates, fish and wildlife. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 145 (1996) 1-127.
18. H. Klöpper, A. Fließner, W. Kordel, Behavior and ecotoxicology of aluminum in soil and water - Review of scientific literature. *Chemosphere*, 35 (1997) 353–363.
19. B. Fairman, A. Sanz Medel, Determination of aluminum species in natural waters. *Tech. Inst. Anal. Chem.*, 17 (1995) 215–233.
20. R. Gensemer, R. Playle, The bioavailability and toxicity of aluminum in aquatic environments. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 29 (1999) 315–450.
21. T.B. Polak, R. Milaci, B. Pihlar, V. Mitrovic, The uptake and speciation of various Al species in the *Brassica rapapekinensis*. *Phytochemistry*, 57 (2001) 198–198.
22. L.V. Kochian, J.L. Jones, Aluminum toxicity and resistance in plants. In: Yonkel RA and Golub MS, (Eds), Research issues in aluminum toxicity, Taylor and Francis, Washington DC, (1997) 66–89.

23. T. Mozor- Pietraszewska, Effect of aluminum in plant growth and metabolism. *Acta Biochem. Pol.*, 48 (2001) 673–686.
24. M.J. Hodson, A.G. Sangster, Aluminum/silicon interactions in conifers. *J. Inorg. Biochem.*, 76 (1999) 89–98.
25. J.C. Lima, R.A. Arenhart, M. Margis-Pinheiro, R. Margis, Aluminum triggers broad changes in microRNA expression in rice roots. *Genet. Mol. Res.*, 10 (2011) 2817–2832.
26. J.F. Ma, P.R. Ryan, E. Delhaize, Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.*, 6 (2001) 273–278.
27. H. Gielen, T. Remans, J. Vangronsveld, A. Cuypers, MicroRNAs in Metal Stress: Specific Roles or Secondary Responses? *Int. J. Mol. Sci.*, 13 (2012) 15826–15847.
28. M.S. Golub, B. Han, C.L. Kleen, Iron and manganese uptake by offspring of lactating mice feed a high aluminum diet. *Toxicology*, 109 (1996) 111–118.
29. J. Han, M.A. Dunn, Effect of dietary aluminum on tissue non heme and ferritin levels in the chick. *Toxicology*, 142 (2000) 97–109.
30. E. Nieboer, J.L. Gibson, A.D. Oxman, J.R. Kramer, Health effects of Aluminum: a critical review with emphasis on aluminum in drinking water. *Environ. Rev.*, 3 (1995) 29–81.
31. R.A. Yokel, P. McNamara, Aluminum toxicokinetics: un updated mini-review. *Pharmacol. Toxicol.*, 88 (2001) 159–167.
32. Syracuse Research Corporation. Toxicologic profile for aluminum. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Services, Department of Health and Human Services, USDA (1999).
33. P.J. Metcalf, J.P. Day, F.M. Garstang, K.C. Hodge, P. Ackrill, The determination of aluminum in bone. In: S.S Brown, J. Savory, (Eds), *Chemical Toxicology and Clinical Chemistry of Metals*. Academic Presss, London, (1983) 53–56.
34. R.A. Yokel, The toxicology of aluminum in the brain: a review. *Neurotoxicology*, 21 (2000) 813–828.
35. R. Flarend, T. Bin, D. Elmore, S.L. Hem, A preliminary study of the dermal absorption of aluminum from antiperspirants using aluminum-26. *Food Chem. Toxicol.*, 39 (2001) 163–168.

36. J.P. Day, J. Barker, L.J.A. Evans, J. Perks, P.J. Seabright, P. Ackrill, J.S. Lilley, P.V. Drumm, G.W.A. Newton, Aluminium absorption studied by ^{26}Al tracer. *Lancet*, 337 (1991) 1345–1345.
37. G. Berthon, Chemical speciation studies in relation to aluminum metabolism and toxicity. *Coordin. Chem. Rev.*, 149 (1996) 241–280.
38. D.D. Allen, C. Orving, R.A. Yokel, Evidence for energy-dependent transport of aluminum out of brain extracellular fluid. *Toxicology*, 98 (1995) 31–39.
39. L. Cunat, M.C. Lanhers, M. Joyeux, D. Burnel, Bioavailability and intestinal absorption of aluminum in rats. *Biol. Trace Elem. Res.*, 76 (2000) 31–55.
40. S.L. Hem, Elimination of aluminum adjuvants. *Vaccine*, 20 (2002) 40–43.
41. G. Berthon, Aluminum speciation in relation to aluminum bioavailability, metabolism and toxicity. *Coord. Chem. Rev.*, 228 (2000) 319–341.
42. D.C. Akley, R.A. Yokel, Aluminum citrate is transported from brain into blood via the monocarboxylic acid transporter located at the blood–brain barrier. *Toxicology*, 120 (1997) 89–97.
43. A.J. Roskams, J.R. Connor, Aluminum access to the brain: A role for transferrin and its detector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 (1990) 9024–9027.
44. R.R. Crichton, A. Florence, R.J. Ward, Aluminum and iron in brain, prospects for chelation. *Coordin. Chem. Rev.*, 228 (2002) 365–371.
45. A. Alzheimer, Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Z. Gesamte Neurol. Psy.*, 4 (1911) 356–385.
46. G.A. Taylor, I.N. Ferrier, M. McLoughlin, A.F. Fairbairn, A.G. McKeith, D. Lett, J.A. Edwardson, Gastrointestinal absorption of aluminum in Alzheimer's disease: response to aluminum citrate. *Age Ageing*, 21 (1992) 81–90.
47. A. Szutowicz, Aluminum neurotoxicity. In: E.J. Massaro, Handbook of Neurotoxicology. Humana Press Inc., Totowa, NJ, (2002) 211–236.
48. P. Zatta, T. Kiss, M. Suvalsky, G. Berthon, Aluminum(III) as a promoter of cellular oxidation. *Coordin. Chem. Rev.*, 228 (2002) 271–284.
49. S. Toda, Y. Yase, Effect of aluminum on iron-induced lipid peroxidation and protein oxidative modification of mouse brain homogenate. *Biol. Trace Elem. Res.*, 61 (1998) 207–216.

50. R. Schliebs, T. Arendt, The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav. Brain Res.*, 221 (2011) 555–563.
51. M. Clauberg, J.G. Joshi, Regulation of serine protease activity by aluminum: Implications for Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 (1993) 1009–1012.
52. M. Angeletti, G. Lupidi, A.M. Eleuteri, R. Tacconi, E. Fioretti, M. Coletta, Effect of aluminum on the binding properties of α -chymotrypsin. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2 (1997) 320–326.
53. P.F. Zatta, Aluminum Binds to the Hyperphosphorylated Tau in Alzheimer's Disease. A Hypothesis. *Med. Hypotheses*, 44 (1995) 169–172.
54. M. Abdel-Ghany, A.K. El-Sebae, D. Halloway, Aluminum-induced non enzymatic phospho-incorporation into human tau and other proteins. *J. Biol. Chem.*, 268 (1993) 11976–11981.
55. C.R. Harrington, C.M. Wischik, F.K. McArthur, G.A. Taylor, J.A. Edvardson, J.M. Candy, Alzheimer's-disease like changes in tau protein processing: association with aluminium accumulation in brains of renal dialysis patients. *Lancet*, 343 (1994) 993–997.
56. C.W. Scott, A. Fieles, L.A. Sygowski, C.B. Caputo, Aggregation of tau protein by aluminum. *Brain Res.*, 628 (1993) 77–84.
57. A. Bilkei-Gorzo, Neurotoxic effect of enteral aluminium. *Food Chem. Toxicol.*, 31 (1993) 357–361.
58. H. Meiri, E. Banin, M. Roll, A. Rousseau, Toxic effects of aluminum on nerve cells and synaptic transmission. *Neurobiol.*, 40 (1993) 89–121.
59. P. Zatta, C. Bordin, M. Favarato, The inhibition of trypsin and α -chymotrypsin proteolytic activity by Aluminum(III). *Arch. Biochem. Biophys.*, 303 (1993) 407–411.
60. K.P. Kepp, Bioinorganic Chemistry of Alzheimer Disease. *Chem. Rev.*, 112 (2012) 5193–5239.
61. S.R. Paik, J.H. Lee; D.H. Kim, Ch.S. Chang, J. Kim, Aluminum-Induced Structural Alterations of the Precursor of the Non- $\alpha\beta$ Component of Alzheimer's Disease Amyloid. *Arch. Biochem. Biophys.*, 344 (1997) 325–334.

62. R.W. Shin, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, Aluminum modifies the properties of Alzheimer's disease PHF tau proteins in vivo and in vitro. *J. Neurosci.*, 14 (1994) 7221–7233.
63. V. Di Noto, L. Dalla Via, P. Zatta, Review of binding methods and detection of Al(III) binding events in trypsin and DL-DPPC liposomes by a general thermodynamic model. *Coordin. Chem. Rev.*, 228 (2002) 343–363.
64. P. Zatta, M. Suwalsky, Aluminium, membranes and Alzheimer's disease. In: C. Exley (Ed.), *Aluminium and Alzheimer's disease. The Science that Describes the Link*. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, (2001) 279-291.
65. S.G. Cohen, L.W. Lo, On the Active Site of α -Chymotrypsin. Cyclized and noncyclized substrates with tetra substituted α carbon atoms. *J. Biol. Chem.*, 245 (1970) 5718–5727.
66. D.M. Walsh, B.P. Tseng, R.E. Rydel, M.B. Podlisny, D.J. Selkoe, The oligomerization of amyloid β protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry*, 39 (2000) 10831–10839.
67. F. Ricchelli, D. Drago, B. Filippi, G. Tognon, P. Zatta, Aluminum-triggered structural modifications and aggregation of β -amyloids., *Cel . Mol. Life Sci.*, 62 (2005) 1724–1733.
68. W.A. Banks, M.L. Niehoff, D. Drago, P. Zatta, Aluminum complexing enhances amyloid β protein penetration of blood–brain barrier. *Brain Res*, 1116 (2006) 215–221.
69. T. Sakamoto, H. Saito, K. Ishii, H. Takahashi, S. Tanabe, Y. Ogasawara, Aluminum inhibits proteolytic degradation of amyloid β peptide by cathepsin D: A potential link between aluminum accumulation and neuritic plaque deposition *FEBS Letters*, 580 (2006) 6543–6549.
70. G. Falkous, J.B. Harris, D. Mantle, Effect of neurotoxic metal ions in vitro on proteolytic enzyme activities in human cerebral cortex. *Clin.Chim. Acta*, 238 (1995) 125–135.
71. J.G. Joshi, M. Dhar, M. Clauberg, V. Chauthaiwalen, Iron and Aluminum homeostasis in neurals disorders. *Environ. Health Persp.*, 102 (1994) 207–211.
72. L.M. Aurand, A. E. Woods, M.R. Wells, Van Nostrand Reinhold Company, New York, (1987) 310–311.

73. W. Li, K.Y. Ma, W. Sun, H.K. Paude, Phosphorylation Sensitizes Microtubule-Associated Protein τ to Al^{3+} -Induced Aggregation. *Neurochem. Res.*, 23 (1998) 1467–1476.
74. B. Bader, G. Nübling, A. Mehle, S. Nobile, S.H. Kretzschmar, A. Giese, Single particle analysis of tau oligomer formation induced by metal ions and organic solvents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 411 (2011) 190–196.
75. J.R. Walton, Brain lesions comprised of aluminum-rich cells that lack microtubules maybe associated with the cognitive deficit of Alzheimer's disease. *Neurotoxicology*, 30 (2009) 1059–1069.
76. M.A. Lovell, J.D. Robertson, W.J. Teesdale, J.L. Campbell, W.R. Markesbery, Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J. Neurol. Sci.*, 158 (1998) 47–52.
77. J. Fleming, J.C. Joshi, Ferritin: the role of aluminum in ferritin function. *Neurobiol. Aging*, 12 (1991) 413–418.
78. Z. Xiao, A. Wedd, The challenges of determining metal-protein affinities. *Nat. Prod. Rep.*, 27 (2010) 768–789.
79. L.L. Rulon, J.D. Robertson, M.A. Lovell, M.A. Deibel, W.D. Ehmann, W.R. Markesbery, Serum zinc levels and Alzheimer's disease. *Biol. Trace Elem. Res.*, 75 (2000) 79–85.
80. F.J. Jimenez-Jimenez, J.A. Molina, M.V. Aguilar, I. Meseguer, C.J. Mateos-Vega, M. J. Gonzalez-Munoz, F. de Bustos, A. Martínez-Salio, M. Ortí-Pareja, M. Zurdo, M. C. Martínez-Para, Cerebrospinal fluid levels of transition metals in patients with Parkinson's disease. *J. Neural Transm.*, 105 (1998) 497–505.
81. M. Schrag, C. Mueller, U. Oyoyo, M.A. Smith, W.M. Kirsch, Iron, zinc and copper in the Alzheimer's disease brain: a quantitative meta-analysis. Some insight on the influence of citation bias on scientific opinion. *Prog. Neurobiol.*, 94 (2011) 296–306.
82. M. Kawahara. Effects of aluminum on the nervous system and its possible link with neurodegenerative diseases. *J. Alzheimer Dis.*, 8 (2005) 171–182.
83. P. Zatta, D. Drago, S. Bolognin, S.L. Sensi, Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. *Trends Pharmacol. Sci.*, 30 (2009) 346–353.

84. M.S. Yang, H.F. Wong, K.L. Yung, Determination of endogenous trace metal contents in various mouse brain after prolonged oral administration of aluminum chloride. *J. Toxicol. Env. Health*, 55 (1998) 445–453.
85. M. Wiedau-Pazos, J. Goto, H. Rabizadeh, E.B. Gralla, J.A. Roe, M.K. Lee, J.S. Valentine, B.D. Bredesen, Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 271 (1996) 515–518.
86. B. Platt, A.J. Drysdale, C. Nday, L.E. Roloff, B.D. Drever, A. Salifoglou, Differential toxicity of novel aluminium compounds in hippocampal culture. *Neurotoxicology*, 28 (2007) 576–586.
87. C.D.R. McLachlan, A.J. Dalton, T.P.A. Kruck, M.Y. Bell, W.L. Smith, W. Kalow, D.F. Andrews, Intramuscular desferrioxamine in patients with Alzheimer's disease. *Lancet*, 337 (1991) 1304–1308.
88. J. P. Day, P. Ackrill, F.M. Garstang, K. C. Hodge, P. J. Metcalfe, Reduction of the body burden of aluminum in renal patients by desferrioxamine chelation therapy. *Clinical Toxicology and Clinical Chemistry of Metals*. Academic Press London, LTD., (1983) 353–360.
89. M.E. Percy, T.P.A. Kruck, A.I. Pogue, W.J. Lukiw, Towards the prevention of potential aluminum toxic effects and an effective treatment for Alzheimer's disease. *J. Inorg. Biochem.* 105 (2011) 1505–1512.
90. T. Finkel, N.J. Holbrook, Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408 (2000) 239–247.
91. G.L. Squadrito, W.A. Pryor, Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radical Biol. Med.*, 25 (1998) 392–403.
92. R. Squitti, D. Lupoi, P. Pasqualetti, G. Dal Forno, F. Vernieri, P. Chiovenda, L. Rossi, M. Cortesi, E. Cassetta, P. Rossini, Elevation of serum copper levels in Alzheimer's disease. *Neurology*, 59 (2002) 1153–1161.
93. M.C. Kiernan, S. Vucic, B.C. Cheah, M.R. Turner, A. Eisen, O. Hardiman, J.R. Burrell, M.C. Zoing, Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, 377 (2011) 942–955.
94. J. Wang, G.L. Xu, V. Gonzales, M. Coonfield, D. Fromholt, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, D.R. Borchelt, Fibrillar inclusions and motor neuron degeneration in

transgenic mice expressing superoxide dismutase 1 with a disrupted copper-binding site. *Neurobiol. Dis.*, 10 (2002) 128–138.

95. K. Jomova, M. Valko, Importance of iron chelation in free radical-induced oxidative stress and human disease. *Curr. Pharm. Desing.*, 17 (2011) 3460–3473.

96. W. Freinbichler, M.A. Colivicchi, C. Stefanini, L. Bianchi, C. Ballini, B. Misini, P. Weinberger, W. Linert, D. Vareslija, K.F. Tipton, L.D. Corte, Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions. *Cell. Mol. Life Sci.*, 68 (2011) 2067–2079.

97. S. Bolognin, P. Zatta, E. Lorenzetto, M.T. Valenti, M. Buffelli, β -Amyloid-aluminum complex alters cytoskeletal stability and increases ROS production in cortical neurons *Neurochem. Int.*, 62 (2013) 566–574.

98. A. Campbell, S.C. Bondy, Aluminum induced oxidative events and its relation to inflammation: a role for the metal in Alzheimer's disease. *Cel. Mol. Biol.*, 46 (2000) 721–730.

99. F. Ruipérez, J.I. Mujika, J.M. Ugalde, C. Exley, X. Lopez, Pro-oxidant activity of aluminum: Promoting the Fenton reaction by reducing Fe(III) to Fe(II). *J. Inorg. Biochem.*, 117 (2012) 118–123.

100. S.C. Bondy, S. Kirstein, The promotion of iron-induced generation of reactive oxygen species in nerve tissue by aluminum. *Mol. Chem. Neuropathol.*, 27 (1996) 185–194.

101. Z.Wu, Y. Du, H. Xue, Y.Wu, B. Zhou, Aluminum induces neurodegeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production. *Neurobiol. Aging*, 33 (2012) 199.e1–199.e12.

102. C. Exley, Review. The coordination chemistry of aluminium in neurodegenerative disease. *Coordin. Chem. Rev.*, 256 (2012) 2142–2146.

103. R.J. Mailloux, J. Lemire, V. D. Appanna, Hepatic response to aluminum toxicity: Dyslipidemia and liver diseases. *Exp. Cell Res.*, 317 (2011) 2231–2238.

104. J.A. Edwardson, I.N. Ferrier, F.K. McArthur, I.G. McKeith, I. McLaughlin, C.M. Morris, S.A. Mountfort, A.E. Oakley, G.A. Taylor, M.K. Ward, J.M. Candy, Alzheimer's disease and the aluminium hypothesis. *Aluminum in Chemistry Biology and Medicine* (M. Nicolini, P. Zatta, B. Corain, (Eds), Raven Press, New York, (1992) 85–96.

105. D.P. Perl, W.W. Pendlebury, Aluminum (Al) accumulation in neurofibrillary tangle (NFT) bearing neurons of senile dementia Alzheimer's type (SDAT)-Detection by intraneuronal X-ray spectrometry studies of unstained tissue sections. *Proc. Am. Assoc. Neuropathol.*, (1992) 349–359.
106. K. Shigematsu, P.L. McGeer, Accumulation of amyloid precursor protein in damaged neuronal processes and microglia following intracerebral administration of aluminum salts. *Brain Res.*, 593 (1992) 117–123.
107. E. Merian, M. Anke, M. Inhat, M. Stoepler (Eds.), Elements and their Compounds in Environment, Occurrences, Analysis and Biological Relevance. Vol II, (2nd ed.), Wiley-VCH, Weinheim, Germany, (2004).
108. J. Tria, C.V.E. Butler, P.R. Haddad, A.R. Bowie, Determination of aluminium in natural water samples. A review. *Anal. Chim. Acta*, 588 (2007) 153–165.
109. L. Xia, B. Hu, Z. Jiang, Y. Wu, L. Li, R. Chen, 8-Hydroxyquinoline–chloroform single drop microextraction and electrothermal vaporization ICP-MS for the fractionation of aluminium in natural waters and drinks. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 20 (2005) 441–446.
110. T.R. Crompton, Determination of metals in natural and treated waters. Spon Press, London, (2002).
111. J. Staley, W. Haupin, Aluminum and aluminum alloys. In: Howe-Grant M, Ed. Kirk-Otmer Encyclopedia of Chemical Technology. Wiley Interscience Publication, New York, (1992) 184–251.
112. W. Horwitz (Ed.), Official Methods of Analysis of AOAC International. Gaithersburg, MD, (2000).
113. A. Cedergren, W. Frech, Determination of aluminum in biological materials by graphite furnace atomic absorption (GFAAS). *Pure Appl. Chem.*, 59 (1987) 221–228.
114. A.G. Coedo, M.T. Dorado, J. Ruiz, M. Escudero, J.C. Rubio, Evaluation of flow injection analysis sample to standard addition method for the inductively coupled plasma mass spectrometric determination of aluminum in biological tissues. *J. Mass Spectrom.*, 31 (1996) 427–432.

115. W. Slanvin, G. Carnrick, D. Manning, Graphite–tube effects on perchloric acid interferences on aluminum and thallium in the stabilized–temperature platform furnace. *Anal. Chim. Acta.*, 138 (1982) 103–110.
116. M. Barquero, Comparison of analytical methodologies for aluminum determination in hemodialysis fluids. *Portugaliae Electrochimica Acta*, 27 (2009) 69–76.
117. B. Fairman, A. Sanz-Medel, Determination of aluminum species in natural waters. *Tech Inst Anal Chem.*, 17 (1995) 215–233.
118. S. Bi, X. Yang, F. Zhang, X. Wang, G. Zou, Analytical methodologies for aluminum speciation in environmental and biological samples—a review. *Fresen. J. Anal. Chem.*, 370 (2001) 984–996.
119. C. Exley, M.J. Mold, The binding, transport and fate of aluminum in biological cells. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 30 (2015) 90–95.
120. D.B. Lazof, J.G. Goldsmith, T.W. Ruffy, R.W. Linton, Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips (a microanalytical study using secondary ion mass spectrometry). *Plant Physiol.*, 106 (1994) 1107–1114.
121. A. Taylor, R.J. Briggs, C. Cevic, Findings of an external quality assessment scheme for determining aluminum in dialysis fluids and water. *Clin. Chem.*, 40 (1994) 1517–1521.
122. L. Qiong, W. Lirong, X. Danli, L. Guanghan, Determination of trace aluminum in foods by stripping voltammetry. *Food Chem.*, 97 (2006) 176–180.
123. M. Barquero, B.Y. Zhen, Desarrollo y validación de un método adsortivo para la determinación de aluminio en fluidos usados en diálisis renal. *Portugaliae Electrochimica Acta*, 23 (2005) 165–178.
124. L.M. De Carvalho; P.C. do Nascimento, D. Bohrer, R. Stefanello, D. Bertagnolli, Determination of aluminum as contaminant in dialysis concentrates by adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Anal. Chim. Acta*, 546 (2005) 79–84.
125. S.D. Thomas, D.E. Davey, D.E. Mulcahy, C.W.K. Chow, Indirect amperometric detection of aluminum by flow injection analysis using DASA as ligand. *Anal. Lett.*, 38 (2005) 133–147.
126. M. Barquero, Desarrollo y optimización de un método voltamperométrico adsortivo con alizarina para la determinación de aluminio en aguas. *Portugaliae Electrochimica Acta*, 23 (2005) 403–411.

127. J. Di, S. Bi, T. Yang, M. Zhang, Voltammetric determination of aluminum(III) using a reagentless sensor fabricated by sol-gel process. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 99 (2004) 468–473.
128. P. Deng, J. Fei, J. Zhang, Y. Feng, Determination of trace aluminum by anodic adsorptive stripping voltammetry using a multi-walled carbon nanotube modified carbon paste electrode. *Anal. Lett.*, 44 (2011) 1521–1535.
129. X. Wang, J. Lei, S. Bi, N. Gan, Z. Wei, Determination of the speciation of aluminum(III) in natural waters by adsorption stripping voltammetry and complexation with Al^{III}-solochrome violet RS. *Anal. Chim. Acta*, 449 (2001) 35–44.
130. R.A. Romero, J.E. Tahan, A.J. Moronta, Two alternative sample mineralization procedures to permit subsequent polarographic determination of total soluble aluminium in haemodialysis water. *Anal. Chim. Acta*, 257 (1992) 147–154.
131. J. Wang, P.A. Farias, M. Mahmoud, Stripping voltammetry of aluminum based on adsorptive accumulation of its solochrome violet RS complex at the static mercury drop electrode. *Anal. Chim. Acta*, 172 (1985) 57–64.
132. F. Quentel, C. Elleouet, C.L. Madec, Determination of the trace of aluminium (III) in natural fresh water by cathodic redissolution following the adsorption of an aluminium-lumogallion complex. *Analisis*, 25 (1997) 222–225.
133. D.V. Vukomanovic, J.A. Page, G.W. Vanloon, Voltammetric determination of Al(III) with adsorptive preconcentration of the pyrocatechol violet complex. *Can. J. Chem.*, 69 (1991) 1418–1426.
134. M. Cámara-Vargas, O. Domínguez-Renedo, J. Arcos-Martínez, Simultaneous determination of chromium(VI) and aluminum(III) by adsorptive stripping voltammetry with pyrocatechol violet. *Helv. Chim. Acta*, 86 (2003) 2434–2440.
135. A. Komersová, M. Bartoš, K. Kalcher, K. Vytřas, Adsorptive stripping voltammetric determination of aluminium using arsenazo III. *Collect. Czech. Chem. C.*, 66 (2001) 456–464.
136. F. Zhang, M. Ji, Q. Xu, L. Yang, S. Bi, Linear scan voltammetric indirect determination of Al^{III} by the catalytic cathodic response of norepinephrine at the hanging mercury drop electrode. *J. Inorg. Biochem.*, 99 (2005) 1756–1761.

137. V. Arancibia, C. Muñoz, Determination of aluminium in water samples by adsorptive cathodic stripping voltammetry in the presence of pyrogallol red and a quaternary ammonium salt. *Talanta*, 73 (2007) 546–552.
138. X. Yang, L. Li, S. Bi, Electrochemical studies of the inhibition and activation effects of Al(III) on the activity of bovine liver glutamate dehydrogenase. *Sensors*, 5 (2005) 235–244.
139. X. Wang, J. Lei, S. Bi, N. Gan, Z. Wei, Electrochemical and spectrometric studies on the principle of indirect determination of aluminum using L-dopa as an electroactive complexing ligando. *Anal. Chim. Acta*, 449 (2001) 35–44.
140. A. Shahryar, B. Atusa, F. Abbas, Quantification of subnanomolar levels of aluminum by adsorptive stripping voltammetry using rubeanic acid as a selective chelating agent. *Electroanalysis*, 22 (2010) 1889–1893.
141. G.A.M Mersal, H.A Arida, New carbon paste modified micro electrode based on haematoxylin for determination of aluminum in underground water. *Int. J. Electrochem. Sc.*, 6 (2011) 1116–1126.
142. M. Arvand, M. Kermanian, M.A. Zanjanchi, Direct determination of aluminum in foods and pharmaceutical preparations by potentiometry using an AIMCM-41 modified polymeric membrane sensor. *Electrochim. Acta*, 55, (2010) 6946–6952.
143. J.M. Pingarron Carrrazon, P. Sanchez Batanero, Química Electroanalítica. Fundamentos y Aplicaciones. Editorial Síntesis, Madrid, (1999).
144. M. ElKaoutit, I. Naranjo-Rodríguez, K.R. Temsamani, M.P. Hernández-Artiga, D. Bellido-Milla, J.L. Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, A comparison of three amperometric phenoloxidase–Sonogel–Carbon based biosensors for determination of polyphenols in beers. *Food Chem.*, 110 (2008) 1019–1024.
145. J.G. Ruiz, Desarrollo de biosensores enzimáticos miniaturizados para su aplicación en la industria alimentaria. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona: Barcelona (2006).
146. S.V. Dzyadevych, V.N. Arkhypova, A.P. Soldatkin, A.V. El'skaya, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. *ITBM-RBM*, 29 (2008) 171–180.
147. P.E. Erden, E. Kiliç, A review of enzymatic uric acid biosensors based on amperometric detection. *Talanta*, 107 (2013) 312–323.

148. N. Wahono, S. Qin, P. Oomen, T.I.F. Cremers, M.G. de Vries, B.H.C. West-erink, Evaluation of permselective membranes for optimization of intracerebral am-perometric glutamate biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, 33 (2012) 260–266.
149. X. Cui, G. Liu, Y. Lin, Amperometric biosensors based on carbon paste elec-trodes modified with nanostructured mixed-valence manganese oxides and glucose oxidase, *Nanomed.-Nanotechnol.*, 1 (2005) 130–135.
150. E. Lorenzo, F. Pariente, L. Hernandez, F. Tobalina, M. Darder, Q. Wu, M. Maskus, H.D. Abruña, Analytical strategies for amperometric biosensors based on chemically modified electrodes. *Biosens. Bioelectron.*, 13 (1998) 319–332.
151. A. Attar, L. Cubillana-Aguilera, I. Naranjo-Rodríguez, J.L. Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.M. Palacios-Santander, A. Amine, Amperometric inhibition biosen-sors based on horseradish peroxidase and gold sononanoparticles immobilized on to different electrodes for cyanide measurements. *Bioelectrochemistry*, 101 (2015) 84–91.
152. B. Dalkiran, C. Kaçar, P.E. Erden, E. Kiliç, Amperometric xanthine biosen-sors based on chitosan-Co₃O₄-multiwall carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 200 (2014) 83–91.
153. Y. Gong, X. Chen, Y. Lu, W. Yang, Self-assembled dipeptide–gold nanoparti-cle hybrid spheres for highly sensitive amperometric hydrogen peroxide biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, 66 (2015) 392–398.
154. Y. Cui, J.P. Barford, R. Renneberg, Amperometric trienzyme ATP biosensors based on the coimmobilization of salicylatehydroxylase, glucose-6-phosphate dehy-drogenase, and hexokinase. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 132 (2008) 1–4.
155. S.R. Pérez, Aplicación de biosensores amperométricos de polisulfo-na/nanotubos de carbono en el análisis de muestras reales. Tesis Doctoral. Universi-dad Autónoma de Barcelona: Barcelona (2012).
156. G. Roman, A.C. Pappas, D. Kovala-Demertzi, M.I. Prodromidis, Preparation of a 2-(4-fluorophenyl)indole-modified xerogel and its use for the fabrication of screen-printed electrodes for the electrocatalytic determination of sulfide. *Anal.Chim. Acta*, 523 (2004) 201–207.

157. L. Micheli, A. Radoi, R. Guarrina, R. Massaud, C. Bala, D. Moscone, G. Palleschi, Disposable immunosensor for the determination of domoic acid in shellfish. *Biosens. Bioelectron.*, 20 (2004) 190–196.
158. S. Myler, F. Davis, S D. Collyer, S.P.J. Higson, Sonochemically fabricated microelectrode arrays for biosensors–Part II. Modification with a Polysiloxane Coating—a short communication. *Biosens. Bioelectron.*, 20 (2004) 408–412.
159. G.S. Nunes, G. Jeanty, J.L. Marty, Enzyme immobilisation procedures on screen- printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides. Comparative study. *Anal. Chim. Acta*, 523 (2004) 107–115.
160. A. Lupu, D. Compagnone, G. Palleschi, Screen printed enzyme electrodes for the detection of marker analytes during wine making. *Anal. Chim. Acta*, 513 (2004) 67–72.
161. B.B. Rodriguez, J.A. Bolbot, I.E. Tohill, Development of urease and glutamic dehydrogenase amperometric assay for heavy metal screening in polluted samples. *Biosens. Bioelectron.*, 19 (2004) 1157–1167.
162. A. Ivanov, G. Evtugyn, H. Budnikov, F. Ricci, D. Moscone, G. Palleschi, Cholinesterase sensors based on screen–printedelectrodes for detection of organophosphorus and carbamic pesticides. *Anal. Bioanal. Chem.*, 377 (2003) 624–631.
163. J. Wang, M. Musameh, Carbon nanotube screen-printed electrochemical sensors. *Analyst*, 129 (2004) 1–2.
164. I. Palchetti, M. Mascini, Electroanalytical biosensors and their potential for food pathogen and toxin detection. *Anal Bioanal. Chem.*, 391 (2008) 455–471.
165. H. Kim, S.Ch. Chang, Y.B. Chim, α -Cyclodextrin Modified Screen Printed Graphite Electrodes for Detection of Phenols. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 23 (2002) 427–431.
166. O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos- Martínez, Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta*, 73 (2007) 202–219.
167. V. Somerset, E. Iwuoha, L. Hernandez, Stripping Voltammetric Measurement of Trace Metal Ions at Screen-printed Carbon and Carbon Paste Electrodes. *Procedia Chemistry*, 1 (2009) 1279–1282.

168. M.F. Bergamini, M.V.B. Zanoni, Anodic Stripping Voltammetric Determination of Aurothiomalate in Urine Using a Screen-Printed Carbon Electrode. *Electroanal.*, 18 (2006) 1457–1462.
169. R.O. Kadara, B.G.D. Haggett, B.J. Birch, Disposable Sensor for Measurement of Vitamin B₂ in Nutritional Premix, Cereal, and Milk Powder. *J. Agr. Food Chem.*, 54 (2006) 4921–4924.
170. S. Laschi, I. Palchetti, M. Mascini, Gold-based screen- printed biosensor for detection of trace lead. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 114 (2006) 460–465.
171. S. Laschi, G. Bagni, I. Palchetti, M. Mascini, As(III) Voltammetric Detection by Means of Disposable Screen-Printed Gold Electrochemical Sensors. *Anal. Lett.*, 40 (2007) 3002–3013.
172. J.M. Zen, C.C. Yang, A.S. Kumar, Voltammetric behavior and trace determination of Pb²⁺ at a mercury-free screen-printed silver electrode. *Anal. Chim. Acta*, 464 (2002) 229–235.
173. J. Wang, B. Tian, Mercury-free disposable lead sensors based on potentiometric stripping analysis of gold-coated screen-printed electrodes. *Anal. Chem.*, 65, (1993) 1529–1532.
174. J.Y. Choi, K. Seo, S.R. Cho, J.R. Oh, S.H. Kahng, J. Park, Screen-printed anodic stripping voltammetric sensor containing HgO for heavy metal analysis. *Anal. Chim. Acta*, 443 (2001) 241–247.
175. M. Jasinski, P. Grundler, G.U. Flechsig, J. Wang, Anodic Stripping Voltammetry with a Heated Mercury Film on a Screen-Printed Carbon Electrode. *Electroanal.*, 13 (2001) 34–36.
176. R.O. Kadara, I.E. Tohill, Stripping chronopotentiometric measurements of lead(II) and cadmium(II) in soils extracts and wastewaters using a bismuth film screen-printed electrode assembly. *Anal. Bioanal. Chem.*, 378 (2004) 770–775.
177. J. Wang, B. Tian, Screen-printed electrodes for stripping measurements of trace mercury. *Anal. Chim. Acta*, 274 (1993) 1–6.
178. J.M. Slater, J.W. Dilleen, Screen printed voltammetric sensor for 2-furaldehyde based on nickel modified and amalgam stabilized mercury coated ink. *Electroanal.*, 9 (1997) 1353–1354.

179. S.A Bhakta., E. Evans., T.E Benavides., C.D Garcia, Protein adsorption onto nanomaterials for the development of biosensors and analytical devices: A review. *Anal. Chim. Acta*, 872 (2015) 7–25.
180. J. Wang, Nanomaterial-based electrochemical biosensors. *Analyst*, 130 (2005) 421–426.
181. A. Gole, Ch. Dash, Ch Sommam, S.R. Sainkar, M. Rao, M. Sastry, On the Preparation, Characterization, and Enzymatic Activity of Fungal Protease–Gold Colloid Bioconjugates. *Bioconjugate Chem.*, 12 (2001) 684–690.
182. X.L. Luo, J.J. Xu, Q. Zhang, G.J. Yang, H.Y. Chen, Electrochemically deposited chitosan hydrogel for horseradish peroxidase immobilization through gold nanoparticles self-assembly. *Biosens. Bioelectron.*, 21 (2005) 190–196.
183. D.P. Tang, R. Yuan, Y.Q. Chai, L.Y. Zhang, J.Y. Dai, Y. Liu, X. Zhong, Potentiometric Immunosensor Based on Immobilization of Hepatitis B Surface Antibody on Platinum Electrode Modified Silver Colloids and Polyvinyl Butyral as Matrixes. *Electroanal.*, 17 (2005) 155–161.
184. Y.Z. Fang, R. Yuan, L. Xu, Y.Q. Chai, Y. Liu, D.P. Tang, Y. Zhang, Electrochemical impedance behavior of DNA biosensor based on colloidal Ag and bilayer two-dimensional sol–gel as matrices. *J. Biochem. Bioph. Meth.*, 62 (2005) 163–174.
185. J.M. Zen, C.T. Hsu, A.S. Kumar, H.J. Lyuu, K.Y. Lin, Aminoacid analysis using disposable copper nanoparticle plated electrode. *Analyst*, 129 (2004) 841–845.
186. J.Z. Xu, J.J. Zhu, H. Wang, H.Y. Chen, Nano-sized Copper oxide modified carbon paste electrodes as an amperometric Sensor for Amikacin. *Anal. Lett.*, 36 (2003) 2723–2733.
187. M.B. Gonzalez García, A. Costa García, Silver electrodeposition catalyzed by colloidal gold on carbon paste electrode: application to biotin–streptavidin interaction monitoring. *Biosens. Bioelectron.*, 15 (2000) 663–670.
188. Y. Xiao, F. Patolsky, E. Katz, J.F. Hainfeld, I. Willner, "Plugging into Enzymes": Nanowiring of Redox Enzymes by a Gold Nanoparticle. *Science*, 299 (2003) 1877–1881.
189. T. Liu, J. Zhong, X. Gan, C. Fan, G. Li, N. Matsuda, Wiring Electrons of Cytochrome c with Silver Nanoparticles in Layered Films. *ChemPhysChem.*, 4 (2003) 1364–1366.

190. J. Wang, G. Liu, A. Merkoci, Particle-based detection of DNA hybridization using electrochemical stripping measurements of an iron tracer. *Anal. Chim. Acta*, 482 (2003) 149–155.
191. X.L. Luo, J.J. Xu, W. Zhao, H.Y. Chen, A novel glucose ENFET based on the special reactivity of MnO₂ nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.*, 19 (2004) 1295–1300.
192. C.M. Niemeyer, Nanoparticles, Proteins and Nucleic Acids: Biotechnology Meets Materials Science. *Angew. Chem. Int. Edit.*, 40 (2001) 4128–4158.
193. E. Katz, I. Willner, J. Wang, Electroanalytical and Bioelectroanalytical Systems Based on Metal and Semiconductor Nanoparticles. *Electroanal.*, 16 (2004) 19–42.
194. A. Numnuam, K.Y. Chumbimuni-Torres, Y. Xiang, R. Bash, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, E. Pretsch, J. Wang, E. Bakker, Potentiometric Detection of DNA Hybridization. *J. Am. Chem. Soc.*, 130 (2008) 410–411.
195. C.M. Welch, R.G. Compton, The use of nanoparticles in electroanalysis: a review. *Anal. Bioanal. Chem.*, 384 (2006) 601–619.
196. S.H. Wu, D.H. Chen, Synthesis and characterization of nickel nanoparticles by hydrazine reduction in ethylene glycol. *J. Colloid Interf. Sci.*, 259 (2003) 282–286.
197. L. Sun, Z.J. Zhang, H.X. Dang, A novel method for preparation of silver nanoparticles. *Mater. Lett.*, 57 (2003) 3874–3879.
198. M. Fukushima, H. Yanagi, S. Hayashi, N. Suganuma, Y. Taniguchi, Fabrication of gold nanoparticles and their influence on optical properties of dye-doped sol-gel films. *Thin Solid Films*, 438 (2003) 39–43.
199. E. Majid, S. Hrapovic, Y. Liu, B.K. Male, T.H.J. Luong, Electrochemical Determination of Arsenite Using a Gold Nanoparticle Modified Glassy Carbon Electrode and Flow Analysis. *Anal. Chem.*, 78 (2006) 762–769.
200. M. Chikae, K. Idegami, K. Kerman, N. Nagatani, M. Ishikawa, Y. Takamura, E. Tamiya, Direct fabrication of catalytic metal nanoparticles onto the surface of a screen-printed carbon electrode. *Electrochem. Commun.*, 8, (2006) 1375–1380.

201. Y.S. Song, G. Muthuraman, Y.Z. Chen, Ch.Ch. Lin, J.M. Zen, Screen Printed Carbon Electrode Modified with Poly(l-Lactide) Stabilized Gold Nanoparticles for Sensitive As(III) Detection. *Electroanal.*, 18 (2006) 1763–1770.
202. S.A. Miscoria, G.D. Barrera, G.A. Rivas, Enzymatic Biosensor Based on Carbon Paste Electrodes Modified with Gold Nanoparticles and Polyphenol Oxidase. *Electroanal.*, 17 (2005) 1578–1582.
203. S.H. Lee, H.Y. Fang, W.C. Chen, H.M. Lin, C.A. Chang, Electrochemical study on screen-printed carbon electrodes with modification by iron nanoparticles in $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ redox system. *Anal. Bioanal. Chem.*, 383 (2005) 532–538.
204. C.C. Yang, A.S. Kumar, J.M. Zen, Electrocatalytic Reduction and Determination of Dissolved Oxygen at a Preanodized Screen-Printed Carbon Electrode Modified with Palladium Nanoparticles. *Electroanal.*, 18, (2006) 64–69.
205. A.M. Smith, S. Nie, Chemical analysis and cellular imaging with quantum dots. *Analyst*, 129 (2004) 672–677.
206. D. Hernández Santos, M.B. Gonzalez García, A. Costa García, Stripping Voltammetric Analysis of Heavy Metals at Nitrogen Doped Diamond-Like Carbon Film Electrodes. *Electroanal.*, 14 (2002) 1294–1298.
207. J. Wang, Nanoparticle-based electrochemical DNA detection. *Anal. Chim. Acta*, 500 (2003) 247–257.
208. L.D., Zhu, J.L. Zhai, Y.N. Guo, C.Y. Tian, R.L. Yang, Amperometric Glucose Biosensors Based on Integration of Glucose Oxidase onto Prussian Blue/Carbon Nanotubes Nanocomposite Electrodes. *Electroanal.*, 18 (2006) 1842–1846.
209. C. Jianrong, M. Yuqing, H. Nongyue, W. Xiaohua, L. Sijiao, Nanotechnology and biosensors. *Biotechnol. Adv.*, 22 (2004) 505–518.
210. P. Yañez, J.M. Pingarron, Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.*, 382 (2005) 884–886.
211. C. Li, E.T. Thostenson, T.W. Chou, Sensors and actuators based on carbon nanotubes and their composites: A review. *Compos. Sci. Technol.*, 68 (2008) 1227–1249.
212. C.G.R. Heald, G.G. Wildgoose, L. Jiang, T.G.J. Jones, R.G. Compton, Chemical Derivatization of Multiwalled Carbon Nanotubes Using Diazonium Salts. *ChemPhysChem*, 5 (2004) 1794–1799.

213. O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, P. Recio-Cebrián, M.J. Arcos-Martínez, Screen-printed acetylcholinesterase-based biosensors for inhibitive determination of permethrin. *Sci. Total Environ.*, 426 (2012) 346–350.
214. O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, Determination of metals based on electrochemical biosensors. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.*, 43 (2013) 1042–1073.
215. L. Asturias-Arribas, M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, CYP450 biosensors based on screen-printed carbon electrodes for determination of cocaine. *Anal. Chim. Acta*, 685 (2011) 15–20.
216. L. del Torno-de Román, M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Gluconic acid determination in wine by electrochemical biosensing. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 176 (2013) 862–868.
217. A.L. Alvarado-Gámez, M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Vanadium determination in water with alkaline phosphatase based screen-printed carbon electrode modified with gold nanoparticles. *J. Electroanal. Chem.*, 693 (2013) 51–55.
218. A. Calvo-Pérez, O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, Disposable amperometric biosensor for the determination of tyramine using plasma amino oxidasa. *Microchim. Acta*, 180 (2013) 253–259.
219. L. Asturias-Arribas, M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Cytochrome P450 2D6 based electrochemical sensor for the determination of codeine. *Talanta*, 129 (2014) 315–318.
220. B. Molinero-Abad, M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Malate quinine oxidoreductase biosensors based on tetrathiafulvalene and gold nanoparticles modified screen-printed carbon electrodes for malic acid determination in wine. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 202 (2014) 971–975.
221. B. Molinero-Abad, M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Sulfite oxidase biosensors based on tetrathiafulvalene modified screen-printed carbon electrodes for sulfite determination in wine. *Anal. Chim. Acta*, 812 (2014) 41–44.

222. L. del Torno de-Román, M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, A. Jaureguibeitia, M.J. Arcos-Martínez, GADH screen-printed biosensor for gluconic acid determination in wine samples. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 192 (2014) 56–59.
223. X. Zhang, H. Ju, J. Wang, (Eds.), ELECTROCHEMICAL SENSORS, BIOSENSORS AND THEIR BIOMEDICAL APPLICATIONS, G. Liu, J. Wang, Y. Lin, J. Wang, Nanoparticle-based biosensors and bioassays. Chapter 14. Academic Press, Inc. San Diego CA, (2011).
224. C.R. Lowe, An introduction to the concepts and technology of biosensors. *Biosensors*, 1 (1985) 3–16.
225. B.R. Eggins, *Biosensors: an Introduction*, John Wiley & Sons, England, (1996).
226. P.C. Pandey, S. Upadhyay, B. Upadhyay, Peroxide Biosensors and Mediated Electrochemical Regeneration of Redox Enzymes. *Anal. Biochem.*, 252 (1997) 136–142.
227. J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, John Wiley & Sons, New Jersey, (2006).
228. A.J. Killard, M. Sequeira, D. Diamond, M.R. Smyth, *Electroanalysis and Biosensors in Clinical Chemistry. Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, England, (2000).
229. A.P. Turner, I. Karube, G.S. Wilson, (Eds), *Biosensors: fundamentals and applications*. Oxford University Press, New York, (1987)
230. J.M. Kauffmann, G. Gilbaut, Enzyme electrode biosensors: theory and applications. *Methods Biochem. Anal.*, 36 (1992) 63-113.
231. P.N. Bartlett, J.M. Cooper, A review of the immobilization of enzymes in electropolymerized films. *J. Electroanal. Chem.*, 363 (1993) 1–12.
232. W. Schuhmann, Conducting polymer based amperometric enzyme electrodes. *Microchim. Acta*, 121 (1995) 1–29.
233. M. Trojanowicz, T. Krawczynski vel Krawczyk. Electrochemical biosensors based on enzymes immobilized in electropolymerized films. *Microchim. Acta*, 121 (1995) 167–181.

234. S. Cosnier, Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review. *Biosens. Bioelectron.*, 14 (1999) 443–456.
235. T. Matsue, N. Kasai, M. Narumi, M. Nishizawa, H. Yamada, I. Uchida, Electron transfer from NADH dehydrogenase to polypyrrole and its applicability to electrochemical oxidation of NADH. *J. Electroanal. Chem.*, 300 (1991) 111–118.
236. S. Cosnier, M. Holzinger, Electrosynthesized polymers for biosensing. *Chem. Soc. Rev.*, 40 (2011) 2146–2156
237. W. Schumann, C. Kranz, J. Huber, H. Wohlschlager, Conducting polymer-based amperometric enzyme electrodes. Towards the development of miniaturized reagentless biosensors, *Synth. Met.*, 61 (1993) 31–35.
238. S. Cosnier, Electropolymerization of amphiphilic monomers for designing amperometric biosensors. *Electroanal.*, 9 (1997) 894–902.
239. W. Schuhmann, R. Lammert, B. Uhe, H.L. Schmidt, Polypyrrole, a New Possibility for Covalent Binding of Oxidoreductases to Electrode Surfaces as a Base for Stable Biosensors. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 1 (1990) 537–545.
240. H. Korri-Youssoufi, F. Garnier, P. Srivastava, P. Godillot, A. Yassar, Toward Bioelectronics: Specific DNA Recognition Based on an Oligonucleotide-Functionalized Polypyrrole. *J. Am. Chem. Soc.*, 119 (1997) 7388–7389.
241. C. Kranz, H. Wohlschlaeger, H.L. Schmidt, W. Schuhmann, Controlled Electrochemical Preparation of Amperometric Biosensors Based on Conducting Polymer Multilayers. *Electroanal.*, 10 (1998) 546–552.
242. S. Cosnier, B. Galland, C. Gondran, A. Le Pellec, Electrogenation of Biotinylated Functionalized Polypyrroles for the Simple Immobilization of Enzymes. *Electroanal.*, 10 (1998) 808–813.
243. M. Gerard, A. Chaubey, B.D. Malhotra, Application of conducting polymers to biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, 17 (2002) 345–359.
244. S. Cosnier. Biosensors based on electropolymerized films: new trends. *Anal. Bioanal. Chem.*, 377 (2003) 507–520.
245. T. Tatsuma, M. Gondaira, T. Watanabe, Peroxidase-incorporated polypyrrole membrane electrodes. *Anal. Chem.*, 64 (1992) 1183–1187.

246. S. Gaspar, K. Habermüller, E. Gsöregi, W. Schuhmann, Hydrogen peroxide sensitive biosensor based on plant peroxidases entrapped in Os-modified polypyrrole films. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 72 (2001) 63–68.
247. I.C. Popescu, S. Cosnier, Poly(amphiphilic pyrrole)-tyrosinase-peroxidase electrode for amplified flow injection-amperometric detection of phenol. *Anal. Chim. Acta*, 319 (1996) 145–151.
248. T.F. Ming, B. Xu, G.Y. Zhu, A Hydrogen Peroxide Biosensor Combined HRP Doped Polypyrrole with Ferrocene Modified Sol-gel Derived Composite Carbon Electrode. *Chinese Chem. Lett.*, 12 (2001) 625–631.
249. M. Quinto, I. Losito, F. Palmisano, C.G. Zambonin, Disposable interference-free glucose biosensor based on an electropolymerised poly(pyrrole) permselective film. *Anal. Chim. Acta*, 420 (2000) 9–17.
250. S.S. Razola, B.L. Ruiz, N.M. Diez, H.B. Mark, J.M. Kauffmann, Hydrogen peroxide sensitive amperometric biosensor based on horseradish peroxidase entrapped in a polypyrrole electrode. *Biosens. Bioelectron.*, 17 (2002) 921–928.
251. C. Bonnet, S. Andreescu, J.L. Marty, Adsorption: an easy and efficient immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 481 (2003) 209–211.
252. K.A. Joshi, J. Tang, R. Haddon, J. Wang, W. Chen, A. Mulchaldani, A disposable biosensors for organophosphorus nerve agents based on carbon nanotubes modified thick film strip electrodes. *Electroanal.*, 17 (2005) 54–58.
253. Y.H. Lin, F. Lu, J. Wang, Disposable carbon nanotube modified screen printed biosensor for amperometric detection of organophosphorus pesticides and nerve agents. *Electroanal.*, 16 (2004) 145–149.
254. G. Li, J.M. Liao, G.Q. Hu, N.Z. Ma, P.J. Wu, Study of carbon nanotube modified biosensor for monitoring total cholesterol in blood. *Biosens. Bioelectron.*, 20 (2005) 2140–2144.
255. S. Andreescu, A. Avramescu, C. Bala, V. Magearu, J.L. Marty, Detection of organophosphorus insecticides with immobilized acetylcholinesterase: comparative study between two enzyme sensors. *Anal. Bioanal. Chem.* 374 (2002) 39–45.
256. S. Andreescu, L. Barthelmebs, J.L. Marty, Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes: comparative study between three immobilization

methods; and applications to the detection of organophosphorus insecticides. *Anal. Chim. Acta*, 464 (2002) 171–180.

257. N. Chauhan, C.S. Pundir, An amperometric biosensor based on acetylcholinesterase immobilized onto iron oxide nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes modified gold electrode for measurement of organophosphorus insecticides, *Anal. Chim. Acta*, 701 (2011) 66–74.

258. M.P. Massafra, S.I. Córdoba de Torresi, Urea amperometric biosensors based on a multifunctional bipolymeric layer: Comparing enzyme immobilization methods. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 137 (2009) 476–482.

259. S. Aravamudhan, A. Kumar, S. Mohapatra, S. Bhansali, Sensitive estimation of total cholesterol in blood using Au nanowires based micro-fluidic platform. *Biosens. Bioelectron.*, 22 (2007) 2289–2294.

260. S.K. Arya, M. Datta, B.D. Malhotra, Recent advances in cholesterol biosensor. *Biosens. Bioelectron.*, 23 (2008) 1083–1100.

261. E.V. Gogol, G.A. Evtugyn, J.L. Marty, H.C. Budnikov, V.G. Winter, Amperometric biosensors based on nafion coated screen-printed electrodes for the determination of cholinesterase inhibitors. *Talanta*, 53 (2000) 379–389.

262. Z.B. Zhang, S.J. Yuan, X.L. Zhu, K.G. Neoh, E.T. Kang, Enzyme-mediated amperometric biosensors prepared via successive surface-initiated atom-transfer radical polymerization. *Biosens. Bioelectron.*, 25 (2010) 1102–1108.

263. O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, L. Ferreira-Gonçalves, M.J. Arcos-Martínez, Development of urease based amperometric biosensors for the inhibitive determination of Hg(II). *Talanta*, 79 (2009) 1306–1310.

5. Biosensor for aluminum (III) based on its inhibition of α -chymotrypsin immobilized on a screen-printed carbon electrode modified with gold nanoparticles

5. Determinación de Al(III) por medio de un biosensor de α -quimotripsina con benzoil tirosina etil ester como sustrato

En este capítulo se propone la puesta a punto de un biosensor para la determinación de Al(III) basado en la inhibición de la enzima quimotripsina con el objeto de presentar por primera vez una determinación electroquímica de aluminio utilizando electrodos distintos a los convencionales de mercurio, ni usara reactivos complejantes y presentara límites de detección similares a los obtenidos por estos métodos.

En este caso la inmovilización de la enzima se llevó a cabo utilizando un procedimiento de encapsulación–polimerización para obtener la fijación de la enzima usando alcohol polivinílico. El electrodo serigrafiado de carbón, se había modificado previamente depositando nanopartículas de oro. Este tipo de modificación conlleva una mejora de la sensibilidad del método y permite realizar determinaciones precisas y estables, estudiándose también la posibilidad de aplicarlo a muestras de agua potable. Como sustrato se utilizó benzoil tirosina etil ester (BTEE), cuya señal de oxidación fue afectada por la presencia de iones Al(III) produciéndose un decrecimiento en la corriente amperométrica. Las condiciones de optimización de la señal fueron establecidas y se procedió a la validación del biosensor.

El método fue exitosamente aplicado a la determinación de Al(III) en agua de grifo y a un material de referencia certificado, recuperándose el valor reportado por el material certificado.

Este trabajo se ha publicado como “Biosensor for aluminium(III) based on its inhibition of α -chymotrypsin immobilized on a screen-printed carbon electrode modified with gold nanoparticles”, en *Microchim. Acta* (2012) 179:65–70, además se ha presentado en forma de un poster “Desarrollo y caracterización de un biosensor de α -quimotripsina para la determinación de aluminio”, en el XIX Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica, Alcalá de Henares, España 2010.

5.1. Introduction

Aluminum is an element of indubitable importance in the world today. It has been demonstrated that several neurological disorders, such as Alzheimer's disease, are linked to the presence of aluminum [1]. On the other hand, the content of this metal in natural waters is increasing due to acid rain, which causes the dissolution of the soil aluminum in the earth's crust. Thus, the development of methods for the analysis of aluminum at trace levels has become a topic of increasing interest. The usual determination of aluminum in aqueous solution has been performed by different techniques including electrothermal atomic absorption spectrometry [2–5] and fluorescence spectroscopy [6]. These techniques imply a high cost level of instrumentation and expertized manipulation.

The application of electroanalytical techniques to the analysis of trace elements can provide an interesting alternative to the traditional spectroscopic methods. Together with the recognized advantage of the relatively low cost of electrochemical instrumentation one should bear in mind the high sensitivity of some of these methods [7–30]. Many of these electrochemical procedures are based on the use of mercury electrodes, which present a high level of toxicity [7–22], and the others are based on complex electrode modification procedures [23–30]. Nowadays, the use of sensors based in enzymatic modified electrodes as transducers in amperometric and potentiometric techniques has opened important perspectives in the development of numerous biosensors for the determination of many kinds of analytes [31, 32]. Aluminum, such as other metals, can actuate as an enzyme inhibitor. This phenomenon, when is used to determine these hazardous toxic elements, offers several advantages, such as high sensitivity and specificity [33, 34]. It is well known that aluminum presents an inhibition effect on α -chymotrypsin activity [35]. Chymotrypsin, a member of the large family of serine proteinases, specifically cleaves peptide bonds on the carboxyl side of phenylalanine, tyrosine, and tryptophan residues and plays an important role in protein digestion [36]. In this way, N-Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE) can be hydrolyzed by α -chymotrypsin to N-Benzoyl, L-Tyrosine and ethanol. This enzymatic reaction can be followed by amperometry, since its products can suffer electrochemical reactions. The presence of aluminum leads to a decrease in the enzymat-

ic activity and, as a result, a lower quantity of products is liberated. Therefore, a decrease in the amperometric signal obtained is observed, which can be related to the concentration of aluminum.

The possibilities of the amperometric biosensors can be increased by means of replacing the classical electrodes by disposable screen-printed electrodes (SPEs). SPEs present important advantages, such as elimination of memory effects in the analysis at trace levels and their particular interest for *in situ* determinations. The construction of SPEs involves the printing of different inks on planar ceramic or plastic supports.

The great flexibility of SPEs resides in their high number of possible modifications. In fact, the composition of the inks used in the printing process can be modified by adding substances of a very different nature, such as metals, enzymes, polymers, complexing agents etc. Furthermore, the possibility of modifying the electrodes also exists once they have been constructed through the deposition of this kind of substances onto the surface of the electrode [31, 37]. An interesting form of SPEs modification consists of the incorporation of metallic nanoparticles on the working electrode surface. Due to their reduced size, metallic nanoparticles exhibit important physical and electrical properties which make them very useful for the construction of more sensitive electrochemical sensors and biosensors [38, 39].

In this work disposable α -chymotrypsin based amperometric biosensors were utilized for the inhibitive determination of aluminum.

5.2. Experimental Section

5.2.1. Reagents

Several inks were used in the fabrication of SPEs, namely Electrodag PF-407 A (carbon ink), Electrodag 6037 SS (silver/silver chloride ink) and Electrodag 452 SS (dielectric ink) supplied by Acheson Colloiden (Scheemda, The Netherlands). All solutions were prepared with purified water supplied by TKA Purification System, in-

verse osmosis, with a UV lamp irradiation system. α -chymotrypsin enzyme (57.24 U/mg) and BTEE were purchased from Sigma, (Steinheim, Germany).

Bovine serum albumine (BSA) and fully hydrolyzed polyvinyl alcohol (PVA) 5% w/v used in the immobilization of the enzyme were obtained from Sigma (Steinheim, Germany) and J.T. Baker (Deventer, The Netherlands), respectively. Hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate (HAuCl_4) was purchased from Sigma–Aldrich (Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany).

Stock standard solutions of Al, Fe, Cu, Sn, W, V, Mo and Cr were prepared from Merck (Titrisol solutions, Merck Darmstadt, Germany), 0.1 M acetate buffer from acetic acid and sodium acetate (Suprapur, Merck, Darmstadt, Germany) and 0.1 M KCl (Merck, Darmstadt, Germany) solutions were used as supporting electrolyte.

Aluminum solutions used for spike were prepared from High Purity Standard (Charleston, SC, USA) confirmed against standard reference material SRM 3101.

5.2.2. Equipment

Hand-made SPEs were produced on a DEK 248 printing machine (DEK, Weymouth, UK) using polyester screens with appropriate stencil designs mounted at 45° to the printer stroke.

Electrochemical measurements were made with an Autotolab 128 N electrochemical system with GPS software (Echo Chemie, Utrecht, Netherlands).

pH measurements were carried out with a Daigger (Illinois, USA) pHmeter 5000.

5.2.3. Construction of the biosensors

5.2.3.1. SPEs preparation

The construction of the hand-made SPEs used in the determination of aluminum (Figure 5.1) was based on printing successive layers of different inks onto a polyester strip substrate. Four different screens with appropriate stencils were used to transfer

the required design following the printing procedure described in previous works [40, 41].



Figure 5.1. Diagram of the screen printed electrochemical system used. 1. Reference electrode; 2. Working carbon electrode; 3. Counter electrode; 4. Electrical connections; 5. Dielectric insulating layer.

5.2.3.2. *Electrode cleaning and nanoparticles deposition.*

The working electrode surface was activated by recording 30 cycle voltammograms between 1.8 V and -1.8 V, scan rate 100 mV s^{-1} , in a 0.1 M KCl solution [42].

Metallic gold nanoparticles deposits were obtained by direct electrochemical deposition on the carbon working electrode surface, using a 0.1 mM solution of HAuCl_4 in 0.5 M H_2SO_4 . The deposition was performed by applying a potential of +0.18 V during 15 s under stirring conditions [43].

5.2.3.3. *α -chymotrypsin immobilization in AuNPs/SPCEs*

Enzyme was immobilized by entrapment with PVA on the surface of gold nanoparticles modified screen printed carbon electrodes (AuNPs/SPCEs). The optimum immobilization process was reached by mixing $15 \mu\text{L}$ of a 30 mg mL^{-1} of enzyme solution, $7.5 \mu\text{L}$ of a 1.7% (w/v) BSA solution, $9 \mu\text{L}$ of a 5% (w/v) PVA and $7.5 \mu\text{L}$ of a

pH 7.8 Britton-Robinson buffer solution. Then, 10 μ L of this mixture was dropped onto the working electrode surface. Immediately afterwards 3 μ L of enzyme solution were placed over the mixture. Next, the electrode was kept at laboratory ceiling fluorescent lamp for 2 h, at room temperature [44]. Finally, the electrode was stored for 24 h at 4 °C before first use and between calibration settings. Under these storage conditions the developed biosensor showed a good stability for more than 1 month.

5.2.3.4 Aluminum determination procedure

The α -chymotrypsin biosensor was placed in the electrochemical cell containing 5.00 mL of acetate buffer solution. An adequate potential was applied and, once a steady-state current was set, a defined amount of BTEE stock solution was added to the measuring cell. A large oxidation current was observed due to the addition of BTEE, and then once a plateau corresponding to the steady-state response was reached again, fixed portions of the aluminum stock solution were added consecutively. The addition of aluminum solution resulted in a current decrease proportional to the amount of metal added.

Enzyme electrodes were conditioned in an acetate buffer solution for 5 minutes between each calibration setting.

5.3. Results and discussion

The α -chymotrypsin/AuNPs/SPCE biosensors produce an amperometric signal, which is sensitive to the concentration of BTEE, as is shown in Figure 5.2. Inset shows amperometric inhibition current vs. concentration plot of Al(III).

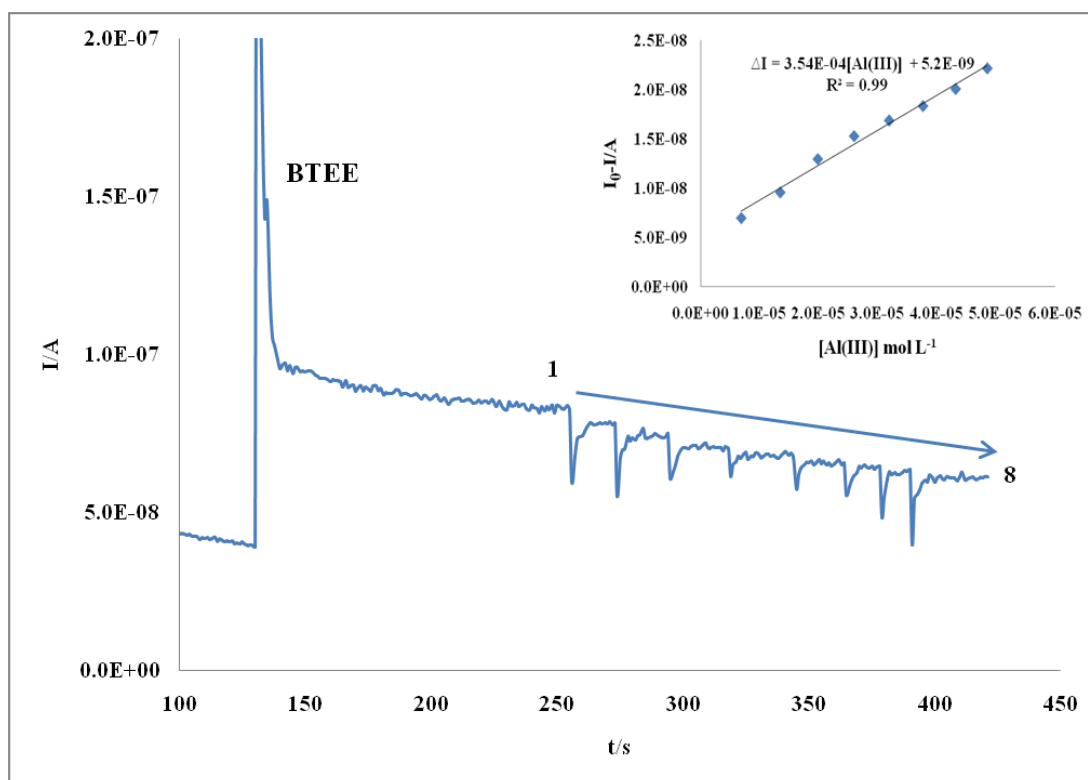


Figure 5.2. Amperometric recording performed with α -chymotrypsin/AuNPs/SPCE by means of consecutive additions (1-8) of 100 μ L de Al(III) 3.7×10^{-4} M, [BTEE] 1.6×10^{-4} M; NaOAc buffer pH 6.8, $E_{ap} = +0.8$ V vs. Ag/AgCl. Inset: calibration curve corresponding to this amperogram.

Aluminum inhibition action was quantitatively evaluated determining the difference between the steady-state current in the absence of aluminum (I_0) and the steady state current in the presence of aluminum (I). The parameter ΔI ($I_0 - I$) depends on BTEE concentration, applied potential (E_{ap}) and pH of the buffer solution. Different experiments were carried out in order to optimize all this variables.

The effect of applied potential was studied by means of the analysis of the amperometric response at potentials ranging between +0.6 V and +1.0 V. A high quality amperometric signal at +0.8 V was obtained, so this potential was taken as the optimum. A pH range between 6 and 9 was also checked obtaining a value of 6.8 as the optimum taking into account the best stability conditions for the enzyme. Finally, the influence of the concentration of BTEE was studied in the concentration range from

0.05 mM up to 0.3 mM. A concentration of BTEE of 0.16 mM was found to give a high inhibition response of aluminum.

The inhibitory effect of aluminum ions on the response of the α -chymotrypsin biosensors was investigated following the method of Lineweaver-Burk [45, 46]. It can be seen in Figure 5.3 that the studied inhibition process follows an uncompetitive behavior.

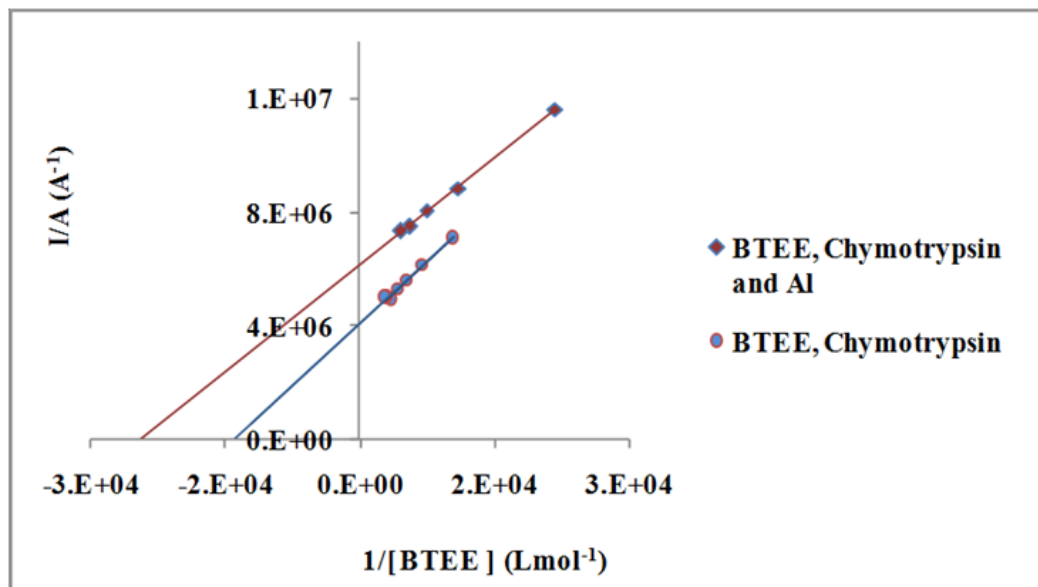


Figure 5.3. Lineweaver-Burk plot of α -chymotrypsin/AuNPs/SPCE biosensor without aluminum and in presence of aluminum, NaOAc buffer, pH 6.8, $E_{ap} = +0.8$ V vs. Ag/AgCl.

5.3.1. Calibration and limit of detection

A linear dependence between ΔI and the aluminum concentration has been observed in the concentration range from 6.7 μ M to 52.4 μ M. The calibration equation obtained in this range was $\Delta I = 3.54 \times 10^{-4} [Al(III)] + 5.22 \times 10^{-9}$ ($R^2=0.99$) as showed in Figure 5.2.

Several calibration curves were carried out under the optimum conditions in order to evaluate figures of merit, such as precision and limit of detection. The limit of detec-

tion (LOD) under the optimum working conditions was determined from the standard deviation of calibration curves (Sy/x) using the criteria $3Sy/x$. In Table 5.1 are shown calibration parameters used to estimate limit of detection and quantification (LOQ) of the method. Their values were 3.6×10^{-6} for detection limit and 1.2×10^{-5} for quantification limit respectively.

Table 5.1. Parameters of Al(III) calibration curves performed in order to estimate LOD and LOQ of the method.

Calibration	LOD (M)	LOQ (M)	Slope [A/M]	Intercept (A)	Sy/x	R^2
I	3.3×10^{-6}	1.10×10^{-5}	1.10×10^{-2}	6.55×10^{-8}	1.25×10^{-8}	0.996
II	3.9×10^{-6}	1.30×10^{-5}	3.36×10^{-3}	1.90×10^{-8}	4.46×10^{-9}	0.994
III	3.6×10^{-6}	1.20×10^{-5}	4.67×10^{-4}	1.21×10^{-8}	5.60×10^{-10}	0.995
Mean	3.6×10^{-6}	1.2×10^{-5}				
SD	3.0×10^{-7}	1.0×10^{-6}				
RSD	8.3	8.3				

5.3.2. Precision

This parameter was calculated in terms of repeatability and reproducibility. The repeatability of successive amperometric measurements with the same electrode surface was tested, conditioned for 5 min in a stirred acetate buffer solution, pH 7.8, between experiments. Sets of three successive calibrations for aluminum were realized yielding a relative standard deviation (RSD) for their slopes of 5.0%. Calibration parameters used to estimate repeatability of method are shown in Table 5.2.

Table 5.2. Calibration parameters obtained in order to assess the repeatability of α -chymotrypsin/AuNPs/SPCE biosensor (at 0.8V vs. a Ag/AgCl SPE in supporting electrolyte pH 6.8).

Calibration	Slope [A/M]	Intercept (A)	Sy/x	R ²
I	4.669×10^{-4}	1.21×10^{-8}	5.6×10^{-10}	0.995
II	4.352×10^{-4}	6.43×10^{-9}	6.2×10^{-10}	0.995
III	4.246×10^{-4}	1.16×10^{-8}	1.0×10^{-9}	0.990
Mean	4.422×10^{-4}			
SD	2.2×10^{-5}			
RSD	5.0			

Likewise, the reproducibility of the amperometric signal was checked using the slopes of five regressions carried out with different electrode surfaces. The RSD value obtained was 6.4%. These results suggest that the fabrication procedure of α -chymotrypsin based biosensors is reliable, and allows reproducible electroanalytical responses to be obtained with different electrodes constructed in the same manner. In Table 5.3 are shown calibration parameters used to assess reproducibility of α -chymotrypsin biosensor. These precision values are suitable because biosensors are discarded after use.

Table 5.3. Calibration parameters obtained in order to assess the reproducibility of α -chymotrypsin/AuNPs/SPCE biosensor (at +0.8V vs. Ag/AgCl SPE in supporting electrolyte pH 6.8).

Calibration	Slope [A/M]	Intercept (A)	Sy/x	R ²
I	3.636×10^{-4}	3.88×10^{-9}	5.0×10^{-10}	0.994
II	3.525×10^{-4}	1.34×10^{-8}	4.8×10^{-10}	0.990
III	3.858×10^{-4}	-6.41×10^{-10}	8.5×10^{-10}	0.990
IV	3.455×10^{-4}	7.15×10^{-9}	5.7×10^{-10}	0.990
V	3.241×10^{-4}	8.15×10^{-9}	4.4×10^{-10}	0.990
Mean	3.543×10^{-4}			
SD	2.3×10^{-5}			
RSD	6.4			

5.3.3. Trueness

Trueness was evaluated by means of analysis buffer solution, spiked with a standard aluminum solution. The method showed a satisfactory value for this parameter since the aluminum added concentration value ($1.38 \times 10^{-5} \text{M}$) was in good agreement with the found concentration value ($1.4 \times 10^{-5} \pm 0.1$) M ($n=3$, $\alpha = 0.05$). The average recovery for this analysis was 102.5% with a RSD of 5.2 %. Calibration parameters obtained in order to assess trueness of method and recovery are shown in Table 5.4

Table 5.4. Parameters of calibration curves performed in order to estimate Al(III) concentration added to buffer solution.

Calibration	Added (M)	Found (M)	Recovery %	Slope [A/M]	Intercept (A)	Sy/x	R ²
I	1.38×10^{-5}	1.52×10^{-5}	103.6	7.781×10^{-4}	1.19×10^{-8}	9.7×10^{-10}	0.991
II	1.38×10^{-5}	1.48×10^{-5}	107.2	4.352×10^{-4}	6.43×10^{-9}	6.2×10^{-10}	0.995
III	1.38×10^{-5}	1.31×10^{-5}	96.7	5.976×10^{-4}	7.82×10^{-9}	1.1×10^{-9}	0.990
Mean		1.43×10^{-5}	102.5				
SD		1.1×10^{-6}	5.3				
RSD		7.7	5.2				

5.3.4. Accuracy

The accuracy of the developed method was evaluated by means of the analysis of a certified material [SRM High Purity Standards, Lot Number 1121015, (1000 ± 3) mg L⁻¹]. The aluminum mean concentration quantified by the developed procedure, (1012 ± 34) mg L⁻¹ ($n = 3$; $\alpha = 0.05$), matches the certified value of the sample considering the associated uncertainty expressed as mean deviation; recovery of SRM was 100.9% with RSD of 4.4%. In Table 5.5 are shown calibration parameters necessary to estimate SRM spiked to buffer solution, and in Table 5.6 is shown SRM recovery. Therefore, the described method is both accurate and suitable for aluminum analysis.

Table 5.5. Parameters of calibration curves performed in order to estimate Al(III) SRM (1000 ± 3) mg L⁻¹ spiked to buffer solution.

Calibration	Pendiente [A/M]	Intercepto (A)	Sy/x	R ²
I	2.26×10^{-7}	1.76×10^{-8}	9.9×10^{-9}	0.994
II	2.02×10^{-7}	8.71×10^{-9}	1.0×10^{-8}	0.990
III	1.37×10^{-7}	6.24×10^{-9}	1.4×10^{-8}	0.990

Table 5.6. Recovery of Al(III) SRM (1000 ± 3) mg L⁻¹ spiked to buffer solution.

Calibration	Added (mg/L)	Found (mg/L)	SRM (mg/L)	SRM (mg/L)	Recovery %
I	1.17	1.23	10.52	1052	105.2
II	1.17	1.18	10.12	1012	101.2
III	1.17	1.12	9.63	963	96.3
Mean		1.16		1012 ± 34	100.9
SD		0.05			4.5
RSD		4.4			4.4

5.3.5. Analytical application

The developed disposable biosensor was used in the direct analysis of aluminum in a tap water sample by standard addition. A value of $(1.50 \times 10^{-5} \pm 0.03)$ M, ($n = 3$; $\alpha = 0.05$) in amperometric cell with RSD of 2.9 % was obtained. Applied dilution factors gave a concentration of 4.02×10^{-4} M in tap water. Table 5.7 shows the calibration parameters for the estimation of Al(III) tap water concentration.

Table 5.7. Parameters of calibration curves performed in order to estimate Al(III) concentration in tap water.

Calibration	Concentration (M)	Slope [A/M]	Intercept (A)	Sy/x	R2	Tap water (M)
I	1.52×10^{-5}	4.361×10^{-3}	6.62×10^{-8}	9.8×10^{-9}	0.980	4.07×10^{-4}
II	1.45×10^{-5}	3.883×10^{-3}	5.62×10^{-8}	2.8×10^{-9}	0.997	3.89×10^{-4}
III	1.53×10^{-5}	2.777×10^{-3}	4.24×10^{-8}	4.7×10^{-9}	0.989	4.10×10^{-4}
Mean	1.50×10^{-5}					4.02×10^{-4}
SD	4.4×10^{-7}					
RSD	2.9					2.9

5.3.6. Interferences

The possible effect of the presence of potentially interfering ions in the solution was analyzed. Cu(II), Fe(III), Mo(VI), V(IV), W(VI), Cr(VI), Sn(II), Cd(II), Hg(II), Pb(II), Co(II), Ca(II), Mg(II) and Ni(II) were studied. As it can be seen in Figure 5.4 the highest interference effect was found for Mo(VI). However, none of the metal ions analyzed showed an inhibition effect as higher as aluminum effect at a low concentration level.

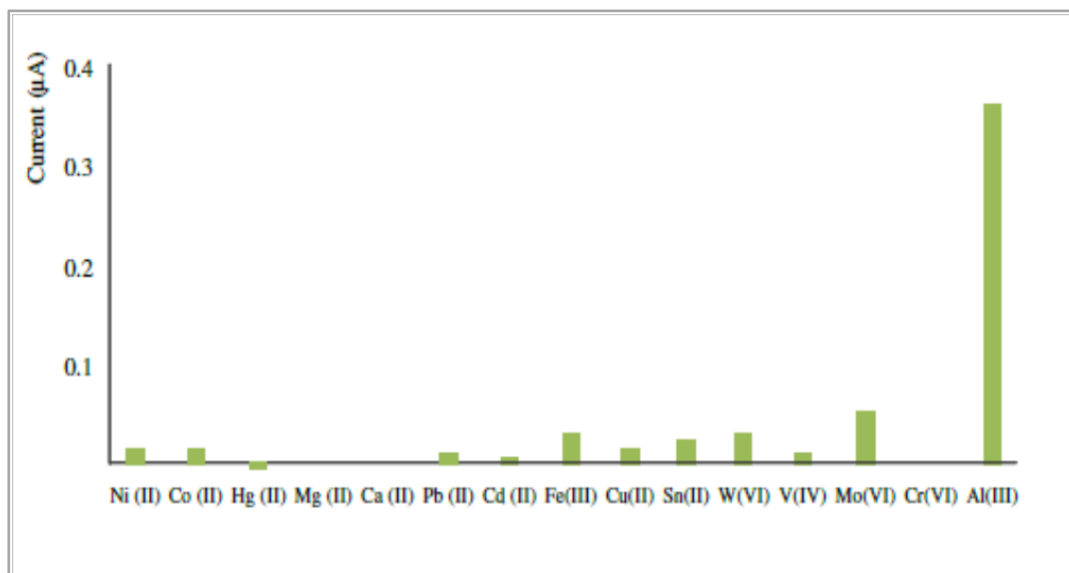


Figure 5.4. Inhibition current of α -chymotrypsin modified SPCE in presence of: Ni(II), 7.3 μ M; Co(II), 6.9 μ M; Hg(II), 1.0 μ M; Mg(II), 6.8 μ M; Ca(II), 7.5 μ M; Pb(II), 8.3 μ M; Cd(II), 6.0 μ M; Fe(III), 7.0 μ M; Cu(II), 5.9 μ M; Sn(II), 7.5 μ M; W(VI), 3.9 μ M; V(IV), 7.3 μ M; Mo(VI), 7.8 μ M; Cr(VI), 4.1 μ M; Al(III), 7.0 μ M; [BTEE] 1.6×10^{-4} M; NaOAc buffer pH 6.8; Eap = +0.8 V vs. Ag/AgCl.

5.4. Conclusions

The use of α -chymotrypsin based inhibitor biosensors using AuNPs/SPCEs allows selective amperometric determination of aluminum. The biosensor reproducibility and repeatability were studied obtaining values of RSD for the slopes of several calibrations and were lower than 7%. The method developed in this work presents several important advantages, including: sensitivity, disposability, ease-of-use and environmentally friendly determination for the analysis of aluminum. Moreover, this work presents a motivating feature. It presents for the first time that Al(III) can be electrochemically analyzed without a previous complexation process, which could be suitable in some applications.

The biosensor was analytical characterized through performance parameters. The detection limit of 3.6×10^{-6} M and quantification limit of 1.2×10^{-5} M, allow determination of low amounts of aluminum. The repeatability of 5.0% and reproducibility of 6.4% of this biosensor are good. The mean recovery was 102.5% with a RSD of 5.3%. The SRM recovery was 100.9% with a RSD of 4.4%. These values are good for the concentration level tested. Analytical applicability of method tested was showed analyzing tap water with RSD of 2.9%.

Linear ambit of calibration curves of aluminum with α -chymotrypsin allows the quantification of low amounts of aluminum. The procedure to link enzyme onto electrode is very simple and offers advantage over other polymerization procedures used to fix enzymes on electrodes.

5.5. References

1. D.R.M. Lachlan, Toxicology of Metals. In: E.L.W. (Ed), Boca Raton, (1996).
2. V.A. Granadillo, D.R. Fernandez, A.D. Vasquez, C.J. Garcia, B.I. Semprun, M. Hernandez, M. Colina, Aluminum levels in drinking water from Maracaibo City determined by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry. *Atom. Spectrosc.*, 28 (2007) 73–79.
3. I. Narin, M. Tuzen, M. Soylak, Aluminum determination in environmental samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry after solid phase extrac-

tion on Amberlite XAD-1180/pyrocatechol violet chelating resin. *Talanta*, 63 (2004) 411–418.

4. J. Smeyers-Verbeke, D. Verbeelen, Determination of aluminum in dialysate concentrates by L'vov platform graphite-furnace atomic-absorption spectrometry. *Anal. Chem.*, 60 (1988) 380–383.

5. S.N. Sukharev, S.V. Delegan-Kokaiko, O.Y. Sukhareva, Atomic-absorption determination of aluminum in waters. *J. Water Chem. Technol.*, 32 (2010) 223–226.

6. L. Weijun, P. Shouzhi, J. Duohua, C. Shiqiang, L. Gang, F. Congbin, Fluorescent probes for Al(III) and Cr(III) based on a photochromic diarylethene bearing a fluorescent rhodamine unit. *Microchim. Acta*, 174 (2011) 329–336.

7. C.A. Blanco, D. Sancho, I. Caballero, Aluminum content in beers and silicon sequestering effects. *Food Res. Int.*, 43 (2010) 2432–2436.

8. A. Shahryar, B. Atusa, F. Abbas F, Quantification of subnanomolar levels of aluminum by adsorptive stripping voltammetry using rubeanic acid as a selective chelating agent. *Electroanalysis*, 22 (2010) 1889–1893.

9. A.M. Beltagi, M.M. Ghoneim, Simultaneous determination of trace aluminum (III), copper (II) and cadmium (II) in water samples by square-wave adsorptive cathodic stripping voltammetry in the presence of oxine. *J. Appl. Electrochem.*, 39 (2009) 627–636.

10. V. Arancibia, C. Muñoz, Determination of aluminium in water samples by adsorptive cathodic stripping voltammetry in the presence of pyrogallol red and a quaternary ammonium salt. *Talanta*, 73 (2007) 546–552.

11. S.D. Thomas, D.E. Davey, D.E. Mulcahy, C.K.W. Chow, Determination of aluminum by adsorptive cathodic stripping voltammetry with 1,2-dihydroxyanthraquinone-3-sulfonic acid (DASA): Effect of thin mercury film electrode. *Electroanalysis*, 18 (2006) 2257–2262.

12. L. Qiong, W. Lirong, X. Danli, L. Guanghan, Determination of trace aluminum in foods by stripping voltammetry. *Food Chem.*, 97 (2006) 176–180.

13. L.M. Carvalho, P.C. do Nascimento, D. Bohrer, Determination of aluminum as contaminant in dialysis concentrates by adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Anal. Chim. Acta*, 546 (2005) 79–84.

14. M. Cámara Vargas, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Simultaneous determination of chromium(VI) and aluminum(III) by adsorptive stripping voltammetry with pyrocatechol violet. *Helv. Chim. Acta*, 86 (2003) 2434–2440.
15. C. Locatelli, Simultaneous determination of aluminum and iron in high salt content matrices by adsorptive stripping voltammetry Application to dialysis fluids. *Electroanalysis*, 15 (2003) 1397–1402.
16. X.L. Wang, S.P. Bi, N. Gan, Aluminum speciation with adsorptive pyrocatechol violet-Al(III) complex by derivative adsorption chronopotentiometry. *Electroanalysis*, 13 (2001) 1279–1286.
17. X.L. Wang, J.P. Lei, S.P. Bi, Determination of the speciation of aluminum(III) in natural waters by adsorption stripping voltammetry and complexation with Al-III-solochrome violet RS. *Anal. Chim. Acta*, 449 (2001) 35–44.
18. S.P. Bi, M.J. Song, D. Xu, Chronopotentiometric determination of aluminum by solochrome violet RS. *Anal. Lett.*, 31 (1998) 1937–1946.
19. A. Lo Balbo, V.C. Dall’Orto, S. Sobral, Linear scan stripping voltammetry at glassy-carbon based thin mercury film electrodes for determination of trace aluminum in dialysis fluids. *Anal. Lett.*, 31 (1998) 2717–2728.
20. N.A. El Maali, Y.M. Temerk, M.S.B. El Aziz, Application of stripping voltammetry at a static mercury drop electrode for the determination of aluminum and iron in Portland cement. *Anal. Chim. Acta*, 353 (1997) 313–318.
21. J. Opydo, Determination of aluminum in tree samples by cathodic adsorptive stripping voltammetry. *Talanta*, 44 (1997) 1081–1086.
22. M. Karpiuk, M. Politowicz, E. Stryjewska, Adsorptive voltammetry for the determination of trace amounts of aluminum in blood-serum derived products. *Fresen. J. Anal. Chem.*, 351 (1995) 693–695.
23. P.H. Deng, J.J. Fei, J. Zhang, Y.L. Feng, Determination of trace aluminum by anodic adsorptive stripping voltammetry using a multi-walled carbon nanotube modified carbon paste electrode. *Anal. Lett.*, 44 (2011) 1521–1535.
24. H.M. Wang, Z.L. Yu, Z.L. Wang, H.J. Hao, Y.M. Chen, P.Y. Wan, Preparation of a preplated bismuth film on Pt electrode and its application for determination of trace aluminum(III) by adsorptive stripping voltammetry. *Electroanalysis*, 23 (2011) 1095–1099.

25. G. Kefala, A. Economou, M. Sofoniou, Determination of trace aluminum by adsorptive stripping voltammetry on a preplated bismuth-film electrode in the presence of cupferron. *Talanta*, 68 (2006) 1013–1019.
26. J. Liu, S.P. Bi, L. Yang, Speciation analysis of aluminium(III) in natural waters and biological fluids by complexing with various catechols followed by differential pulse voltammetry detection. *Analyst*, 127 (2002) 1657–1665.
27. J. Liu, X.L. Wang, G. Chen, Speciation of aluminium(III) in natural waters using differential pulse voltammetry with a Pyrocatechol Violet-modified electrode. *Analyst*, 126 (2001) 1404–1408.
28. F.P. Zhang, S.P. Bi, H.Z. Li, Application of L-dopa as an electroactive ligand for indirect determination of aluminum in biological samples by differential pulse voltammetry. *Electroanalysis*, 13 (2001) 1054–1058.
29. N.A. El-Maali, D. Abd el-Hady, M. Abd el-Hamid, Use of adsorptive stripping voltammetry at the glassy carbon electrode for the simultaneous determination of magnesium(II) and aluminium(III): Application to some industrial samples. *Anal. Chim. Acta*, 417 (2000) 67–75.
30. Q.T. Cai, S.B. Khoo, Determination of trace aluminum by differential pulse adsorptive stripping voltammetry of aluminum(III)-8-hydroxyquinoline complex. *Anal. Chim. Acta*, 276 (1993) 99–108.
31. O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta*, 73 (2007) 202–219.
32. O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Electrochemical Biosensors, in Encyclopedia of Sensors. American Scientific Publishers, USA, (2006).
33. T.K.V. Krawczyk, T. Moszczynska, M. Trojanowicz, Inhibitive determination of mercury and other metal ions by potentiometric urea biosensor. *Biosens. Bioelectron.*, 15 (2000) 681–691.
34. H. Mohammadi, M. El Rhazi, A. Amine, A.M.O. Brett, C.M.A. Brett, Determination of mercury(II) by invertase enzyme inhibition coupled with batch injection analysis. *Analyst*, 127 (2002) 1088–1093.

35. M. Angeletti, G. Lupidi, A.M. Eleuteri, R. Tacconi, E. Fioretti, M. Coletta, Effect of aluminum on the binding properties of α -chymotrypsin. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2 (1997) 320–326.
36. R. Baltic, A. Bougatef, B. Khalid Hayat, N. Nedjar-Arroume, D. Guillochon, P. Dhulster, M. Nasri, Chymotrypsin from the hepatopancreas of cuttlefish (*Sepia officinalis*) with high activity in the hydrolysis of long chain peptide substrates: Purification and biochemical characterisation. *Food Chem.*, 130 (2012) 475–484.
37. P. Ugo, L.M. Moretto, P. Bertoncello, J. Wang, Determination of trace mercury in saltwaters at screen-printed electrodes modified with sumichelate Q10R. *Electroanalysis*, 10 (1998) 1017–1021.
38. M.L. Ren, X.W. Meng, D. Chen, F.Q. Tang, J. Jiao, Using silver nanoparticle to enhance current response of biosensor. *Biosens. Bioelectron.*, 21 (2005) 433–437.
39. W. Fang, H. Shengshui, Electrochemical sensors based on metal and semiconductor nanoparticles. *Microchim. Acta*, 165 (2009) 1–22.
40. O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, A novel method for the anodic stripping voltammetry determination of Sb(III) using silver nanoparticle-modified screen-printed electrodes. *Electrochem. Commun.*, 9 (2007) 820–826.
41. J. Gonzalo-Ruiz, M.A. Alonso-Lomillo, F.J. Muñoz, Screen printed biosensors for glucose determination in grape juice. *Biosens. Bioelectron.*, 22 (2007) 1517–1521.
42. O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, L. Ferreira-Gonçalves, M.J. Arcos-Martínez, Development of urease based amperometric biosensors for the inhibitive determination of Hg(II). *Talanta*, 79 (2009) 1306–1310.
43. O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Anodic stripping voltammetry of antimony using gold nanoparticle-modified carbon screen-printed electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 589 (2007) 255–260.
44. S. Andreescu, L. Barthelmebs, J.L. Marty, Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes: comparative study between three immobilization methods and applications to the detection of organophosphorus insecticides. *Anal. Chim. Acta*, 464 (2002) 171–180.

45. M. Stoytcheva, V. Sharkova, J.P. Magnin, Electrochemical approach in studying the inactivation of immobilized acetylcholinesterase by arsenate(III). *Electroanalysis*, 10 (1998) 994–998.
46. M. Stoytcheva, V. Sharkova, Kinetics of the inhibition of immobilized acetylcholinesterase with Hg(II). *Electroanalysis*, 14 (2002) 1007–1010.

**6. Biosensor for aluminum(III) based on α -chymotrypsin inhibition
using a disposable screen-printed carbon electrode and acetyl-
tyrosine ethyl ester as substrate**

6. Determinación de Al(III) por medio de un biosensor de α -quimotripsina con acetil tirosina etil ester como sustrato

En este capítulo se aborda el desarrollo de un biosensor para la determinación de Al(III) basado en la inhibición de la enzima quimotripsina empleando acetil tirosina etil ester (ATEE) como sustrato, con el objeto de mejorar los límites de detección obtenidos con el biosensor desarrollado en el capítulo anterior y que usa BTEE como sustrato y plantear la posibilidad de aplicarlo a matrices diferentes. En este caso la inmovilización de la enzima se llevó a cabo utilizando un procedimiento de encapsulación-polimerización para obtener la fijación de la enzima usando alcohol polivinílico. El electrodo de trabajo, se había modificado previamente depositando nanopartículas de oro. Este tipo de modificación ha demostrado una mejora de la sensibilidad del método y permite realizar determinaciones precisas y estables, estudiándose también la posibilidad de aplicarlo a muestras de vino blanco. Como sustrato se utilizó acetil tirosina etil ester, cuya señal de oxidación fue afectada por la presencia de iones Al(III) produciéndose un decrecimiento en la corriente amperométrica. Las condiciones de optimización de la señal fueron establecidas y se ha procedido a la validación del biosensor. El método desarrollado se aplicó con éxito a la determinación de Al(III) en una muestra enriquecida de vino blanco. Los resultados obtenidos concuerdan con el valor certificado, obteniéndose un excelente valor del porcentaje de recuperación.

Este trabajo se ha publicado como “Biosensor for aluminum(III) based on α -chymotrypsin inhibition using a disposable screen-printed carbon electrode and acetyl-tyrosine ethyl ester as substrate”, en *Chemical Sciences Journal* (2015) 6: 2. Además se ha presentado en forma de la presentación oral “Desarrollo y validación de un biosensor de α -quimotripsina para la determinación de Al(III) con ATEE como sustrato”, en el XXI Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica, La Serena, Chile 2014

6.1. Introduction

Aluminum is an element of ubiquitous presence being linked to several neurological disorders, such as Alzheimer's disease [1-3]. Moreover, increasing aluminum contamination due to industrial uses and clarification of tap water has augmented the interest on the development of methods for the analysis of this element at trace levels.

The determination of aluminum in aqueous solution has been traditionally performed by electrothermal atomic absorption spectrometry methods using complexing agents, long preconcentration time and sophisticated sample pretreatment. Another technique frequently used in the determination of Al(III) is fluorescence spectroscopy [4], which involves a high cost of analytical instrumentation. Electroanalytical techniques allow to obtain low detection limits, however the high reduction potential of Al(III) limits their applicability. Ion complexation with chelating agents [5-11] has been presented as an interesting alternative to solve this problem. In this way, good results have been obtained with Hg electrodes, however their use is beginning to be reduced because of their toxicity and environmental issues. Amperometric biosensors constitute a good alternative based on their sensitivity, selectivity and environmental friendliness, accounting for their increasing analytical application in many fields [12, 13]. The amperometric biosensor response is influenced by pH, applied potential and substrate concentration, thus the selection of proper conditions may considerably improve its performance and stability.

Enzymatic electrodes performance is linked to an immobilization enzyme method [14] that should not denature the protein nor modify its active site. An immobilization method that achieves this goal is polyvinyl alcohol (PVA) encapsulation-polymerization, which has led to the development of biosensors with high activity and stability [15-17]. On the other hand, the performance of enzymatic electrodes is improved with electrodeposited nanoparticles taking into account its increased use [18-22].

Aluminum accelerates proteolysis of a β -amyloid peptide that initiates neuritic plates in Alzheimer disease [23]. The different effects of aluminum on the binding of syn-

thetic substrates and macromolecular inhibitors to α -chymotrypsin suggest the occurrence of an aluminum-linked conformational change in the enzyme and pH dependence [24]. Other enzymes as calpains, which are Ca dependent, and cerebral cortex cathepsins are also inhibited by Al(III) [25]. Aluminum induces Tau protein phosphorylation and aggregation through a phosphate bridge [26] and also promotes aggregation of β -amyloid protein both present in neuritic plates [27-31]. Their inhibitor effect over neurofilament proteins suggests accumulation inside neuronal space after aluminum administration [32]. Therefore, aluminum could affect proteases enzymatic activity, modifying their enzymatic structure, interfering in the recognition process of macromolecular inhibitors and altering the biochemical processes led by proteases. Thus, the study Al(III) inhibitory effect on α -chymotrypsin using ATEE as enzymatic substrate is of great importance. In this way, aluminum behaves as an inhibitor for α -chymotrypsin enzyme, which is a serine endopeptidase and hydrolyzes ATEE producing acetyl tyrosine which can be oxidized at an electrode surface [33].

Determination of Al(III) through this method offers several advantages, such as high sensitivity and low cost equipment. These advantages can be improved by using screen-printed electrodes (SPEs) due to their disposable character and great versatility. This kind of biosensors offer low detection limits, narrower calibration range, and uses a lower applied potential [34-35], being their disposability character, low cost and environmental friendly very significant. Moreover, this work reports for the first time the $K_m(\text{app})$ (Michaelis Menten apparent constant) value of ATEE with and without Al(III) by means of SPCEs. Finally, the influence of NaCl concentration over noise and signal stability of biosensor electrode was determined.

6.2. Experimental Section

6.2.1. Reagents

In order to prepare hand-made SPCE several inks were used including Electrodag PF-407 A (carbon ink), Electrodag 6037 SS (silver/silver chloride ink) and Electrodag 452 SS (dielectric ink) from Acheson Colloiden (Scheemda, The Netherlands), in a DEK 248 printing machine (DEK, Weymouth, UK) using polyester screens with appropriate stencil designs mounted at 45° to the printer stroke.

TKA Purification System, inverse osmosis, with a UV lamp irradiation system was used to supply purified water needed to prepare all solutions. α -chymotrypsin enzyme (57.24 U/mg) and ATEE were purchased from Sigma, (Steinheim, Germany,), bovine serum albumine (BSA) and PVA fully hydrolyzed were obtained also from Sigma (Steinheim, Germany). Hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate (HAuCl_4) was purchased from Sigma–Aldrich (Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany).

Titrisol solutions were used to prepare stock standard solutions of Al, Fe, Cu, Sn, Zn, Co, Ni, Se Cr, Cd, Pb and Se and were from (Merck, Darmstad, Germany). Solutions of V, Mo, W, Mg were acquired from High Purity Standard (Charleston SC, USA). Ca solution used was obtained from Inorganic Ventures (Lakewood, New Jersey USA). As and Hg solutions were prepared from Atomic Spectroscopy Standards solutions (Perkin Elmer Co, Norwalk, USA).

Aluminum solutions used for spike and wine enrichment were from High Purity Standard (Charleston, SC, USA) confirmed against standard reference material SRM 3101. 0.1 M acetate buffer was prepared from acetic acid and sodium acetate both Suprapur, adjusted at pH 7.8 (Suprapur, Merck, Darmstadt, Germany). 10 mM CaCl_2 from Merck (Darmstad, Germany) and 40 mM NaCl from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands), were used as support electrolyte.

6.2.2. Equipment

Autolab PGSTAT Echo Chemie 128 N with GPS software was used to record electrochemical measurements from (Echo Chemie, Utrech, Netherlands). pH values were adjusted with a pH meter Mettler Toledo SevenMulti, (Schwerzenbach, Switzerland).

Scanning Electronic Microscope S-3700 N Hitachi was used to take SEM pictures.

6.2.3. Screen Printed Electrodes Preparation

Inks used to construct hand-made SPCEs used in the determination of aluminum were placed as successive layers on a polyester substrate. Four different screens with appropriate stencils were used to transfer the required design following the printing

procedure described in previous works [36, 37]. A picture of dimensions of the SPCE used is shown in Figure 6.1.a

6.2.4. Modification of SPCEs with Gold Nanoparticles

Metallic gold nanoparticles (AuNPs) deposits were obtained by direct electrochemical deposition on the SPCE surface using a 0.1 mM solution of HAuCl_4 in 0.5 M H_2SO_4 . The deposition was performed by applying a potential of + 0.18 V during 15 seconds under stirring conditions [38, 39]. Figure 6.1.b shows the described formation of AuNPs on SPCEs.

Signal stability of enzyme α -chymotrypsin electrode was improved with AuNPs. In this way, stability is better compared with enzyme electrode without gold nanoparticles as it is shown in Figure 6.2.

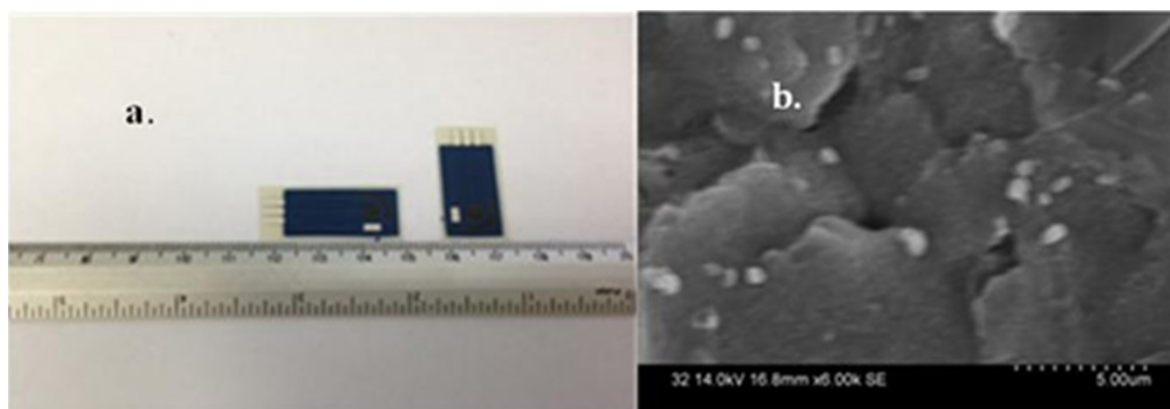


Figure 6.1. a. Dimensions of screen printed electrode system used. b. Scanning electronic microscopy (SEM) picture of gold nanoparticles deposited on SPCE.

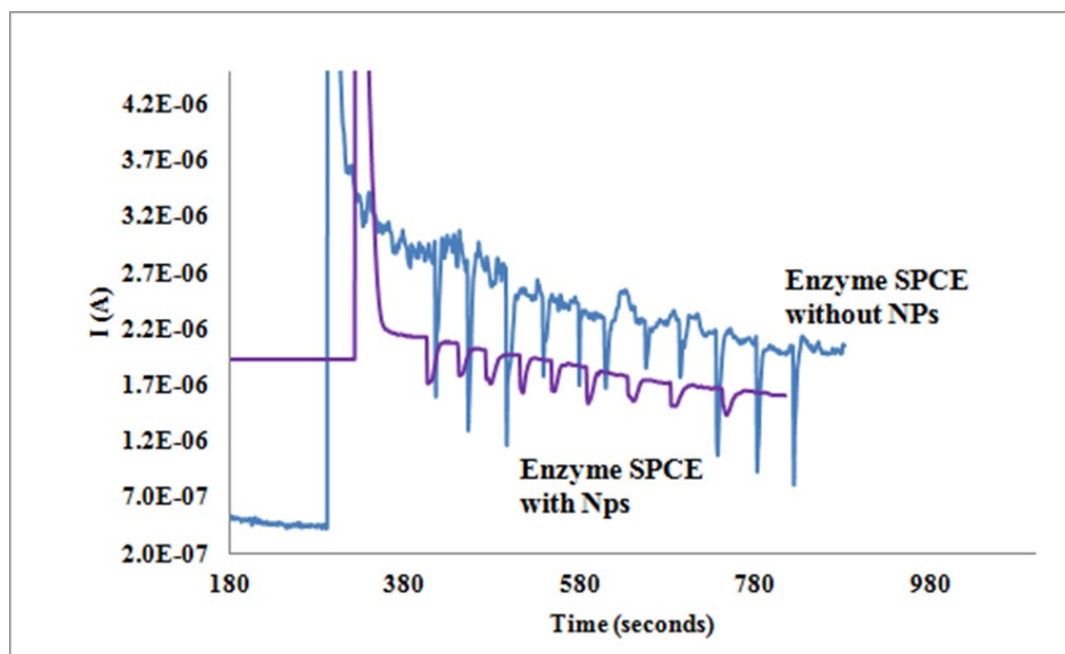


Figure 6.2. Aluminum α -chymotrypsin inhibition curves without and with gold nanoparticles, [ATEE] 2.0×10^{-4} M; NaOAc, pH 7.8, 10 mM CaCl_2 , 40 mM NaCl; $E_{ap} = +0.7$ V vs. Ag/AgCl.

6.2.5. α -chymotrypsin immobilization on AuNPs/SPCEs

The enzyme was immobilized by entrapment with PVA on the surface of AuNPs/SPCEs. The optimum immobilization procedure was reached by mixing 40 μL of a 30 mg mL^{-1} of enzyme solution, 20 μL of 1.7% (w/v) BSA solution, 24 μL of a 5% (w/v) PVA and 20 μL Britton-Robinson buffer solution at pH 7.8 [35]. Then, 10 μL of this mixture were placed on the working electrode surface. Immediately afterwards 3 μL of enzyme solution were placed over the mixture. Once the aliquot of the mixture used to immobilize the enzyme was deposited on the electrode surface it was kept under laboratory ceiling fluorescent lamp (λ 350-750) nm at 9×10^2 lux for 4 h at 24°C in air conditioned system and then stored for 24 hours at 4°C before using and between measurements. These storage conditions allowed biosensors good performance.

6.2.6. Amperometric Determination of Aluminum

The α -chymotrypsin biosensor was placed in an electrochemical cell containing 5.00 mL of acetate buffer solution pH 7.8 with 40 mM NaCl and 10 mM CaCl₂ [40-42]. An adequate potential was then applied and once a steady-state current was established, a defined amount of ATEE substrate was added to the cell. A large oxidation current was observed due to the oxidation of the enzymatic reaction product after the addition of ATEE substrate.

Once a steady-state current was set again, a selected volume of aluminum stock solution was consecutively added and a calibration curve was constructed. The addition of aluminum resulted in a decrease of the amperometric response proportional to the amount of metal added.

Enzyme electrodes were conditioned in the acetate buffer solution pH 7.8 between each calibration set.

6.3. Results and Discussion

The α -chymotrypsin/AuNPs/SPCE biosensor produces an amperometric signal, which is quantitatively related to the concentration of ATEE as shown in Figure 6.3. The ATEE oxidation signal is considerably affected by addition of Al(III) producing a decrease in its amperometric response which relates to Al(III) concentration.

In this way, Al(III) inhibition action was quantitatively evaluated by determining the difference between the steady-stated current obtained for ATEE in absence of Al(III) (I_0) and the steady-state current in the presence of Al(III) (I). The parameter $\Delta I(I_0-I)$ presents a linear dependence in the Al(III) concentration range from 3.6 μ M to 36 μ M.

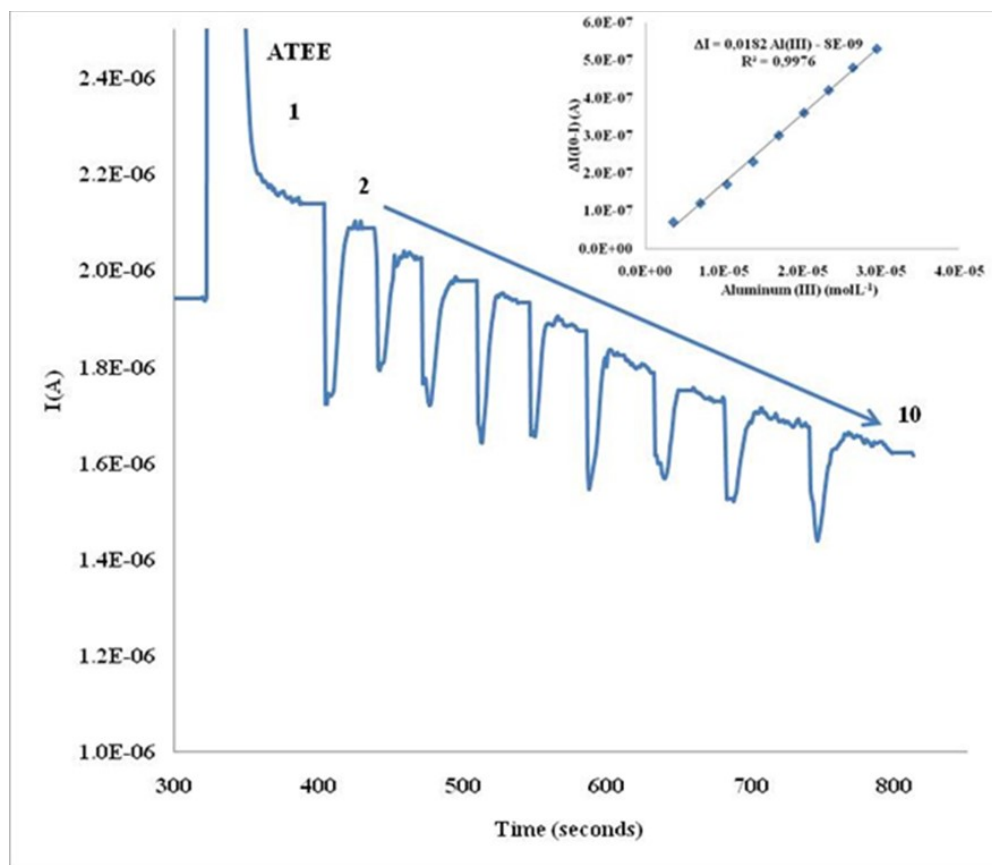


Figure 6.3. Amperometric recording for addition of 100 μL of ATEE 0.010 M (1) and consecutive aliquots of 50 μL Al (III) 3.70×10^{-4} M (2–10) to 5.00 mL buffer solution, under the optimal conditions, supporting electrolyte NaOAc pH 7.8, 10 mM CaCl_2 , 40 mM NaCl; $E_{\text{ap}} = +0.7$ V vs. Ag/AgCl). Inset: calibration curve corresponding to this amperogram.

6.3.1. Selection of experimental conditions

Aluminum inhibition effect was quantitatively evaluated by determining the difference between the ATEE steady-state current in the absence of aluminum (I_0) and the steady-state current in the presence of aluminum (I). The parameter ΔI ($I_0 - I$) depends on ATEE concentration, applied potential (E_{ap}) and pH of the buffer solution. Different experiments were carried out in order to optimize these variables.

First, the effect of applied potential in the chronoamperometric response of the developed biosensor was studied. The inhibitive signal of Al(III) was analyzed using

operational potentials ranging from +0.3 to +0.8 V at pH 6.8 and 7.8, recommended for the α -chymotrypsin enzyme, as it is shown in Figure 6.4, parts **a** and **b**.

A high quality amperometric signal at +0.7 V was obtained, thus, this potential was selected as the best value for the determination of aluminum.

The influence of pH was also studied in the range from 5.0 to 8.0. The results obtained are shown in Figure 6.4, part **c**, obtaining a value of 7.8 as the most adequate for Al(III) determination, taking into account the better stability conditions for the enzymatic electrode. Higher pH values produce enzyme instability and aluminum precipitation.

Finally, the influence of the concentration of ATEE was also studied in the range from 0.10 mM up to 0.30 mM. As it is shown in Figure 6.4. part **d**, the current increases in linear dependence with ATEE concentration, showing a tendency to substrate saturation.

A concentration of 0.20 mM ATEE in cell was then found to give a high inhibition response of aluminum, while upper concentrations were noisy.

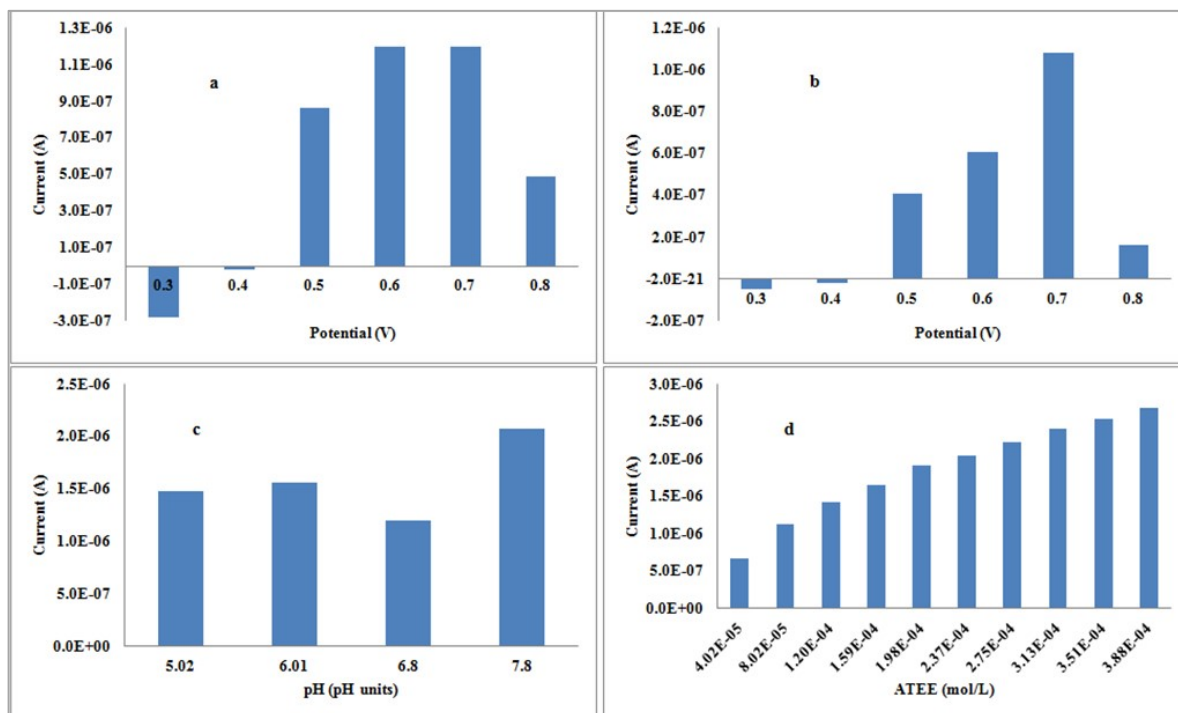


Figure 6.4. (a) Current response of ATEE with potential, pH 6.8 NaOAc, 10 mM CaCl₂, 40 mM NaCl; (b) Current response of ATEE with potential, pH 7.8 NaOAc, 10 mM CaCl₂, 40 mM NaCl; (c) Current response of ATEE with pH in 10 mM CaCl₂ and 40 mM NaCl, E_{ap} = +0.7 V vs. Ag/AgCl; (d) Current response of ATEE concentration pH 7.8 NaOAc, 10 mM CaCl₂, 40 mM NaCl; E_{ap} = +0.7 V vs. Ag/AgCl.

6.3.2. Aluminum inhibition behavior

Experiments performed with this biosensor showed that addition of CaCl₂ and NaCl improved stability of calibration curve. Therefore, their effect on the stability of the biosensor was investigated following the method of Lineweaver-Burk. Measurements were performed using NaCl concentrations ranging from 10 mM to 80 mM in CaCl₂ 10 mM. Considering apparent Michaelis Menten (K_m(app)) values, signal stability, linearity and sensitivity of plots, concentrations of 10 mM CaCl₂ and 40 mM NaCl were selected as the most suitable for the inhibitive determination of Al(III). Figure 6.5 shows Lineweaver-Burk plots for NaCl increasing concentrations. The results obtained indicate that slope and therefore K_m(app) values increase with NaCl concentration.

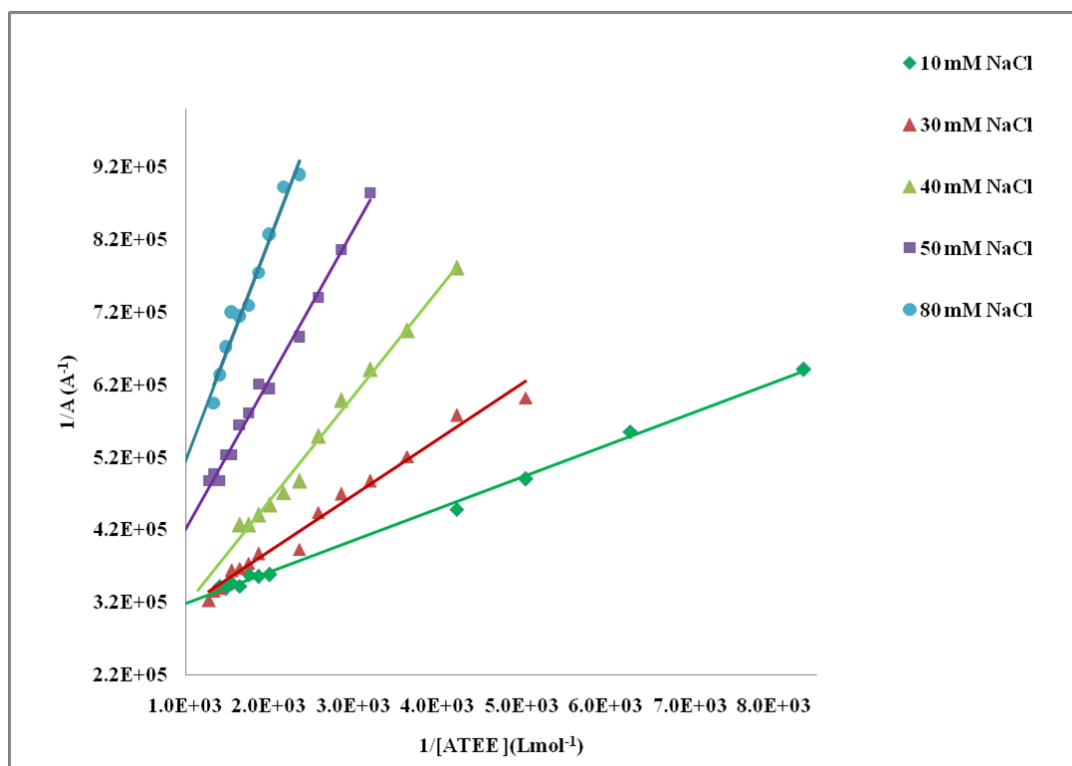


Figure 6.5. Lineweaver-Burk plot for NaCl increasing concentration, pH 7.8 NaOAc, 10 mM CaCl₂, E_{ap} = +0.7 V vs. Ag/AgCl.

Once NaCl concentration was selected, at 40 mM, the inhibitory effect of Al(III) ions on the response of the α -chymotrypsin biosensor was investigated following the method of Lineweaver-Burk in presence of increasing amounts of inhibitor. The K_m value $(1.17 \pm 0.06) \times 10^{-4}$ found without Al(III) was lower than the one obtained in presence of 100 μ L of aluminum 3.70×10^{-4} M $(2.41 \pm 0.07) \times 10^{-4}$ and 400 μ L of aluminum 3.70×10^{-4} M $(4.52 \pm 0.31) \times 10^{-4}$. Al(III) presence increases slope and K_m app value and diminishes enzyme-substrate affinity. As it is shown in Figure 6.6 the studied process resembles a competitive inhibition.

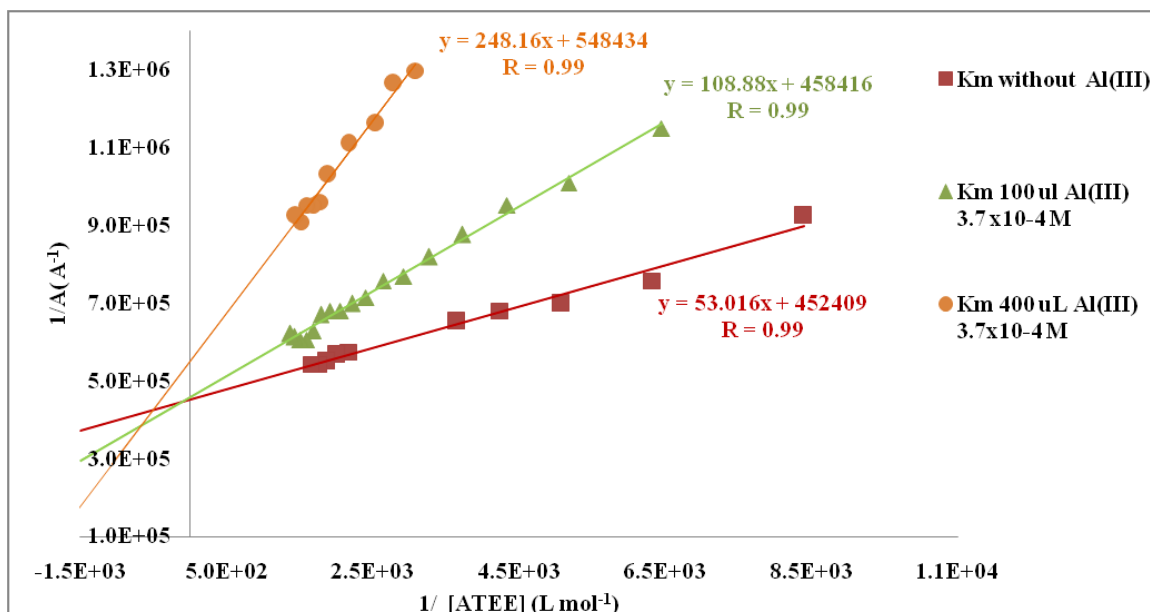


Figure 6.6. Lineweaver-Burk plot showing competitive inhibition for α -chymotrypsin/ AuNPs/SPCE biosensor without and with Al(III), pH 7.8 NaOAc, 10 mM CaCl₂, 40 mM NaCl; E_{ap} = +0.7 V vs. Ag/AgCl.

6.3.3. Calibration and detection limit

As it has been mentioned above, Figure 6.3. showed a linear dependence between ΔI and Al(III) concentration in a concentration range from 3.6 μM to 36 μM . The regression parameters obtained for the calibration curve were $\Delta I = 0.0182 [Al(III)] - 8.0 \times 10^{-9}$, ($R^2 = 0.9976$). Figures of merit such as precision and detection limit were evaluated by means of calibration curves obtained at optimum conditions. Standard deviation (Sy/x) of seven calibration curves was used to calculate limit of detection, giving a value of $(1.5 \pm 0.2) \mu M$ for this parameter under the optimum working conditions, using $3Sy/x$ criteria. In a similar manner limit of quantification was calculated using $10Sy/x$ criteria giving a value of $(4.9 \pm 0.5) \mu M$. In Table 6.1 are shown calibration parameters obtained in order to estimate LOD and LOQ of the method.

Table 6.1. Parameters of calibration curves performed in order to estimate detection and quantification limit of the method.

Calibration	LOD (M)	LOQ (M)	Slope [A/M]	Intercept (A)	Sy/x	R ²
I	1.5×10^{-6}	5.1×10^{-6}	0.02327	6.14×10^{-8}	1.0×10^{-8}	0.998
II	1.6×10^{-6}	4.3×10^{-6}	0.01535	6.64×10^{-9}	8.3×10^{-9}	0.997
III	1.7×10^{-6}	5.4×10^{-6}	0.02311	8.75×10^{-8}	1.3×10^{-8}	0.997
IV	1.3×10^{-6}	5.6×10^{-6}	0.02279	3.52×10^{-8}	9.6×10^{-9}	0.998
V	1.2×10^{-6}	4.2×10^{-6}	0.01844	1.74×10^{-7}	7.5×10^{-9}	0.998
VI	1.5×10^{-6}	5.0×10^{-6}	0.02042	8.54×10^{-8}	1.0×10^{-8}	0.998
VII	1.4×10^{-6}	4.8×10^{-6}	0.02454	1.21×10^{-7}	1.2×10^{-8}	0.997
Mean	1.5×10^{-6}	4.9×10^{-6}				
SD	1.7×10^{-7}	5.1×10^{-7}				
RSD	11.7	10.5				

6.3.4. Precision

This parameter was calculated in terms of repeatability and reproducibility. Repeatability was carried out using the same electrode surface. In this way, several successive calibrations for Al(III) were tested. The electrodes were conditioned for 5 minutes in a buffer solution, pH 7.8, between experiments. The relative standard deviation (RSD) obtained for the slopes of the three curves with the same electrode was 8.2%. Likewise, the reproducibility of the amperometric signal was checked using the slopes of five regressions carried out with different electrode surfaces. The RSD reproducibility value obtained was 6.6%.

These results suggest that the fabrication procedure of the α -chymotrypsin/AuNPs/SPCEs biosensors is reliable and allows reproducible electroanalytical responses to be obtained with different electrodes constructed using the method described in this work. Calibration parameters obtained to assess the repeatability and reproducibility of method are shown in Table 6.2 and Table 6.3 respectively.

Table 6.2. Calibration parameters obtained in order to assess the repeatability of α -chymotrypsin/NPs/ATEE biosensor (Working potential, 0.7 V vs. a Ag/AgCl SPE; pH 7.8).

Calibration	Slope [A/M]	Intercept (A)	Sy/x	R ²
I	0.01671	6.53×10^{-8}	2.0×10^{-8}	0.990
II	0.01565	9.15×10^{-8}	1.4×10^{-8}	0.990
III	0.01419	3.74×10^{-8}	1.5×10^{-8}	0.990
Mean	0.01552			
SD	1.3×10^{-3}			
RSD	8.2			

Table 6.3. Calibration parameters obtained in order to assess the reproducibility of α -chymotrypsin/NPs/ATEE biosensor (Working potential, 0.7 V vs. Ag/AgCl SPE; pH 7.8).

Calibration	Slope [A/M]	Intercept (A)	Sy/x	R ²
I	0.02327	6.14×10^{-8}	1.2×10^{-8}	0.998
II	0.02311	8.77×10^{-8}	1.5×10^{-8}	0.997
III	0.02042	8.54×10^{-8}	1.0×10^{-8}	0.998
IV	0.02279	3.52×10^{-8}	9.6×10^{-9}	0.998
V	0.02454	1.21×10^{-7}	1.2×10^{-8}	0.997
Mean	0.02282			
SD	1.5×10^{-3}			
RSD	6.6			

6.3.5. Accuracy

The accuracy of the developed method was evaluated by means of the analysis of a standard reference material (SRM) High Purity Standards solution (Lot Number 1121015, (1000 ± 3) mg/L, confirmed against reference material SRM 3101 (lot number 060502), spiked in white wine sample, using the standard addition method.

Results are shown in Table 6.6. The aluminum average concentration quantified by the developed procedure, (1025 ± 45) mg/L ($n = 4$; $\alpha = 0.05$), matches the certified value of the standard reference material in agreement with aluminum stock concentration, and mean deviation. Calibration parameters of calibrations realized in order to estimate recovery of SRM are shown in Table 6.4. Recovery of SRM was 102.6% with RSD 4.4% (Table 6.5). These results suggest that the developed biosensor method with α -chymotrypsin enzyme is accurate and reliable for aluminum determination in white wine sample.

Table 6.4. Parameters of calibration curves performed in order to estimate Al(III) SRM ($1000 \text{ mg/L} \pm 3 \text{ mg/L}$) Al(III) spiked to white wine sample

Calibration	Slope [A/M]	Intercept (A)	Sy/x	R ²
I	0.02454	1.17×10^{-8}	1.2×10^{-8}	0.997
II	0.02153	1.29×10^{-7}	1.0×10^{-8}	0.997
III	0.01241	1.44×10^{-7}	1.2×10^{-8}	0.990
IV	0.00946	8.13×10^{-8}	3.9×10^{-9}	0.998

Table 6.5. Recovery of Al(III) SRM (1000 ± 3) mg/L spiked to white wine sample.

	Added (M)	Found (M)	Recovery %	DF (5200/100)	Al(III) mg/L	DF (2/1)	DF (100/1)
I	3.558×10^{-6}	3.843×10^{-6}	108.0	1.998×10^{-4}	5.3957	10.791	1079
II	3.558×10^{-6}	3.453×10^{-6}	97.1	1.796×10^{-4}	4.8486	9.697	970
III	3.558×10^{-6}	3.673×10^{-6}	103.2	1.910×10^{-4}	5.1573	10.315	1031
IV	3.558×10^{-6}	3.635×10^{-6}	102.2	1.890×10^{-4}	5.1042	10.208	1021
		Mean	102.6			Mean	1025
		SD	4.5			SD	45
		RSD	4.4			RSD	4.0

6.3.6. Interferences

Interference study was performed comparing the percentage of inhibition showed by the developed α -chymotrypsin based biosensor in the presence of aluminum and other foreign ions. Three concentration levels were tested, namely 10^{-3} M; 10^{-4} M and 10^{-6} M. As it can be seen in Figure 6.7, the highest interference effect was found for As(V); Cd(II) and Mo(VI) for the lowest level of concentration tested, but toxic ions should not be naturally present in wine. Due to some proteases enzymes are activated by Ca(II), this one is not a real interference, neither common ions as Mg(II) and Fe(III). At level of 10^{-4} M most interfering ions are As(V); Se(IV); V(V); Mo(VI). At level of 10^{-3} M most interfering ions are Se(IV); V(V); Mo(VI) as is shown in Figure 6.8.

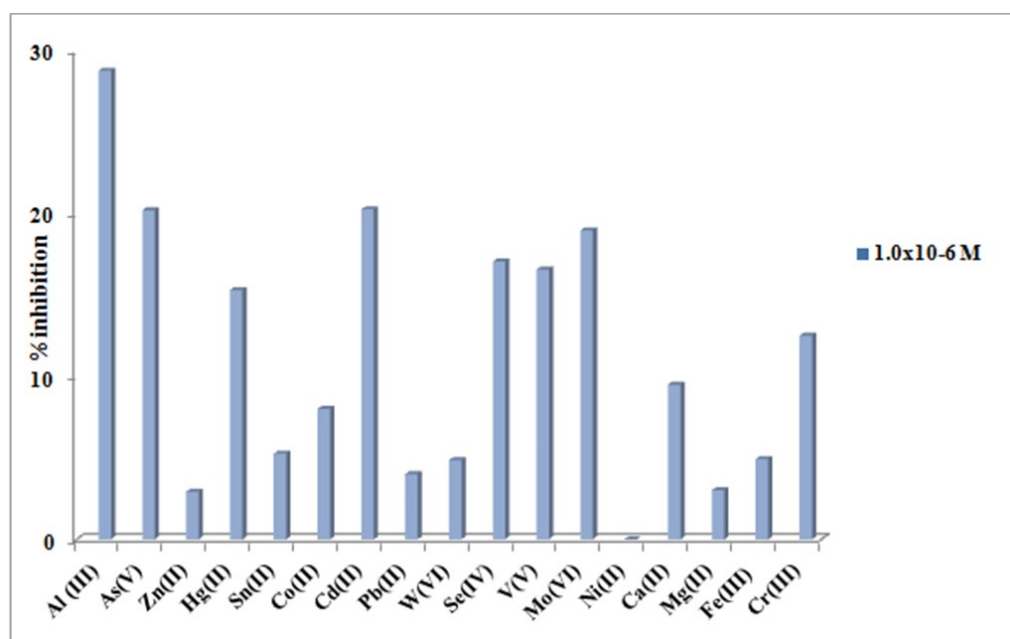


Figure 6.7. Inhibition percentage of current of α -chymotrypsin/AuNPs/SPCE in presence of: Al(III), As(V), Zn(II), Hg(II), Sn(II), Co(II), Cd(II), Pb(II), W(VI), Se(IV), V(V), Mo(VI), Ni(II), Ca(II), Mg(II), Fe(III), Cr(III), at 10^{-6} M; [ATEE] 2.0×10^{-4} M; pH 7.8 NaOAc, 10 mM CaCl₂, 40 mM NaCl, E_{ap} = +0.7 V vs. Ag/AgCl.

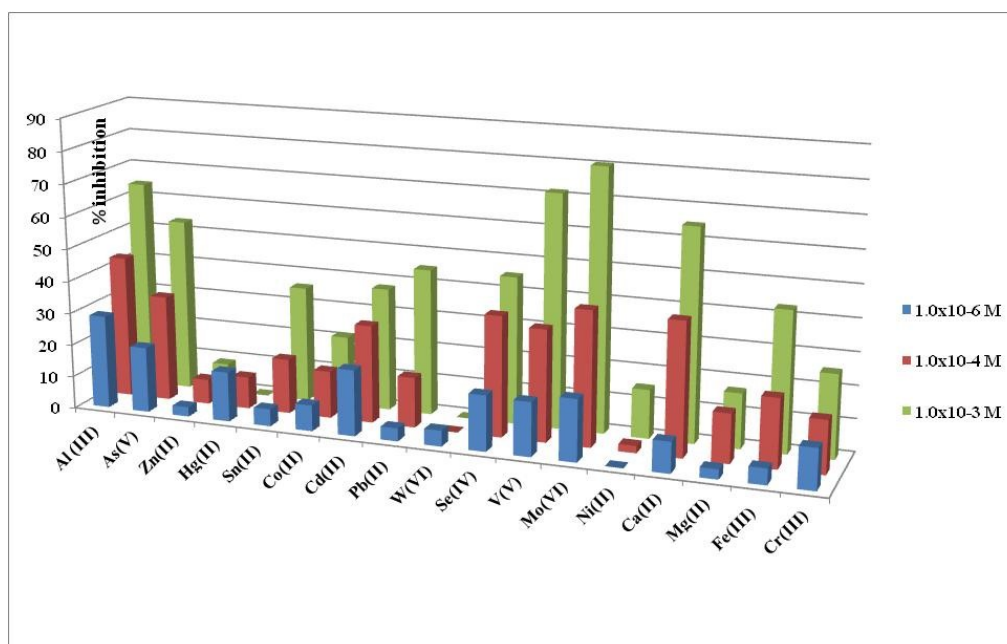


Figure 6.8. Effect of interfering ions on α -chymotrypsin/AuNPs/SPCE biosensor from 1.0×10^{-6} M to 1.0×10^{-3} M; [ATEE] 2.0×10^{-4} M; pH 7.8 NaOAc, 10 mM CaCl_2 , 40 mM NaCl, $E_{ap} = +0.7$ V vs. g/AgCl.

6.4. Conclusions

The development of a novel biosensor based on the inhibition of α -chymotrypsin enzyme using AuNPs/SPCEs allows the amperometric determination of aluminum. The biosensor precision was studied in terms of the RSD of the slopes of several calibrations resulting in a reproducibility value of 6.6%. The method developed in this work presents several advantages, including lower detection limit, 1.5 μM , than other previous described ones [34-35].

The cross linking and entrapment method with PVA allowed immobilizing the enzyme over the AuNPs/SPCE electrode surface. The optimum conditions for the best amperometric response of ATEE were at working potential of +0.7 V and a pH value of 7.8. In addition, the presence of Ca(II) and NaCl produce a stabilizing effect over the amperometric signal; in this way concentrations of 10 mM of Ca(II) and 40 mM of NaCl resulted to be optimal considering sensitivity, stability and $K_m(\text{app})$ values. The Lineweaver-Burk plots obtained in the presence of Al(III) showed competitive

inhibition and the performance of the developed biosensor was evaluated through its figures of merit that were adequate to quantify Al(III) at low concentration level. Moreover, the analytical performance of the developed biosensor was demonstrated by its application to the analysis of spiked white wine samples with a High-Purity Standards stock solution. The recovery value (1025 ± 45) mg/L obtained agreed with the certified reported aluminum SRM value of (1000 ± 3) mg/L. Finally, the main interferences at low level concentration included As(V), Cd(II) and Mo(VI).

Overall, the ATEE substrate was suitable for quantitative determination of aluminum using a SPE modified with AuNPs and α -chymotrypsin enzyme. The developed method presents a lower detection limit and uses a lower potential than other enzymatic methods for the analysis of Al(III).

6.5. References

1. P. Zatta, D. Drago, S. Bolognin, S.L. Sensi, Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. *Trends Pharmacol. Sci.*, 30 (2009) 346–355.
2. C. Exley, The coordination chemistry of aluminum in neurodegenerative disease. *Coord. Chem. Rev.*, 256 (2012) 2142–2146.
3. M.E. Percy, T.P. Kruck, A.I. Pogue, W.J. Lukiw, Towards the prevention of potential aluminum toxic effects and an effective treatment for Alzheimer's disease. *J. Inorg. Biochem.*, 105 (2011) 1505–1512.
4. L. Weijun, P. Shouzhi, J. Duohua, C. Shiqiang, L. Gang, F. Congbin, Fluorescent probes for Al(III) and Cr(III) based on a photochromic diarylethene bearing a fluorescent rhodamine unit. *Microchim. Acta* 174 (2011) 329–336.
5. R. Romero, J. Tahan, A. Moronta, Two alternative sample mineralization procedures to permit subsequent polarographic determination of total soluble aluminum in hemodialysis water. *Anal. Chim. Acta*, 257 (1992) 147–154.
6. M. Cámara, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Simultaneous determination of chromium(VI) and aluminum(III) by adsorptive stripping voltammetry with pyrocatechol violet. *Helv. Chim. Acta*, 86 (2003) 2434–2440.

7. X. Wang, J. Lei, S. Bi, N. Gan, Z. Wei, Determination of the speciation of aluminum(III) in natural waters by adsorption stripping voltammetry and complexation with Al(III)-solochrome violet RS. *Anal. Chim. Acta*, 449 (2001) 35–44.
8. V. Arancibia, C. Muñoz, Determination of aluminium in water samples by adsorptive cathodic stripping voltammetry in the presence of pyrogallol red and a quaternary ammonium salt. *Talanta*, 73 (2007) 546–552.
9. L. Qiong, W. Lirong, X. Danli, L. Guanghan, Determination of trace aluminum in foods by stripping voltammetry. *Food Chem.*, 97 (2006) 176–180.
10. A. Shahrya, B. Atusa, F. Abbas, Quantification of subnanomolar levels of aluminum by adsorptive stripping voltammetry using rubeanic acid as a selective chelating agent. *Electroanalysis*, 22 (2010) 1889–1893.
11. A. Beltagi, M. Ghoneim, Simultaneous determination of trace aluminum (III), copper (II) and cadmium(II) in water samples by square-wave adsorptive cathodic stripping voltammetry in the presence of oxine. *J. Appl. Electrochem.*, 39 (2009) 627–636.
12. O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta*, 73 (2007) 202–219.
13. M. Albareda, A. Merkoçi, S. Alegret, Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 69 (2000) 153–163.
14. A. Sassolas, L.J. Blum, B.D. Leca-Bouvier, Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol. Adv.*, 30 (2012) 489–511.
15. T. Ulich, M. Ulbricht, G. Tomaschewski, Immobilization of enzymes in photochemically cross-linked polyvinyl alcohol. *Enzyme Microb. Tech.* 19 (1996) 124–131.
16. J. Gohil, A. Bhattacharyya, P. Ray, Studies on the crosslinking of poly(vinyl alcohol). *J. Polym. Res.*, 13 (2006) 161–169.
17. P. Wang, M.V. Sergeeva, L. Lim, J.S. Dordick, Biocatalytic plastics as active and stable materials for biotransformations. *Nat. Biotechnol.* 15 (1997) 789–793.

18. D. Du, J. Ding, J. Cai, J. Zhang, L. Liu, In situ electrodeposited nanoparticles for facilitating electron transfer across self-assembled monolayers in biosensor design. *Talanta*, 74 (2008) 1337–1343.
19. Z. Wang, J. Zhao, F. Li, D. Gao, B. Xing, Adsorption and inhibition of acetylcholinesterase by different nanoparticles. *Chemosphere*, 77 (2009) 67–73.
20. O. Shulga, J. Kirchhoff, An acetylcholinesterase enzyme electrode stabilized by an electrodeposited gold nanoparticle layer. *Electrochem. Commun.*, 9 (2007) 935–940.
21. M.A. Alonso-Lomillo, C. Yardimci, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, CYP450 2B4 covalently attached to carbon and gold screen printed electrodes by diazonium salt and thiols monolayers. *Anal. Chim. Acta*, 633 (2009) 51–56.
22. Z. Xu, X. Chen, X. Qu, J. Jia, S. Dong, Single-wall carbon nanotube-based voltammetric sensor and biosensor. *Biosens. Bioelectron.*, 20 (2004) 579–584.
23. S. Yumoto, S. Kakimi, A. Ohsaki, A. Ishikawa, Demonstration of aluminum in amyloid fibers in the cores of senile plaques in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J. Inorg. Biochem.*, 103 (2009) 1579–1584.
24. M. Angeletti, G. Lupidi, A.M. Eleuteri, R. Tacconi, E. Fioretti, M. Coletta, Effect of aluminum on the binding properties of α -chymotrypsin. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2 (1997) 320–326.
25. G. Lupidi, M. Angeletti; A.M. Eleuteri, E. Fioretti, S. Marini, M. Gioia, M. Coletta. Aluminum modulation of proteolytic activities. *Coord. Chem. Rev.*, 228 (2002) 263–269.
26. P. Zatta, Aluminum binds to the hyperphosphorylated tau in Alzheimer's disease: a hypothesis. *Med. Hypotheses*. 44: (1995) 169–172.
27. T. Sakamoto, H. Saito, K. Ishii, H. Takahashi, S. Tanabe S.Y. Ogasawara, Aluminum inhibits proteolytic degradation of amyloid β peptide by cathepsin D: a potential link between aluminum accumulation and neuritic plaque deposition. *FEBS Lett.*, 580 (2006) 6543–6549.
28. S. Bolognin, P. Zatta, E. Lorenzetto, M.T. Valenti, M. Buffelli, β -Amyloid-aluminum complex alters cytoskeletal stability and increases ROS production in cortical neurons. *Neurochem. Int.*, 62 (2013) 566–574.

29. F. Ricchelli, D. Drago, B. Filippi, G. Tognon, P. Zatta, Aluminum-triggered structural modifications and aggregation of beta-amyloids. *Cell Mol. Life Sci.*, 62 (2005) 1724–1733.
30. S. Bolognin, L. Messori, D. Drago, C. Gabbiani, L. Cendron, P. Zatta, Aluminum, copper, iron and zinc differentially alter amyloid-A β (1-42) aggregation and toxicity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 43 (2011) 877–885.
31. D. Drago, M. Bettella, S. Bolognin, L. Cendron, J. Scancar, R. Milacic, F. Ricchelli, A. Cassini, L. Messori, G. Tognon, P. Zatta, Potential pathogenic role of beta-amyloid(1-42)-aluminum complex in Alzheimer's disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 40 (2008) 731–746.
32. J. Kushkuley, S. Metkar, W.K. Chan, S. Lee, T.B. Shea, Aluminum induces neurofilament aggregation by stabilizing cross-bridging of phosphorylated c-terminal sidearms. *Brain Res.*, 1322 (2010) 118–123.
33. N.O. Kozlova, I.B. Bruskovskaya, N.S. Melik-Nubarov, A.A. Yaroslavov, V.A. Kabanov, Catalytic properties and conformation of hydrophobized α -chymotrypsin incorporated into a bilayer lipid membrane. *FEBS Lett.*, 461 (1999) 141–144.
34. M. Barquero-Quirós, O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, Acetylcholinesterase inhibition-based biosensor for aluminum(III) chronoamperometric determination in aqueous media. *Sensors Basel*, 14 (2014) 8203–8216.
35. M. Barquero-Quirós, O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, Biosensor for aluminium(III) based on its inhibition of α -chymotrypsin immobilized on a screen-printed carbon electrode modified with gold nanoparticles. *Microchim. Acta*, 179 (2012) 65–70.
36. O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, A novel method for the anodic stripping voltammetry determination of Sb(III) using silver nanoparticle-modified screen-printed electrodes. *Electrochem. Commun.*, 9 (2007) 820–826.
37. J. Gonzalo-Ruiz, M.A. Alonso-Lomillo, J. Muñoz, Screen-printed biosensors for glucose determination in grape juice. *Biosens. Bioelectron.*, 22 (2007) 1517–1521.

38. X. Dai, O. Nekrassova, M.E. Hyde, R.G. Compton, Anodic stripping voltammetry of arsenic(III) using gold nanoparticle-modified electrodes. *Anal. Chem.*, 76 (2004) 5924–5929.
39. O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Anodic stripping voltammetry of antimony using gold nanoparticle-modified carbon screen-printed electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 589 (2007) 255–260.
40. F. Sousa, S. Jus, A. Erbel, V. Kokol, A. Cavaco, G.M. Gubitza, A novel metalloprotease from *Bacillus cereus* for protein fibre processing. *Enzyme Microb. Tech.*, 40 (2007) 1772–1781.
41. F.J. Castillo, R. Pacheco, L.F. García, M.A. Navarrete, M. Félix, Purification and biochemical characterization of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caeruleus*). *Food Chem.*, 99 (2006) 252–259.
42. J. Hong, P. Gong, D. Xu, L. Dong, S. Yao, Stabilization of α -chymotrypsin by covalent immobilization on amine-functionalized superparamagnetic nanogel. *J. Biotechnol.*, 128 (2007) 597–605.

7. Acetylcholinesterase Inhibition-Based Biosensor for Aluminum(III) Chronoamperometric Determination

7. Determinación de Al(III) por medio de un biosensor de acetilcolinesterasa con yoduro de acetil tiocolina como sustrato

Con el objeto de mejorar el límite de detección obtenido con biosensores basados en la utilización de la quimiotripsina desarrollados en los capítulos anteriores, en éste se propone la puesta a punto de un biosensor para la determinación de Al(III) basado en la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa.

En este caso la inmovilización de la enzima se llevó a cabo utilizando un enlace covalente para mejorar la fijación de la enzima usando una carbodiimida. El electrodo de trabajo se había modificado previamente depositando nanopartículas de oro. Este tipo de modificación conlleva una mejora de la sensibilidad del método y permite realizar determinaciones precisas y estables, estudiándose también la viabilidad de llevarlo a cabo en muestras de agua potable. Como sustrato se utilizó yoduro de acetiltiocolina (ATI), cuya señal de oxidación fue afectada por la presencia de iones Al(III) produciéndose un decrecimiento en la corriente amperométrica. Las condiciones experimentales de la señal amperométrica fueron optimizadas y se procedió a la validación del biosensor.

El método desarrollado fue exitosamente aplicado a la determinación of Al(III) en muestras sintéticas y en agua potable enriquecida con material de referencia. Las recuperaciones en ambos casos están acorde con el valor reportado por el material certificado.

Este trabajo se ha publicado como “Acetylcholinesterase inhibition based biosensor for aluminum(III) chronoamperometric determination in aqueous media”, en *Sensors* (2014) 14: 8203-8216. Además se ha presentado en forma de un poster “Desarrollo y validación de un biosensor de acetilcolinesterasa para la determinación de Al(III) por medio de la inhibición de yoduro de acetiltiocolina”, en el XXI Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica, La Serena, Chile, 2014.

7.1. Introduction

Aluminum determination at trace level is of great importance due to the possible human and environmental toxic effects of this element. In fact, it has been demonstrated that low levels of aluminum in human organism, are related with Alzheimer disease [1–3].

Traditionally, the determination of aluminum at low concentration levels in environmental and biological samples has been carried out by means of electrothermal absorption spectrometry [4–6] and fluorescence spectroscopy [7]. However these methods have often failed in routine analysis. Electrochemical techniques, such as voltammetry, have been also employed using different kinds of electrodes, being the hanging mercury drop electrode (HMDE) the most often used one in the analysis of Al(III). The direct voltammetric determination of Al(III) with a HMDE is limited by the difficulty of reduction of Al(III) species and the concurrent reduction of hydrogen ions from aqueous acid solution at mercury electrodes. This difficulty is usually overcome by complexation of Al(III) with many different chelating agents, which electrochemical reduction takes place at lower potentials than free Al(III) ions and other electrochemical techniques [8–30]. Despite of the good results obtained with mercury electrodes, the use of HMDE is nowadays being reduced due to its environmental pollution problems.

Screen-printed electrodes (SPEs) have demonstrated numerous advantages as transducers in electrochemical biosensors [31]. These advantages include ease of modification with different compounds such as nanoparticles (NPs) in order to create a more favorable electrode surface for interaction with enzymes. This kind of modification generally produces a more stable biosensor for the determination of different analytes [32, 33]. Therefore, nowadays the use of NPs as surface electrode modifiers is increasing showing these modified electrodes great electrocatalytic activity and therefore high analytical response [34]. Actually, screen-printed modified electrodes with enzymes and gold NPs (AuNPs) are foreseeing as selective and sensitive methods to analytical quantification of a broad variety of environmental contaminants [35].

The determination of aluminum has been also carried using an enzymatic biosensor based on the inhibitory effect of this element on the enzyme α -chymotrypsin [36]. In this way, the fact, that the acetylcholinesterase (AChE) enzyme is also usually inhibited by different compounds such as organophosphate pesticides, metals and non-metals [37–40] has led to develop a new AChE based biosensor for the analysis of aluminum.

In this work, screen-printed carbon electrodes (SPCEs) were modified with AuNPs (AuNPs/SPCEs). AChE was immobilized on the surface of the developed AuNPs/SPCEs. The chronoamperometric response of these AChE/AuNPs/SPCE biosensors towards ATI enzyme substrate was affected by the presence of Al(III) ions due to their inhibitor effect on the activity of the enzyme.

7.2. Experimental Section

7.2.1. Reagents

Several inks were used in the fabrication of SPEs, namely Electrodag PF-407 A (carbon ink), Electrodag 6037 SS (silver/silver chloride ink) and Electrodag 452 SS (dielectric ink) supplied by Acheson Colloiden (Scheemda, The Netherlands). Hand-made SPEs were produced on a DEK 248 printing machine (DEK, Weymouth, UK) using polyester screens with appropriate stencil designs mounted at 45° to the printer stroke. All solutions were prepared with purified water supplied by TKA Purification System, inverse osmosis, with a UV lamp irradiation system. AChE enzyme (200–1000 U/mg) and N-cyclohexyl-N-2-morpholinoethylcarbo-diimide methyl *p*-toluene sulfonate were purchased from Sigma (Steinheim, Germany) and ATI was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Bovine serum albumine (BSA) and hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate (HAuCl₄) were obtained from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Stock standard solutions of Al, Fe, Cu, Sn, Zn, Co, Ni, Se, Cr, Cd, Pb and Se were prepared from Titrisol solutions (Merck, Darmstadt, Germany). Solutions of V, Mo, W and Mg were acquired from High Purity Standard (Charleston, SC, USA). Ca solution used was obtained from Inorganic Ventures Lakewood (Lakewood, NJ, USA). As and Hg solutions were prepared from Atomic

Spectroscopy Standards solutions (Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT, USA). Britton Robinson supporting electrolyte solutions were prepared as usual with boric, phosphoric and acetic acids (Merck). Sodium thiosulphate pentahydrate was obtained from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). All pH values were obtained adjusting with a NaOH solution (Suprapur, Merck, Darmstadt, Germany). Al(III) solution used in the analysis of spiked water samples was purchased from High Purity Standard (Charleston, SC, USA) confirmed against standard reference material SRM 3101.

7.2.2. Equipment

An electrochemical system Autolab PGSTAT 128 N (Echo Chemie, Utrecht, The Netherlands) with GPS software was used to record electrochemical measurements. All necessary pH values were adjusted with a pHmeter (Mettler Toledo SevenMulti, Schwerzenbach, Switzerland).

7.2.3. Screen-Printed Electrodes Preparation

The construction of the hand-made SPCEs used in the determination of aluminum was based on printing successive layers of different inks onto a polyester strip substrate. Four different screens with appropriate stencils were used to transfer the required design following the printing procedure described in previous works [41]. A picture of dimensions of the SPCEs used is shown in Figure 7.1.

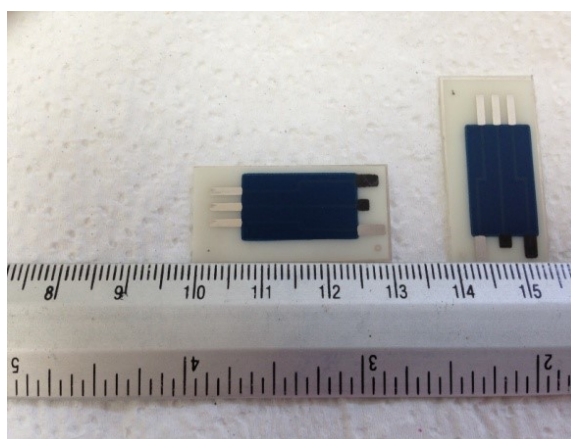


Figure 7.1. Dimensions of SPCEs used.

7.2.4. Modification of Screen-Printed Carbon Electrodes With Gold Nanoparticles

Metallic AuNPs deposits were obtained by direct electrochemical deposition on the screen-printed carbon electrode (SPCE) surface using a 0.1 mM solution of H₂AuCl₄ in 0.5 M H₂SO₄. The deposition was performed by applying a potential of +0.18 V during 15 s under stirring conditions [42].

7.2.5. Acetylcholinesterase Enzyme Immobilization on Gold Nanoparticles Modified Screen-Printed Carbon Electrode

The enzyme was immobilized by covalent union using N-cyclohexyl-N'-2-morpholinoethylcarbodiimide methyl *p*-toluene sulfonate, on the surface of AuNPs/SPCEs [43]. A 0.07 M solution of N-cyclohexyl-N-2-morpholinoethylcarbodiimide methyl *p*-toluene sulfonate was prepared in Britton Robinson pH 7.0. Aliquots of this solution were placed in vials of 100 μ L and stored frozen; one vial was thawed each time that it was necessary to immobilize the enzyme over the AuNPs/SPCE surface. To carry out the immobilization procedure 5 μ L of the buffer solution with cyclohexyl-N-2-morpholinoethylcarbodiimide methyl *p*-toluene sulfonate were placed on the working electrode surface, and an activation period of 80 min was elapsed before the next step that consisted of addition of enzyme.

An acetylcholinesterase solution was prepared by dissolving 300 mg of enzyme in 1 mL of Britton Robinson buffer pH 7.0. Aliquots of this enzyme solution were placed in vials and stored frozen; one vial was thawed each time. Next, 5 μ L of this enzyme solution were placed onto the working electrode surface and left to react at 30°C for two hours. The electrode was finally stored at 4°C. The modified electrode was washed with a pH 7.0 buffer solution, before using and between measurements. The modification of a SPCE with enzymes leads to an important change in the electrical double layer that produces a decrease in the rate of electron transfer [44–46], and the inhibitory effect is perfectly measurable with this type of biosensors. The performance of SPCE modified with AuNPs has been widely showed [47–49]. In fact, experiments carried out without gold nanoparticles led to poor results as can be seen in Figure 7.2.

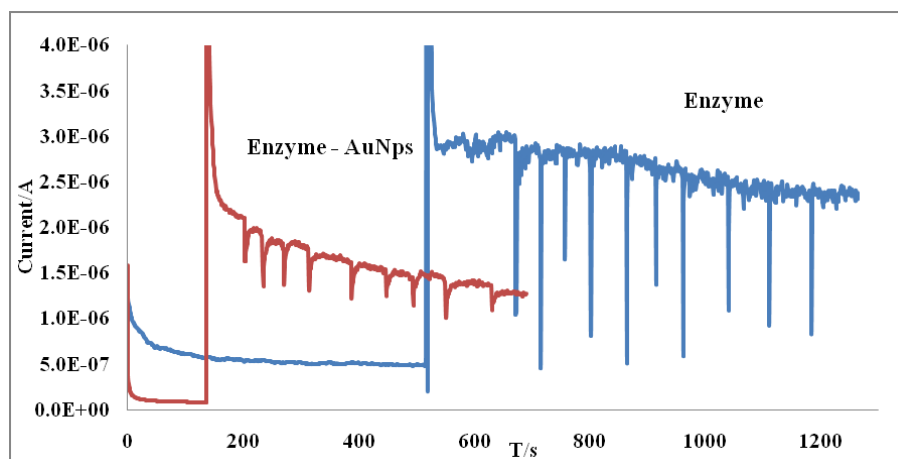


Figure 7.2. Amperometric calibration curves realized with enzyme acetylcholinesterase and AuNps and without AuNps, [ATI] 2.4×10^{-4} M; Britton Robinson buffer pH 7.8, $E_{ap} = +0.8$ V vs. Ag/AgCl.

7.2.6. Chronoamperometric Determination of Aluminum

The AChE/AuNPs/SPCE biosensor was placed in an electrochemical cell containing 5 mL of Britton Robinson pH 7.8 solution. An adequate potential was then applied and once a steady-state current was established, a defined amount of ATI was added to the cell. An oxidation current was observed due to the oxidation of the enzymatic reaction product. Once a steady-state current was set again, set volume of aluminum stock solution were consecutively added and a calibration curve was constructed. As it has been described above, the addition of aluminum solution resulted in a decrease of the chronoamperometric response. Aluminum inhibition effect was quantitatively evaluated by means of the difference between the ATI steady-state current in the absence of aluminum (I_0) and the steady-state current in the presence of aluminum (I). The parameter $\Delta I(I_0 - I)$ was proportional to the amount of ion added. Enzyme electrodes were conditioned in Britton Robinson buffer solution at pH 7.0 for 5 min between each calibration setting.

7.3. Results and Discussion

The AChE/AuNPs/SPCE biosensors developed in this work show a sensitive chronoamperometric response to the enzyme substrate, ATI. This signal is considerably affected by the presence of Al(III) ions that produce a decrease in the recorded chronoamperometric response. This inhibition effect can be quantitatively related to the concentration of Al(III).

The chronoamperometric response of the developed biosensors is affected by different experimental variables namely, operational chronoamperometric potential, pH and concentration of enzyme substrate ATI. Therefore, an optimization procedure of these experimental parameters was carried out.

The electrochemical response of acetylthiocholine iodide was evaluated first, through a surface response method using a 2^3 composite central experimental design. In this case, three parameters were studied in order to maximize the current registered, $\Delta I (I_0-I)$, for a 1.4 μM aluminum solution: applied potential (from +0.63 to +0.97 V, vs. screen-printed Ag/AgCl electrode), pH of supporting electrolyte (from 6.96 to 8.64) and substrate concentration (from 0.038 mM to 0.44 mM). The experiments carried out in different experimental conditions led to establishment of the following optimum values: pH = 8.6; ATI = 0.44 mM; $E_{ap} = +0.76$ V, but the calibration curves obtained under these conditions were too noisy. Those were improved with the conditions obtained from the second study where it was performed a sequential optimization; choosing the conditions suggested by next figures and regarding also enzyme activity.

First of all, the effect of applied potential in the chronoamperometric response of the developed biosensors was studied. The inhibitive signal of Al(III) on the disposable electrodes was analyzed using operational potentials from +0.5 to +0.9 V at pH 7.0, recommended for enzyme. A high quality amperometric signal at +0.8 V was obtained, thus, this potential was taken as the best value for determination of aluminum. The influence of pH value was also studied. Chronoamperometric analysis in a pH range from 6 to 9 was performed obtaining a value of 7.8 as the optimum taking into account the best stability conditions for the enzymatic electrode. Finally, the influence of the concentration of ATI was also studied in the range from 0.12 mM up to 0.48 mM, a concentration of 0.24 mM was found to give the highest inhibition response of aluminum, upper concentrations were noisy. The results are shown in Figure 7.3.

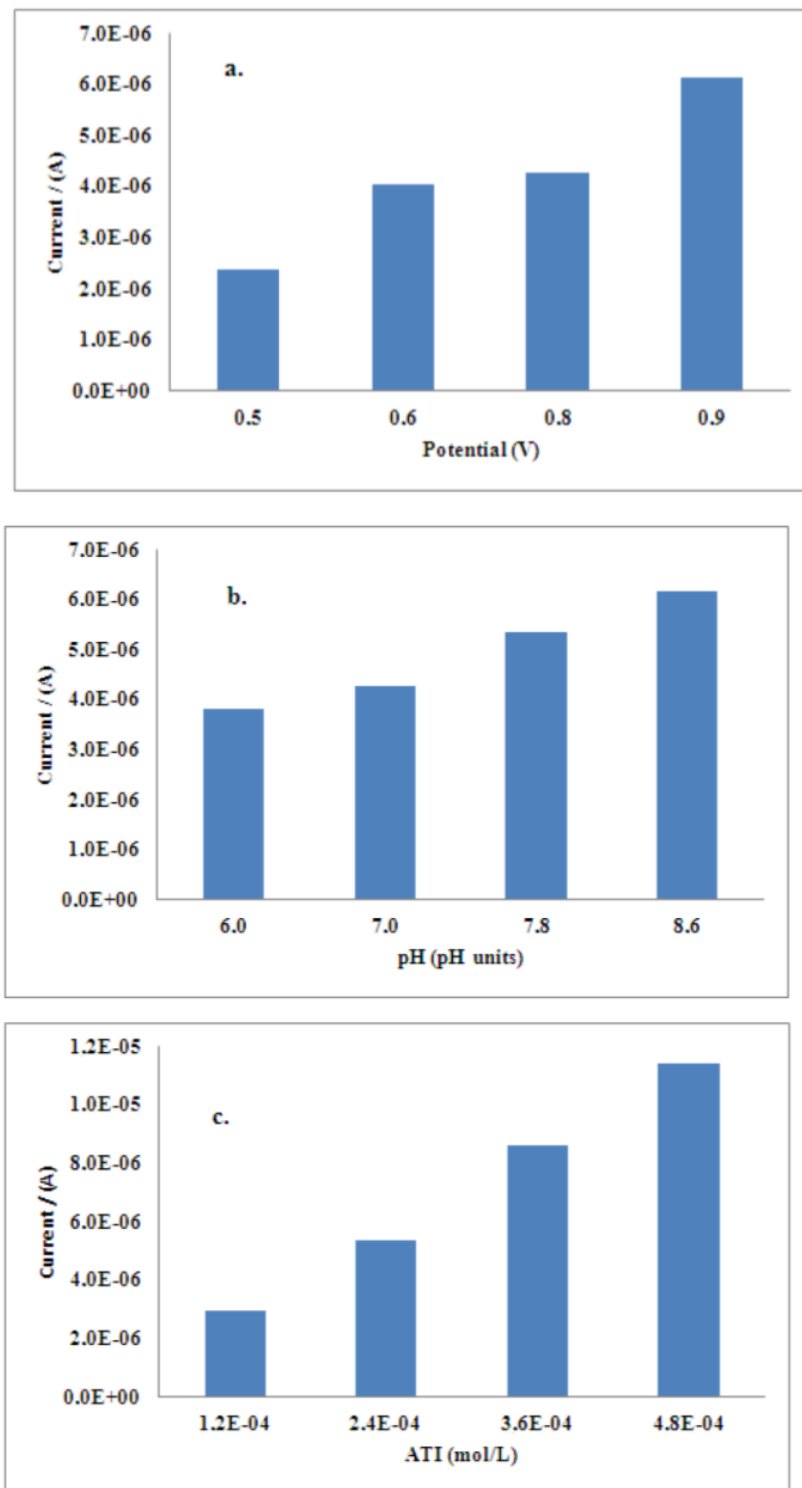


Figure 7.3. (a) Current response of ATI with potential, (b) Current response of ATI with pH, (c) Current response of ATI concentration.

Aluminum inhibition calibration curves at pH of 7.8 and +0.8 V shown very good sensitivity (Figure 7.4), accordingly with experimental conditions chosen for substrate response.

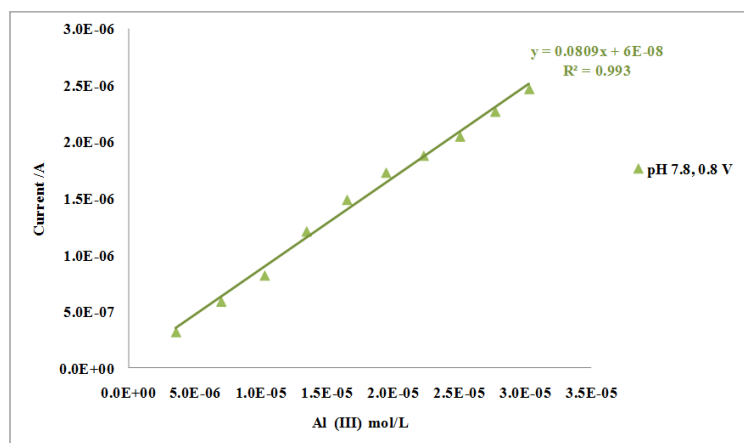


Figure 7.4. Al(III) inhibition calibration curve, [ATI] 2.4×10^{-4} M; Britton Robinson buffer pH 7.8, $E_{ap} = +0.8$ V vs. Ag/AgCl.

Once the optimal conditions were obtained, the inhibitory effect of aluminum ions on the response of the AChE biosensors was investigated following the method of Lineweaver-Burk. The $K_m(\text{app})$ value $(3.9 \pm 0.3) \times 10^{-3}$ M found in presence of aluminum is higher than the one obtained without aluminum $(3.1 \pm 0.3) \times 10^{-3}$. Therefore, the presence of aluminum diminishes the enzyme substrate affinity. In Figure 7.5 it can be seen that the studied process resembles a non competitive inhibition.

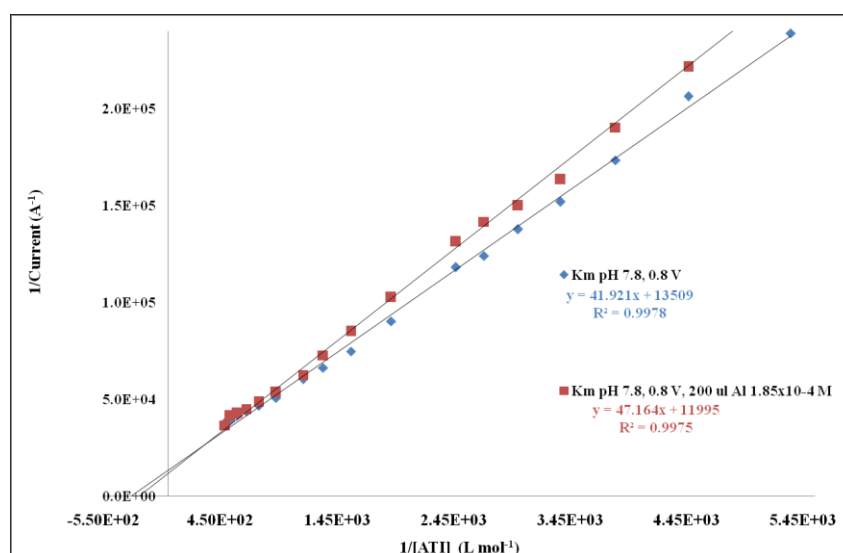


Figure 7.5. Lineweaver-Burk plot of AChE/AuNPs/SPCE biosensor in presence of aluminum and without aluminum. Britton Robinson buffer pH 7.8, $E_{ap} = +0.8$ V vs. Ag/AgCl.

7.3.1. Calibration and Limit of Detection

Figure 7.6 shows a chronoamperometric response obtained using AChE/AuNPs/SPCEs.

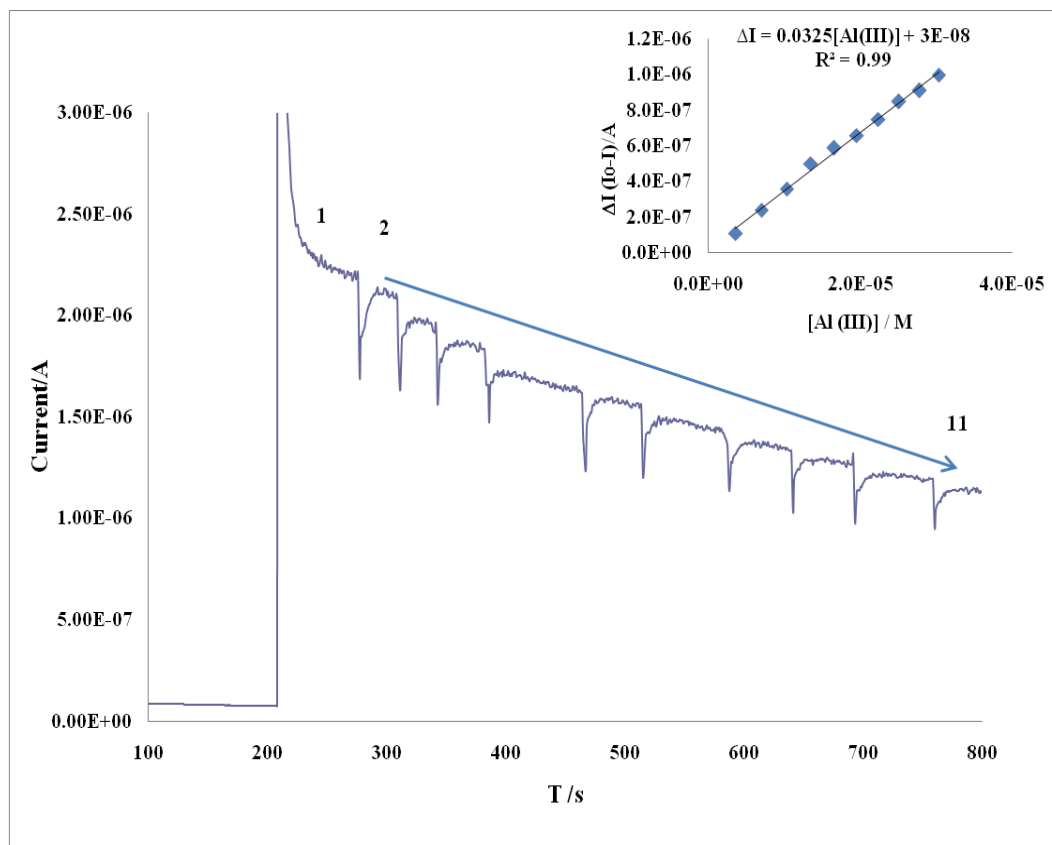


Figure 7.6. Amperometric recording for an acetylthiocholine iodide concentration (1) 2.4×10^{-4} M and consecutive additions of aliquots of Al(III) solution into the cell to give an overall concentration of: (2) 3.6×10^{-6} , (3) 7.0×10^{-6} , (4) 1.0×10^{-5} , (5) 1.3×10^{-5} , (6) 1.6×10^{-5} , (7) 1.9×10^{-5} , (8) 2.2×10^{-5} , (9) 2.5×10^{-5} , (10) 2.8×10^{-5} , (11) 3.0×10^{-5} ; Britton-Robinson buffer pH 7.8; $E_{ap} = +0.8$ V vs. Ag/AgCl. Inset: calibration curve corresponding to this amperogram.

As it can be seen in Figure 7.6, biosensor responds fast to aluminum concentration and a linear dependence between the decrease (ΔI) in the chronoamperometric response of ATI (I_0) and the Al(III) concentration (I) was observed in the concentration range from 3.6 μ M to 30 μ M. The regression parameters obtained for the calibration curve showed in Figure 7.6 were $\Delta I = 0.0325 [Al(III)] + 3.0 \times 10^{-8}$ ($R^2 = 0.99$).

Several calibration curves were constructed under the optimum conditions in order to evaluate figures of merit, such as precision and LOD, parameters of calibration

curves are shown in Table 7.1. The LOD under the optimum working conditions (2.1 ± 0.1) μM was calculated from the standard deviation of seven calibration curves (Sy/x) accordingly with the criteria $3Sy/x$, LOQ (6.9 ± 0.4) μM was also calculated from the standard deviation of seven calibration curves (Sy/x) accordingly with the criteria $10Sy/x$.

Table 7.1. Parameters of calibration curves performed to estimate detection and quantification limit of the method.

Calibration	LOD (M)	LOQ (M)	Slope [A/M]	Intercept (A)	Sy/x	R ²
I	2.2×10^{-6}	7.3×10^{-6}	0.06586	-7.19×10^{-8}	4.84×10^{-8}	0.993
II	2.1×10^{-6}	7.1×10^{-6}	0.04475	1.02×10^{-8}	3.19×10^{-8}	0.994
III	2.0×10^{-6}	6.6×10^{-6}	0.04273	-8.99×10^{-8}	2.84×10^{-8}	0.995
IV	2.1×10^{-6}	7.0×10^{-6}	0.09907	-1.23×10^{-7}	6.94×10^{-8}	0.994
V	1.8×10^{-6}	6.1×10^{-6}	0.03820	3.62×10^{-8}	2.34×10^{-8}	0.995
VI	2.1×10^{-6}	6.9×10^{-6}	0.04814	7.42×10^{-8}	3.34×10^{-8}	0.994
VII	2.1×10^{-6}	6.9×10^{-6}	0.06597	1.21×10^{-8}	4.55×10^{-8}	0.993
Mean	2.1×10^{-6}	6.9×10^{-6}				
SD	1.2×10^{-7}	3.9×10^{-7}				
RSD	5.7	5.7				

7.3.2. Precision

This parameter was calculated in terms of reproducibility. Repeatability was tried out using the same electrode surface. In this way, several successive calibrations for Al(III) were tested. The electrodes were conditioned for 5 min in a stirred Britton Robinson buffer solution, pH 7, between experiments. The relative standard deviation (RSD) obtained for the slope of the first two curves was lower than 4%; but from the third measurement an increase in RSD was noticed. Likewise, the reproducibility of the amperometric signal was checked using the slopes of five regressions carried out with different electrode surfaces, which are showed in Figure 7.7. The RSD value obtained was 3.3% and is shown in Table 7.2. These results suggest that the fabrication procedure of the AChE/AuNPs/SPCEs biosensors is reliable and al-

lows reproducible electroanalytical responses to be obtained with different electrodes constructed using the method described in this work.

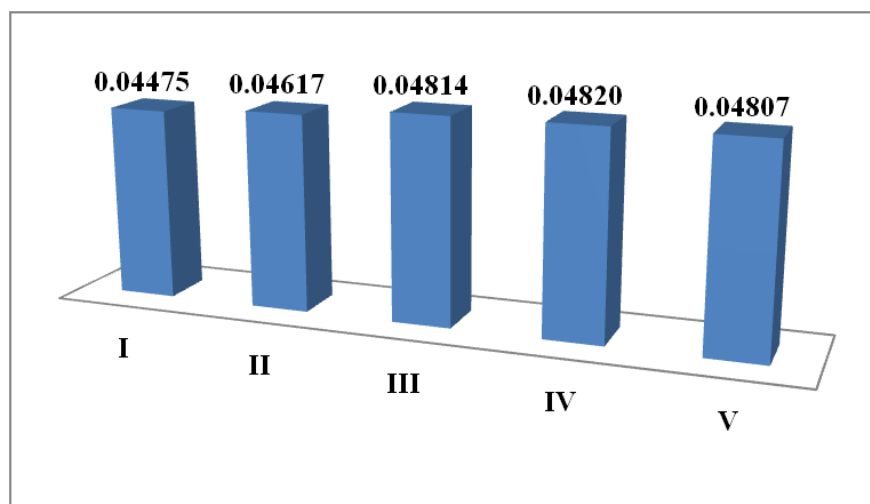


Figure 7.7. Slopes of calibration curves performed with diferent electrodes, [ATI] 2.4×10^{-4} M Britton-Robinson buffer pH 7.8; $E_{ap} = +0.8$ V vs. Ag/AgCl.

Table 7.2. Parameters of calibration curves performed to estimate reproducibility of the method.

Calibration	Slope [A/M]	Intercept (A)	Sy/x	R ²
I	0.04475	1.02×10^{-8}	3.2×10^{-8}	0.994
II	0.04617	5.97×10^{-8}	4.1×10^{-8}	0.990
III	0.04814	7.42×10^{-8}	3.3×10^{-8}	0.994
IV	0.04820	3.96×10^{-8}	4.1×10^{-8}	0.992
V	0.04807	2.08×10^{-8}	3.1×10^{-8}	0.995
Mean	0.04707			
SD	0.0016			
RSD	3.3			

7.3.3. Accuracy

The accuracy of the developed method was evaluated by means of the analysis of a standard reference material (SRM) High Purity Standards solution, Lot Number

1121015, (1000 ± 3) mg/L, using the standard addition method and spiking buffer solution. The aluminum average concentration quantified by the developed procedure, (1013 ± 30) mg/L ($n = 5$; $\alpha = 0.05$), matches the certified value of the sample considering the associated uncertainty. The mean recovery value obtained was $(101.4 \pm 2.9)\%$. Performance parameters of calibration curves used to estimate SRM added to buffer solution are shown in Table 7.3, recovery of SRM is shown in Table 7.4. Method performance was also evaluated by means of the analysis of spiked tap water samples. These samples were prepared by the addition of the above described standard reference material. Performance parameters of calibration curves used to estimate SRM added to tap water and mean value of SRM recovered from tap water are shown in Tables 7.5 and 7.6 respectively. According to these results, the SRM average value of (1011 ± 73) mg/L; ($n = 4$; $\alpha = 0.05$), is in good agreement with the certified value of the SRM regarding dilution factors and tap water matrix complexity. The average recovery value was $(101.2 \pm 7.0)\%$. These results suggest that the developed method with acetyl cholinesterase enzyme is accurate and reliable for aluminum determination in water.

Table 7.3. Parameters of calibration curves performed to estimate SRM recovery added to buffer solution.

Calibration	Slope [A/M]	Intercept (A)	Sy/x	R ²
I	0.0462	5.97×10^{-8}	4.1×10^{-8}	0.990
II	0.0240	7.69×10^{-7}	2.4×10^{-8}	0.989
III	0.0481	2.08×10^{-8}	3.1×10^{-8}	0.995
IV	0.0350	2.30×10^{-9}	2.4×10^{-8}	0.995
V	0.0692	1.35×10^{-7}	6.2×10^{-8}	0.991

Table 7.4. Recovery of SRM (1000 ± 3) mg/L spiked to buffer solution.

Calibration	Added (M)	Found (M)	Recovery %	SRM (5650/600)	SRM (mg/L)	SRM (2/1)	SRM (100/1)
I	1.96×10^{-5}	1.948×10^{-5}	99.2	1.834×10^{-4}	4.953	9.906	990.6
II	1.96×10^{-5}	1.920×10^{-5}	97.7	1.808×10^{-4}	4.881	9.761	976.1
III	1.96×10^{-5}	2.057×10^{-5}	104.7	1.937×10^{-4}	5.229	10.458	1045.8
IV	1.96×10^{-5}	1.994×10^{-5}	101.5	1.878×10^{-4}	5.070	10.141	1014.1
V	1.96×10^{-5}	2.023×10^{-5}	103.9	1.922×10^{-4}	5.189	10.379	1037.9
Mean			101.4				1012.9
SD			3.0				29.8
RSD			2.9				2.9

Table 7.5. Parameters of calibration curves performed to estimate SRM recovery added to tap water.

Calibration	Slope [A/M]	Intercept (A)	Sy/x	R ²
I	0.01365	1.12×10^{-7}	8.5×10^{-9}	0.995
II	0.02757	2.16×10^{-7}	3.4×10^{-8}	0.990
III	0.05092	6.02×10^{-7}	7.6×10^{-8}	0.988
IV	0.04163	3.59×10^{-7}	3.5×10^{-8}	0.983
Mean				
SD				
RSD				

Table 7.6. Recovery of SRM (1000 ± 3) mg/L spiked to tap water sample.

Added (M)	Found (M)	Recovery %	DF (5250/200)	SRM (mg/L)	SRM (2/1)	SRM (100/1)
7.0476×10^{-6}	6.798×10^{-6}	96.5	1.784×10^{-4}	4.818	9.636	963.6
7.0476×10^{-6}	7.608×10^{-6}	108.0	1.997×10^{-4}	5.392	10.785	1078.5
7.0476×10^{-6}	6.585×10^{-6}	93.4	1.728×10^{-4}	4.667	9.334	933.4
7.0476×10^{-6}	7.529×10^{-6}	106.8	1.977×10^{-4}	5.337	10.673	1067.3
Mean		101.2				1010.7
SD		7.3				73.0
RSD		7.2				7.2

7.3.4. Interferences

An interference study was performed comparing the percentage of inhibition, showed for the developed acetylcholinesterase-based biosensor in the presence of aluminum and others foreign ions. Three concentration levels were tested, namely 1×10^{-3} M, 1×10^{-4} M and 1×10^{-6} M. As it can be seen in Figure 4 the highest interference effect was found for Mo(VI), W(VI) and Hg(II). The interference of As(III) was performed by mixing 1000 μ L of standard solution of As(V) 1.33×10^{-2} M with 1000 μ L of sodium thiosulfate 0.1 M in order to reduce As(V) to As(III), mixture was left to react for 70 minutes at room temperature and used immediately, adding to cell the necessary amount to reach concentration tested. Under the aluminum biosensor conditions although As(III) is an important interference is not the strongest, considering that the most stable specie in aqueous solutions is As(V). It is important to point out that calcium and magnesium showed a low interference at any level of concentration as it can be seen in Figure 7.8. Moreover, from Figure 7.9 it can be also deduced that when Al(III) is present at low concentrations (1×10^{-6}), Hg(II), As(III) and Mo(VI) are interferences at the same low concentration level.

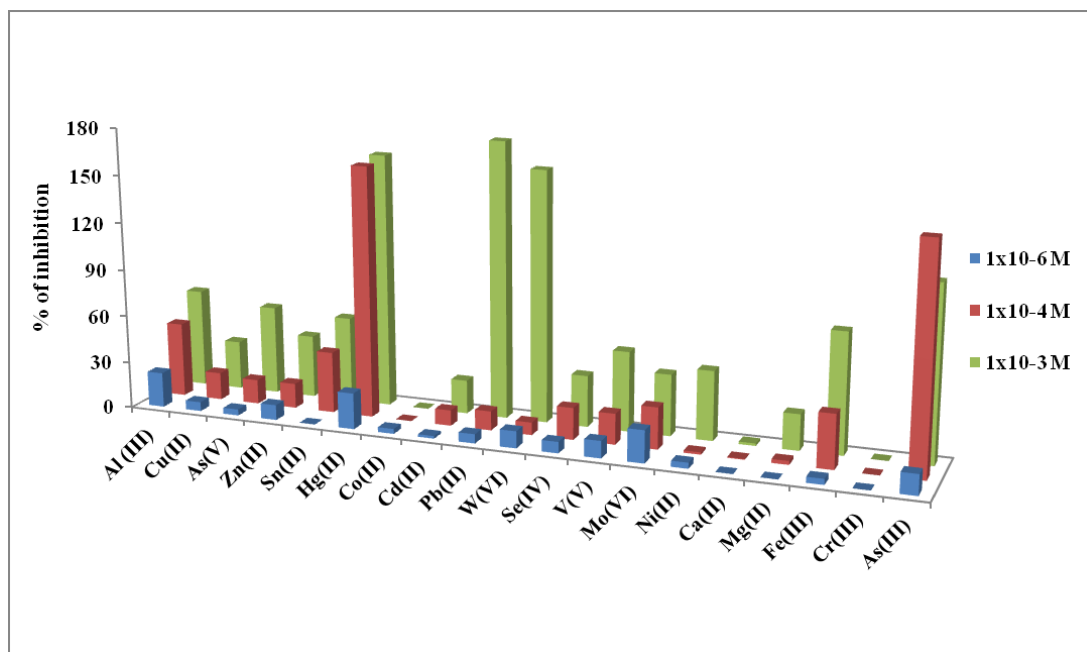


Figure 7.8. Inhibition percentage of current of AChE/AuNPs/SPCE in presence of: Cu(II), As(V), Zn(II), Sn(II), Hg(II), Co(II), Cd(II), Pb(II), W(VI), Se(IV), V(V), Mo(VI), Ni(II), Ca(II), Mg(II), Fe(III), Cr(III), As(III) at three levels of concentration; [ATI] 1.2×10^{-4} M; Britton-Robinson buffer pH 7.8, $E_{ap} = +0.8$ V vs. Ag/AgCl.

From Figure 7.8 it is shown that As(III) and Hg(II) are the most important interferences at 1×10^{-4} M; also from it is shown that Hg(II); Pb(II), W(VI) and As(III) are the most important interferences at 1×10^{-3} M, but usually they do not be present at this level concentration in tap water.

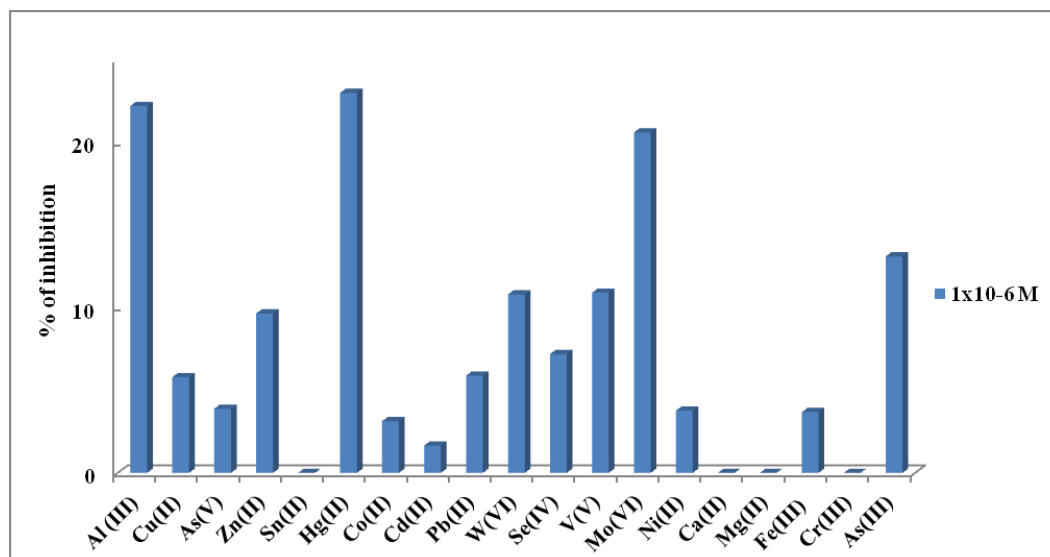


Figure 7.9. Inhibition percentage of current of AChE/AuNPs/SPCE in presence of: Cu(II), As(V), Zn(II), Sn(II), Hg(II), Co(II), Cd(II), Pb(II), W(VI), Se(IV), V(V), Mo(VI), Ni(II), Ca(II), Mg(II), Fe(III), Cr(III), As(III) at 1×10^{-6} M; [ATI] 1.2×10^{-4} M; Britton-Robinson buffer pH7.8, $E_{ap} = +0.8$ V vs. Ag/AgCl.

7.4. Conclusions

The development of a novel biosensor based on the inhibition of acetyl cholinesterase using AuNPs/SPCEs allows amperometric determination of aluminum. Precision parameter was calculated in terms of reproducibility obtaining values of RSD for the slopes of several calibrations lower than 5.0%. The method developed in this work presents several advantages, including lower detection limit, 2.1 μ M, than other previous described ones [36].

Recovery of SRM was tried from buffer solution and enriched tap water, both with satisfactory values and matches SRM reference value of (1000 ± 3) mg/L, assessing method accuracy and reliability. The easy construction of the biosensors, low cost, disposability, ease-of-use and environmentally friendly features of this method makes it suitable for the analysis of aluminum in water. These characteristics repre-

sent clear advantages in comparison to usual analytical methods that allow aluminum determination such as stripping adsorption voltammetry using complexing agents and electrothermic absorption spectroscopy which result tedious and expensive in the routinely analysis of this element.

7.5. References

1. A. Kumar, S. Dogra, A. Prakash, Protective effect of curcumin (*Curcuma longa*), against aluminium toxicity: Possible behavioral and biochemical alterations in rats. *Behav. Brain. Res.*, 205 (2009) 384–390.
2. R. Abdel-Aal, A.A. Assi, B. Kostandy, Rivastigmine reverses aluminum-induced behavioral changes in rats. *Eur. J. Pharm.*, 659 (2011) 169–176.
3. C. Exley, The coordination chemistry of aluminium in neurodegenerative disease. *Coord. Chem. Rev.*, 256 (2012) 2142–2146.
4. I. Narin, M. Tuzen, M. Soylak, Aluminium determination in environmental samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry after solid phase extraction on Amberlite XAD-1180/pyrocatechol violet chelating resin. *Talanta*, 63 (2004) 411–418.
5. J. Smeyersverbeke, D. Verbeelen, Determination of aluminum in dialysate concentrates by Lvov platform graphite-furnace atomic-absorption spectrometry. *Anal. Chem.*, 60 (1988) 380–383.
6. S. Sukharev, S. Delegan-Kokaiko, O. Sukhareva, Atomic-absorption determination of aluminum in waters. *J. Water. Chem. Technol.*, 32 (2010) 223–226.
7. L. Weijun, P. Shouzhi, J. Duohua, C. Shiqiang, L. Gang, F. Congbin, Fluorescent probes for Al(III) and Cr(III) based on a photochromic diarylethene bearing a fluorescent rhodamine unit. *Microchim. Acta*, 174 (2011) 329–336.
8. G. Mersal, H. Arida, New carbon paste modified micro electrode based on haematoxylin for determination of aluminum in underground water. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 6 (2011) 1116–1126.
9. M. Arvand, M. Kermanian, M. Zanjanchi, Direct determination of aluminium in foods and pharmaceutical preparations by potentiometry using an AIMCM-41 modified polymeric membrane sensor. *Electrochim. Acta*, 55 (2010) 6946–6952.

10. F. Zhang, S. Bi, H. Li, Y. Chen, L. Dai, Application of L-Dopa as an Electroactive Ligand for Indirect Determination of Aluminum in Biological Samples by Differential Pulse Voltammetry. *Electroanalysis*, 13 (2001) 1054–1058.
11. V. Arancibia, C. Munoz, Determination of aluminium in water samples by adsorptive cathodic stripping voltammetry in the presence of pyrogallol red and a quaternary ammonium salt. *Talanta*, 73 (2007) 546–552.
12. L. Qiong, W. Lirong, X. Danli, L. Guanghan, Determination of trace aluminum in foods by stripping voltammetry. *Food. Chem.*, 97 (2006) 176–180.
13. F. Zhang, M. Ji, Q. Xu, L. Yang, S. Bi, Linear scan voltammetric indirect determination of Al(III) by the catalytic cathodic response of norepinephrine at the hanging mercury drop electrode. *J. Inorg. Chem.*, 99 (2005) 1756–1761.
14. L. De Carvalho, P. Do Nascimento, D. Bohrer, R. Stefanello, D. Bertagnolli, Determination of aluminum as contaminant in dialysis concentrates by adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Anal. Chim. Acta*, 546 (2005) 79–84.
15. L.B. Santos, M.T.F. de Souza, A.T. Paulino, E.E. Garcia, E.M. Nogami, J.C. Garcia, N.E. de Souza, Determination of aluminum in botanical samples by adsorptive cathodic stripping voltammetry as Al-8-hydroxyquinoline complex. *Microchem. J.* 112 (2014) 50–55.
16. S. Thomas, D. Davey, D. Mulcahy, C. Chow, Indirect amperometric detection of aluminium by flow injection analysis using DASA as ligand. *Anal. Lett.*, 38 (2005) 133–147.
17. J. Di, S. Bi, T. Yang, M. Zhang, Voltammetric determination of aluminum(III) using a reagentless sensor fabricated by sol-gel process. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 99 (2004) 468–473.
18. F. Zhang, S. Bi, J. Liu, X. Yang, X. Wang, L. Yang, T. Yu, Y. Chen, L. Dai, T. Yang, Application of dopamine as an electroactive ligand for the determination of aluminum in biological fluids. *Anal. Sci.*, 18 (2002) 293–299.
19. F. Zhang, S. Bi, J. Liu, X. Wang, X. Yang, L. Yang, Q. Yu, J. Hu, Z. Bai, Electrochemical and spectrometric studies on the principle of indirect determination of aluminum using L-dopa as an electroactive complexing ligand. *Anal. Lett.*, 35 (2002) 135–152.

20. M. Cámara Vargas, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Simultaneous determination of chromium(VI) and aluminum(III) by adsorptive stripping voltammetry with pyrocatechol violet. *Helv. Chim. Acta*, 86 (2003) 2434–2440.
21. F. Zhang, L. Yang, S. Bi, J. Liu, F. Liu, X. Wang, X. Yang, N. Gang, T. Yu, J. Hu, H. Li, T. Yang, Neurotransmitter dopamine applied in electrochemical determination of aluminum in drinking waters and biological samples. *J. Inorg. Biochem.*, 87 (2001) 105–113.
22. F. Quentel, C. Elleouet, C.L. Madec, Determination of the trace of aluminium (III) in natural fresh water by cathodic redissolution following the adsorption of an aluminium-lumogallion complex. *Analisis*, 25 (1997) 222–225.
23. A. Komersová, M. Bartoš, K. Kalcher, K. Vytřas, Adsorptive stripping voltammetric determination of aluminium using arsenazo III. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 66 (2001) 456–464.
24. R.A. Romero, J.E. Tahan, A.J. Moronta, Two alternative sample mineralization procedures to permit subsequent polarographic determination of total soluble aluminium in haemodialysis water. *Anal. Chim. Acta*, 257 (1992) 147–154.
25. J. Wang, P.A.M. Farias, J.S. Mahmoud, Stripping voltammetry of aluminum based on adsorptive accumulation of its solochrome violet RS complex at the static mercury drop electrode. *Anal. Chim. Acta*, 172 (1985) 57–64.
26. M. Barquero Quirós, B.Y. Zhen, Desarrollo y validación de un método adsorptivo para la determinación de aluminio en fluidos usados en diálisis renal. *Portugaliae Electrochimica Acta*, 23 (2005) 165–178.
27. M. Barquero Quirós, Desarrollo y optimización de un método voltamperométrico adsorptivo con alizarina para la determinación de aluminio en aguas. *Portugaliae Electrochimica Acta*, 23, (2005) 403–411.
28. J. Tria, E.C.V. Butler, P.R. Haddad, A.R. Bowie, Determination of aluminum in natural water samples. *Anal. Chim. Acta*, 588 (2007) 153–165.
29. D. Vukomanovic, J. Page, G. van Loon, Voltammetric determination of Al(III) with adsorptive preconcentration of the pyrocatechol violet complex. *Can. J. Chem.*, 69 (1991) 1418–1426

30. X. Wang, J. Lei, S. Bi, N. Gan, Z. Wei, Determination of the speciation of aluminum(III) in natural waters by adsorption stripping voltammetry and complexation with Al(III)-solochrome violet RS. *Anal. Chim. Acta*, 449 (2001) 35–44.
31. O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta*, 73 (2007) 202–219.
32. O. Shulga, J.R. Kirchhoff, An acetylcholinesterase enzyme electrode stabilized by an electrodeposited gold nanoparticle layer. *Electrochem. Commun.*, 9 (2007) 935–940.
33. C. Ajaero, M.Y.M. Abdelrahim; J.M. Palacios-Santander, M.L.A. Gil, I. Naranjo-Rodríguez; J.L. Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, L.M. Cubillana-Aguilera, Comparative study of the electrocatalytic activity of different types of gold nanoparticles using Sonogel-Carbon material as supporting electrode. *Sens. Actuat. B-Chem.*, 171–172 (2012) 1244–1256.
34. Y.C. Tsai, S.Y. Chen, C.A. Lee, Amperometric cholesterol biosensors based on carbon nanotube–chitosan–platinum–cholesterol oxidase nanobiocomposite. *Sens. Actuat. B-Chem.*, 135 (2008) 96–101.
35. M. Albareda-Sirvent, A. Merkoçi, S. Alegret, Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. *Sens. Actuator B-Chem.* 69 (2000) 153–163.
36. M. Barquero-Quirós, O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, Biosensor for aluminium(III) based on its inhibition of α -chymotrypsin immobilized on a screen-printed carbon electrode modified with gold nanoparticles. *Microchim. Acta*, 179 (2012) 65–70.
37. M. Stoytcheva, V. Sharkova, J.P. Magnin, Electrochemical Approach in Studying the Inactivation of Immobilized Acetylcholinesterase by Arsenate(III). *Electroanalysis*, 10 (1998) 994–998.
38. A. Günther, U. Bilitewski, Characterization of inhibitors of acetylcholinesterase by an automated amperometric flow-injection system. *Anal. Chim. Acta*, 300 (1995) 117–125.

39. S. Andreescu, L. Barthelmebs, J.L. Marty, Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes: comparative study between three immobilization methods and applications to the detection of organophosphorus insecticides. *Anal. Chim. Acta*, 464 (2002) 171–180.
40. S. Sanllorente Mendez. Determinación de Arsénico por técnicas electroquímicas: Desarrollo de sensores y biosensores. Tesis Doctoral. Universidad de Burgos: Burgos, España (2010).
41. O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, A novel method for the anodic stripping voltammetry determination of Sb(III) using silver nanoparticle-modified screen-printed electrodes. *Electrochem. Commun.*, 9 (2007) 820–826.
42. O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Anodic stripping voltammetry of antimony using gold nanoparticle-modified carbon screen-printed electrodes. *Anal. Chim. Acta* 589 (2007) 255–260.
43. M. Stoytcheva, V. Sharkova, M. Panayotova, Electrochemical approach in studying the inhibition of acetylcholinesterase by arsenate (III): analytical characterization and application for arsenic determination. *Anal. Chim. Acta*, 364 (1998) 195–201.
44. A.L. Alvarado-Gómez, M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Vanadium determination in water using alkaline phosphatase based screen-printed carbon electrodes modified with gold nanoparticles. *J. Electroanal. Chem.* 693 (2013) 51–55.
45. A.K. Sarma, P. Vatsyayan, P. Goswami, S.D. Minteer, Recent advances in material science for developing enzyme electrodes. *Biosens. Bioelectron.*, 24 (2009) 2313–2322.
46. O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, L. Ferreira-Gonçalves, M.J. Arcos-Martínez, Development of urease based amperometric biosensors for the inhibitive determination of Hg(II). *Talanta*, 79 (2009) 1306–1310.
47. D. Du, J. Ding, J. Cai, J. Zhang, L. Liu, *In situ* electrodeposited nanoparticles for facilitating electron transfer across self-assembled monolayers in biosensor design. *Talanta*, 74 (2008) 1337–1343.
48. M.A. Alonso-Lomillo, C. Yardimci, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, CYP450 2B4 covalently attached to carbon and gold screen printed

- electrodes by diazonium salt and thiols monolayers. *Anal. Chim. Acta*, 633 (2009) 51–56.
49. O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, P. Recio-Cebrián, Arcos-Martínez, M.J. Screen-printed acetylcholinesterase-based biosensors for inhibitive determination of permethrin. *Sci. Total. Environ.*, 426 (2012) 346–350.

8. Superoxide dismutase aluminum(III) inhibition using screen printed carbon electrodes with tetrathiafulvalene and modified with nanoparticles of gold, platinum, rhodium and palladium.

8. Determinación de Al(III) por medio de un biosensor enzimático de superóxido dismutasa utilizando epinefrina como sustrato

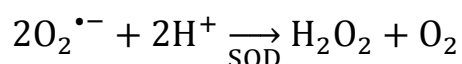
En este capítulo se describe la puesta a punto de un biosensor para la determinación de Al(III) basado en la inhibición de la enzima SOD, empleando un electrodo serigrafado de pasta de carbono con tetratiofulvaleno (TTF) incorporado como mediador y utilizando epinefrina (EPI) como sustrato. La oxidación amperométrica de la EPI fue afectada por la presencia de iones Al(III) produciéndose un decrecimiento en la corriente que puede relacionarse cuantitativamente con la concentración de aluminio.

En este caso la inmovilización de la enzima se llevó a cabo utilizando glutaraldehído para mejorar su fijación por entrecruzamiento. El electrodo serigrafado de carbón, se modificó previamente depositando nanopartículas de oro, platino, rodio o paladio con el fin de analizar su efecto catalítico y mejorar las prestaciones de este sensor, con respecto a los descritos en los capítulos anteriores. Se ha llevado a cabo un detallado estudio de la influencia del método de modificación del electrodo con nanopartículas utilizando dos procedimientos distintos: mediante electrodeposición a potencial fijo y mediante barridos voltamperométricos. Los depósitos metálicos fueron caracterizados por microscopía electrónica de barrido, microscopía de fuerza atómica y fluorescencia de rayos X.

La modificación por voltamperometría cíclica, permitió, en el caso de la utilización de nanopartículas de paladio, un aumento en la sensibilidad en la determinación de Al(III), permitiendo la realización de determinaciones precisas y estables y obteniendo límites de detección similares a otros biosensores desarrollados para Al(III). Además el hecho de trabajar a un potencial menor que los empleados anteriormente es un aspecto que incide positivamente en la selectividad del mismo. El método desarrollado fue exitosamente aplicado a la determinación de Al(III) en un material de referencia certificado. Este trabajo, que está en vías de publicación, se ha presentado en forma de un poster “Screen printed carbon electrode modified with tetrathiafulvalene, super oxide dismutase and electrodeposits of gold, platinum, rhodium and palladium showing Al(III) inhibition”, en 4th International Conference on Biosensing Technology, Lisboa, Portugal 2015.

8.1. Introduction

Aluminum toxicity has been shown in vivo and in vitro, but complexity of its interactions with human organism makes very difficult to assign the responsibility in Alzheimer disease, which can be considered as the combined effect of oxidant action, participation on amyloid cascade, neuronal degeneration [1] and accumulation in neurofibrillary tangles. Aluminum presence favors τ protein link through phosphate bridge [2] and alters homeostatic ion equilibrium [3] and it has shown a strong effect on reactive oxygen species (ROS) production on living organisms, due to iron accumulation in oxidative stress [4]. Markedly ROS impaired enzymes such as SOD and catalase which react with radical species as $O_2^{\bullet-}$, $OH^{\bullet-}$, and peroxy nitrite. Although $O_2^{\bullet-}$ radical is not so reactive itself; but in presence of Fe^{2+} , Fenton reaction can turn it into hydroxyl radical, which is the most potent radical. These findings show that $O_2^{\bullet-}$ is involved in cellular damage. Biosensors have employed superoxide dismutase (SOD), an enzyme that scavenges superoxide to measure superoxide anion accordingly with reaction [5].



$O_2^{\bullet-}$ affects cytochrome c (Cyt c) by oxidizing Fe^{2+} to Fe^{3+} and reducing itself to H_2O_2 . $O_2^{\bullet-}$ radical levels were found to be elevated in homogenized cancerous brain tissue compared to normal human brain tissue. [6] $O_2^{\bullet-}$ is formed in living biological systems by the donation of an electron to molecular oxygen, through oxidation of semiquinone-type radicals formed in the mitochondrial electron transport chain. In its presence, free radical scavengers, enzymes SOD, glutathione peroxidase (GSH-Px) decrease their antioxidant status, and lipid peroxide levels are increased.

Aluminum administration to laboratory animals induces SOD dysfunction and damage on target organs [7-10]. It has been found that zinc [11], selenium [12] and therapies used against Alzheimer disease [13-16] have a protective role against aluminum induced toxicity improving SOD function. Aluminum presence in humans is associated with oxidative stress [17, 18].

Biosensors constructed with SPCEs offer low detection limits, easier assembly of metallic NPs and enzymes, good reproducibility, low contamination and excellent

biocompatibility with enzymes and antibodies [18]. Metal NPs small size, high mechanical strength, and high chemical and thermal stability, allow them, when acting as enzyme-carrier materials, to improve the efficiency of immobilized enzymes, facilitating reaction kinetics; and to supply a larger surface area, leading to higher enzyme loading per unit mass of particles, achieving enhanced device sensitivity and reduced mass transfer resistance [19].

Besides, increased electric conductivity and electron transfer between redox enzyme center and electrode [20]. NPs have been also capable to induce oxidative stress on cellular lines causing mitochondrial injury [21]. NPs such as metal, metal oxides, semiconductors, polymers and composite-metal NPs, have been used to assembly miniaturized electrochemical sensors and biosensors, with low detection limit, signal amplification and analytes simultaneous detection. AuNPs, due to their unique properties, relatively low cost and ease of preparation are the most used in a lot of biochemical applications [22, 23].

AuNPs can be synthesized by different chemical methods and applied to electrochemical detection of As(III) [24], PtNPs have been also used to determine As(III) [25]. AuNPs use in amperometric biosensors and electrochemical techniques enhances detection sensitivity [26-28]. Due to their inertness, platinum NPs (PtNPs) are the principal metal NPs alternative for anodic current measurement and have been applied to formaldehyde [29], neurotransmitter determination [30], glucose oxidation [31] and uric acid determination in ascorbic acid (AA) presence [32].

Modified Pd nanoparticles (PdNPs) electrodes have been applied to catecholamines determination [33], PtNPs and PdNPs/methylthiophene (PMT) sensors have been applied to dopamine (DA) and AA determination [34], Pd grapheno nanocomposite have been used for immunosensor preparation [35]. Rhodium nanoparticles (RhNPs) main application has been as precursors for the preparation of catalytics [36, 37] and for catalysis and sensing of cytochrome c [38] and H₂O₂ [39], as well as for biosensing of α -ketoglutarate [40]. Due to sensitivity and specificity joint benefits produced by modified SPCEs with metallic Nps and enzymes, this research work was conducted with the goal to compare the effect of NPs of Au, Pt, Pd and Rh deposited by dis-

tinct electrochemical procedures on sensitivity of amperometric inhibition SOD by aluminum, with TTF as electrochemical mediator using EPI as substrate. TTF allows that the rapid electron transfer between SOD and electrode surface can be carried out at lower potential. This study indicates that Al(III) SOD inhibition would be a novel lower potential alternative in respect to other aluminum enzymatic determinations.

8.2. Experimental Section

8.2.1. Reagents

All solutions were prepared with purified water supplied by TKA Purification System, inverse osmosis, with a UV lamp irradiation system.

SOD enzyme (30 KU) and EPI were purchased from Sigma (Steinheim, Germany, Bovine serum albumine (BSA), glutaraldehyde and hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate (HAuCl_4) were obtained from Sigma–Aldrich (Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany). Solutions of platinum, rhodium and palladium 0.10 mM were prepared from Titrisol solutions (Merck, Darmstadt, Germany).

Britton Robinson supporting electrolyte solutions were prepared as usual with boric, phosphoric and acetic acids (Merck, Darmstadt, Germany), pH values were obtained adjusting with NaOH solution (Suprapur, Merck, Darmstadt, Germany).

Titrisol solutions were used to prepare stock standard solutions of Al, Fe, Cu, Sn, Zn, Co, Ni, Cr, Cd, Pb and Se were from (Merck, Darmstadt, Germany). Solutions of V, Mo, W, Mg were acquired from High Purity Standard (Charleston SC, USA). Ca solution used was obtained from Inorganic Ventures (Lakewood, New Jersey USA). As and Hg solutions were prepared from Atomic Spectroscopy Standards solutions (Perkin Elmer Co, Norwalk, USA).

Aluminum solutions used for spike were prepared from High Purity Standard (Charleston, SC, USA) confirmed against standard reference material SRM 3101

Several inks were used in the fabrication of SPEs, namely Electrodag PF-407 A (carbon ink), Electrodag 6037 SS (silver/silver chloride ink) and Electrodag 452 SS (dielectric ink) supplied by Acheson Colloiden (Scheemda, The Netherlands). The work-

ing electrode ink was prepared by thoroughly mixing carbon ink with tetrathiafulvalene (TTF) 5%. TTF was obtained from Acros Organics (Geel, Belgium).

8.2.2. Equipment

An electrochemical system Autolab PGSTAT Echo Chemie128 N with GPS software was used to record electrochemical measurements (Echo Chemie, Utrecht, Netherlands). All pH values were adjusted with a pHmeter (Mettler Toledo SevenMulti, Schwerzenbach, Switzerland). An equipment S-3700 Hitachi was used to perform scanning electronic microscopy (SEM) of SPCEs. An equipment IXRF Systems model 550i was used to obtain spectra of elements on the SPCE. AFM parameters and images were obtained with an equipment NanoScopeQuadrex Digital Instruments Veeco Metrology Group.

Hand-made SPC_{TTF}Es were produced on a DEK 248 printing machine (DEK, Weymouth, UK,) using polyester screens with appropriate stencil designs mounted at 45° to the printer stroke.

Hand made screen printed carbon electrode modified with TTF 5% was used (Figure 8.1).

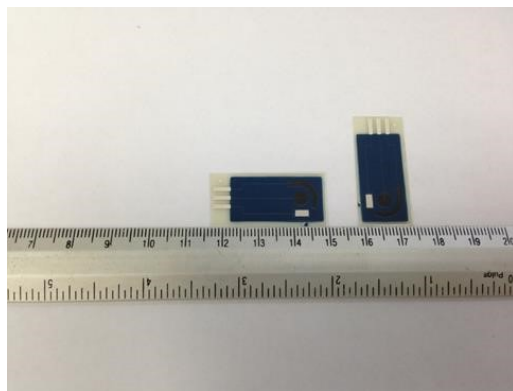


Figure 8.1. Dimensions of electrode system used.

8.2.3. Nanoparticles Electrodeposition methods

SPC_{TTF}Es modification with nanoparticles (NPs/SPC_{TTF}Es) was carried out by both controlled potential and cyclic voltammetry scan methods.

A) *Metal plating* was carried at two different potentials namely +0.3 and +0.18 V, in a quartz cell containing gold, platinum rhodium or palladium solutions 0.10 mM in H₂SO₄ 0.5 M [41]. Following electrodeposition process, the NPs/SPC_{TTF}Es was removed from plating solution, rinsed with purified water and wiped carefully.

B) *Cyclic voltammetry* deposition was performed doing a set of seven successive voltammetric scans between +1 and -0.2 V in a quartz cell containing gold, platinum, rhodium or palladium solutions 0.10 mM in H₂SO₄ 0.5 M. [42]. Electrodes were prepared by setting two cyclic voltammetric conditions namely CV1 and CV2. CV1: delay time 60 s; step potential 0.01495 V, scan rate 0.050 V/s and CV2: delay time 120 s, step potential, 0.025V, scan rate 0.1V/s. After nanoparticles deposition, the electrode was rinsed with purified water and wiped carefully.

8.2.4. SOD enzyme immobilization onto AuNps/TTF/SPCEs

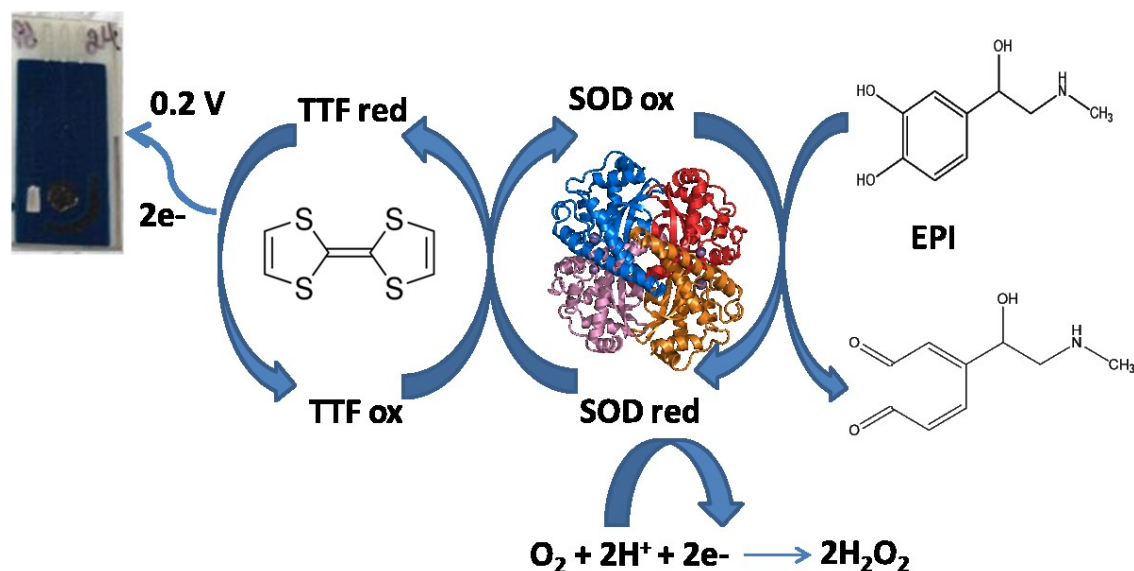
Enzyme was immobilized by polymerization with glutaraldehyde, on the surface of AuNPs/SPC_{TTF}Es, PtNPs/SPC_{TTF}Es, PdNPs/SPC_{TTF}Es and RhNPs/SPC_{TTF}Es [43]. To carry out the immobilization procedure, superoxide dismutase enzyme solution was prepared by dissolving enzyme in Britton Robinson buffer pH 7.0. To avoid loss of enzymatic activity BSA was used in a mixture made of 20 µL of SOD 5.9 mg/mL, 10 µL of BSA 1.69 % m/v and 10 µL of glutaraldehyde 2.5 % v/v [44]. This mixture was dropped onto the surface electrode and stored at 4⁰C before it was used and between measurements. The modified electrode was washed with purified water, before and after use.

8.3. Results and discussion

8.3.1. Optimization of experimental parameters.

EPI originates an amperometric signal at SOD/PdNPs/SPC_{TTF}E after which a steady-state current is reached. The presence of Al(III) ions produces SOD enzyme inhibition which causes a decrease in the EPI amperometric signal. Al(III) concentration influence in the inhibition process, can be quantitatively evaluated determining the difference between the steady state current in absence of Al(III) (I_0) and the steady state current in the presence of Al(III) (I). Accordingly with the following working principle have been developed a SOD based biosensor with TTF as possible mediator at electrode surface (Scheme 8.1).

Figure 8.2 performed with illustrative not comparative purposes; shows effect of TTF on amperometric recording. The parameter $\Delta(I_0-I)$ depends on EPI concentration, applied potential (E_{ap}) and pH solution. Therefore, an optimization of these variables was performed in order to ensure the quality of the results.



Scheme 8.1. Electrode process that leads oxidation of EPI on SOD/SPC_{TTF}E.

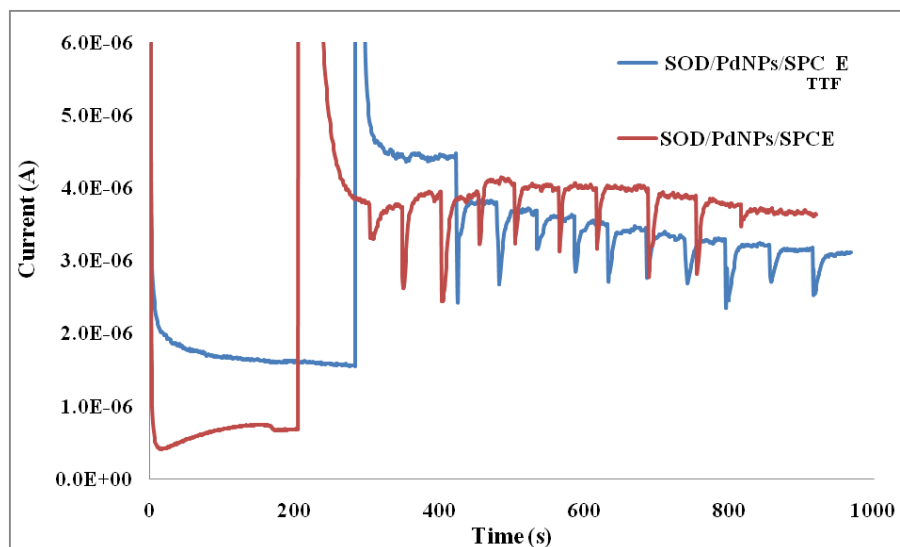


Figure 8.2. Chronoamperograms recorded using a SOD/PdNPs/SPC_{TTFE}, a SOD/PdNPs/SPCE for successive additions of 100 μL of a 3.7×10^{-4} M of Al(III) solution, Britton Robinson buffer pH 5.0 $E_{\text{ap}} = +0.20$ V vs. Ag/AgCl.

Because the dependence between $\Delta(I_0 - I)$ and Al(III) concentration is linear, several aluminum inhibition calibration curves were performed at different potential and pH and their slopes were compared, in order to optimize the pH and E_{ap} . Slope calibration curve with pH was calculated from pH 5.0 to 8.0. In the same way slope calibration curve with potential was calculated from +0.20 V to +0.60 V. Higher slope values were obtained at pH 5.0 and E_{ap} of +0.2 V, so these conditions were chosen to perform Al(III) inhibition calibration curves.

Findings indicated that substrate stability improved at low values of pH and potential; when applied potentials were higher than +0.6 V, the electrodes showed erratic behavior. Since substrate response increases with concentration, a value of 1.6×10^{-4} M of EPI was chosen, because this concentration gives a proper sensibility, and a very stable signal with very low noise. Upper concentrations produced higher noise on amperometric recording of calibration curves. Under the selected conditions the electrodes showed good performance. Calibration curves of Al(III) using SOD/AuNPs/SPC_{TTFE}s, SOD/PtNPs/SPC_{TTFE}s, SOD/PdNPs/SPC_{TTFE}s and SOD/RhNPs/SPC_{TTFE}s were obtained under the optimized conditions. Preliminary experiments showed that modification of electrode surface with NPs increased the sensitivity of the biosensor, therefore a thorough study of conditions of NPs deposi-

tion was carried out. AuNPs, PtNPs, PdNPs and RhNPs were deposited on electrodes surfaces accordingly to methods described in the experimental part.

8.3.2. XRF and SEM for NPs/SPC_{TFE} study. METHOD A:

Two different controlled potentials, +0.18 V and +0.3 V, were applied during 15 seconds to SPCEs in order to deposit NPs of every metal. X ray fluorescence emission (XRF) spectra were obtained from surfaces of SPC_{TFE}s modified with AuNPs, PtNPs, PdNPs and RhNPs.

Table 8.1 shows XRF percentage of elements deposited using the two controlled potentials indicated in method A. The plating of metals at +0.18 V during 15 seconds, produced a higher percent of Au, Pd and Rh; at +0.30 V Pt percent deposited was higher. Since the E_{ap} of +0.18 V applied during 15 seconds produced a higher percent for Pd, Rh and Au, and the application of +0.3 V did not deposited Pd or Au, conditions of E_{ap} of +0.18 V and 15 seconds of method A were selected. The inhibition calibration curves for SOD Al(III) at +0.18 V during 15 seconds are shown in Figure 8.3, where the lowest slope value corresponds to SPC_{TFE} without NPs deposited and the highest corresponds to SOD/AuNPs SPC_{TFE}. The sensitivity of Al(III) inhibition calibration curves of SPC_{TFE}s modified with AuNPs was better than SPC_{TFE}s modified with PdNPs, RhNPs and PtNPs, in this order. The SEM image of AuNPs obtained by method A deposited on SPC_{TFE} are presented in Figure 8.4.

Table 8.1. XRF percentage of element deposited on SPC_{TFE}s by method A and B.

Element	XRF %	XRF %	XRF %	XRF %
	(+0.18 V, 15 s)	(+0.30 V, 15 s)	CV1	CV2
Pd	0.136	0.0	0.557	0.632
Pt	0.223	1.479	2.740	2.711
Rh	0.693	0.380	4.491	2.954
Au	1.423	-	1.868	2.228

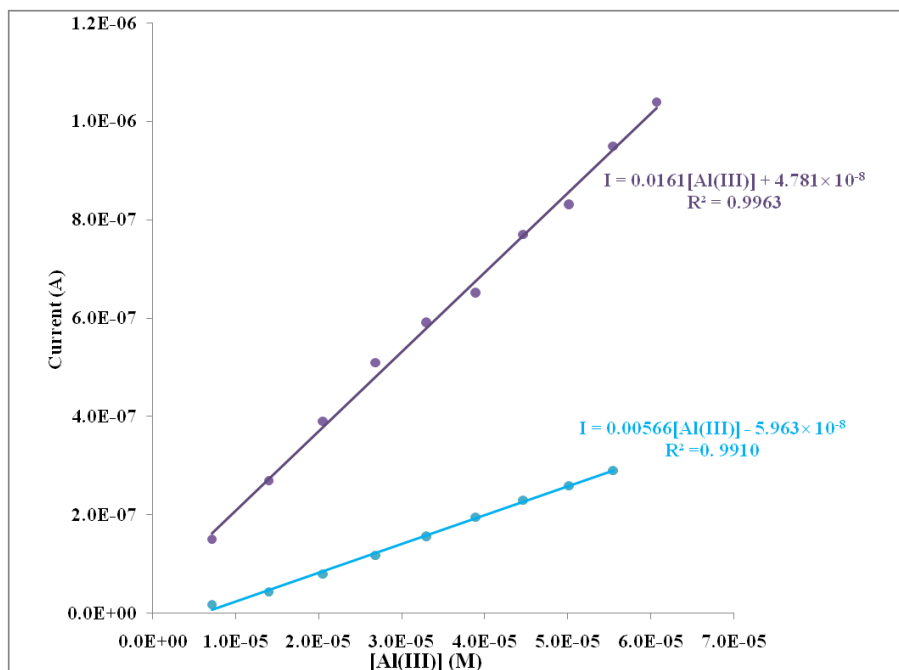


Figure 8.3. Calibration curves of Al(III) inhibition for (●)SOD/AuNPs/SPC_{TTFEs}, performed with NPs/SPC_{TTFEs} prepared by method A (0.18 V); (●)SPC_{TTFEs}, [EPI] = 1.6×10^{-4} M; Britton Robinson buffer pH 5.0; $E_{ap} = +0.2$ V vs. Ag/AgCl.

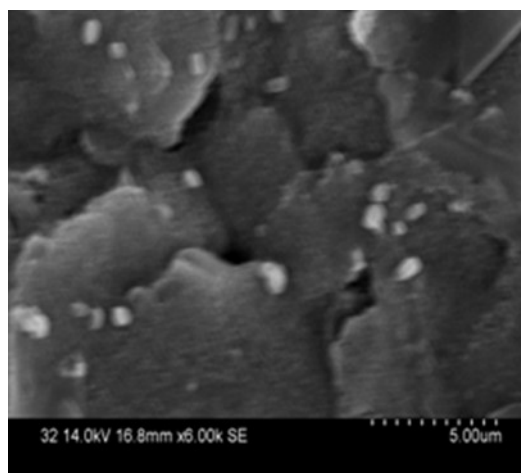


Figure 8.4. SEM image of AuNPs/SPC_{TTFE} deposited at 0.18 V during 15 seconds.

8.3.3. XRF and SEM for Nps/SPC_{TTFEs} study. METHOD B

The XRF percentages of every metal deposited with method B are shown in Table 8.1. SEM image of PdNPs/SPC_{TTFEs} CV2 conditions is shown in Figure 8.7, where it is observed that PdNPs are deposited on a regular form on SPC_{TTFEs} for the CV2

conditions. AuNPs, PtNPs, PdNPs and RhNPs were also deposited on SPC_{TTF}Es according to method B and modified with SOD. The best calibration curves recorded at conditions named CV1 and CV2 are depicted in Figure 8.5 and Figure 8.6 respectively for SOD/SPC_{TTF}Es modified with different metallic NPs. The calibration curves recorded with SOD/NPs/SPC_{TTF}Es prepared at CV2 conditions, showed higher slope values, particularly for PdNPs/SPC_{TTF}Es followed by RhNPs/SPC_{TTF}Es (Figure 8.6).

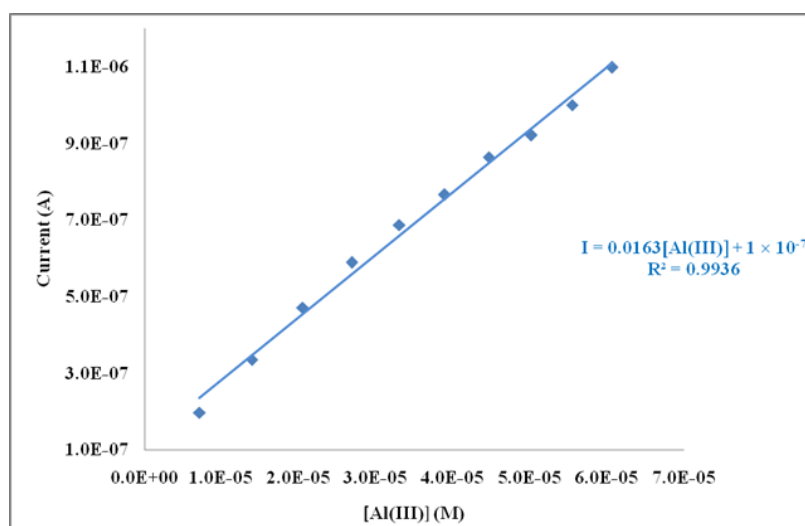


Figure 8.5. Calibration curve of Al(III) inhibition for, (♦)SOD/PtNPs/SPC_{TTF}Es, performed with Nps/SPC_{TTF}Es prepared under method B at CV1 conditions; [EPI] = 1.6×10^{-4} M, Britton Robinson buffer pH 5.0, E_{ap} = +0.2 V vs. Ag/AgCl.

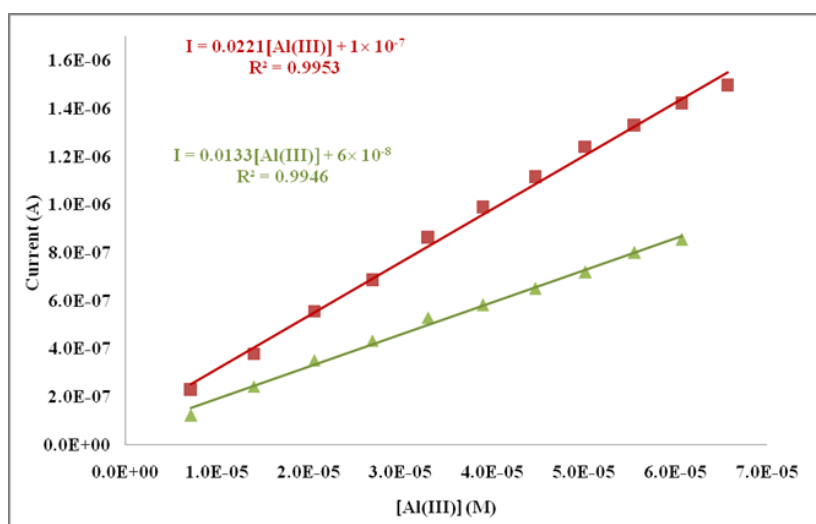


Figure 8.6. Calibration curves of Al(III) inhibition for (■)SOD/PdNPs/SPC_{TTF}Es, (▲)SOD/RhNPs/SPC_{TTF}Es, performed with NPs/SPC_{TTF}Es prepared by method B under CV2 conditions; [EPI] = 1.6×10^{-4} M, Britton Robinson buffer pH 5.0, E_{ap} = +0.2V vs. Ag/AgCl.

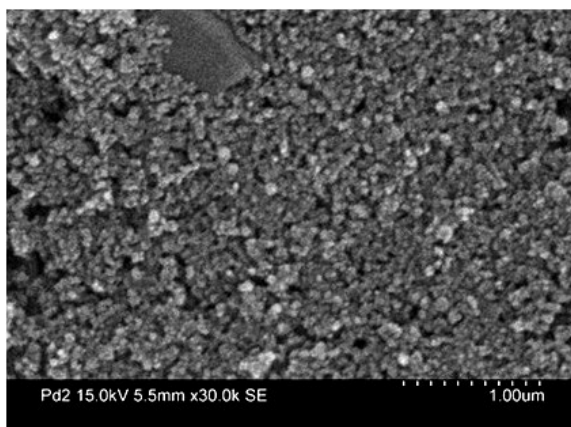


Figure 8.7. SEM image of PdNPs/SPC_{TTFE} prepared under method B, CV2 conditions.

8.3.4. AFM analysis of SPC_{TTFE}s prepared by method A and B

The AuNPs deposit on SPC_{TTFE} increases roughness of SPC_{TTFE} compared with control electrode, as observed clearly by the AFM images of the surfaces of AuNPs/SPC_{TTFE}s obtained by deposition of Au Nps at 0.18 V and 15 seconds (Figure 8.8), the highest slope presented for SOD/AuNps/ SPC_{TTFE}, in method A is supported by lower AFM parameters than CV1, CV2 conditions.

AFM images of PdNPs/SPC_{TTFE}s obtained by deposition of PdNPs at CV1 and CV2 conditions are shown in Figure 8.9. Analysis of AFM parameters confirmed that metal deposits were in nanometric size. Table.8.2 shows the most important parameters of NPs/SPC_{TTFE}s and SPC_{TTFE}s control electrode performed through tapping mode. Lower Roughness Average (RA) and Root Mean Square Roughness (RMS) were obtained for PdNPs/SPC_{TTFE}s, CV2, than for other SPC_{TTFE}s modified with metallic NPs, indicating that PdNPs/SPC_{TTFE}s, in CV2 conditions present a more homogeneous surface.

Considering RA, RMS and height of the highest peak above the mean line in the profile (Rmax), AFM image of PdNPs prepared by CV2 method showed more homogeneous surface when was compared with surface prepared by CV1 method. Analysis of AFM parameters suggests that that there is a modification of the surface due to NPs deposited on electrodes, compared with electrodes without any metallic deposits. All Roughness Kurtosis (RKu) values are near 3 providing evidence that the obtained values are close to a normal distributions [45].

Table 8.2. AFM parameters of modified SPC_{TTFE} s with metallic NPs.

NPs/ SPC_{TTFE} s	Method/Conditions	RA (nm)	RMS (nm)	Rmax (nm)	RKu
SPC_{TTFE}		16.4	12.8	131	4.3
AuNPs/ SPC_{TTFE}	A/ 0.18 V	31.3	39.2	218	3.3
AuNPs/ SPC_{TTFE}	B/ CV1	33.8	41.4	234	2.6
AuNPs/ SPC_{TTFE}	B/ CV2	34.6	44.5	303	3.2
PdNPs/ SPC_{TTFE}	B/ CV1	24.8	34.6	216	4.7
PdNPs/ SPC_{TTFE}	B/ CV2	14.7	18.2	106	2.7
PtNPs/ SPC_{TTFE}	B/ CV1	106	140	864	3.6
PtNPs/ SPC_{TTFE}	B/ CV2	106	140	864	3.6
RhNPs/ SPC_{TTFE}	B/ CV1	22.0	28.1	173	3.3
RhNPs/ SPC_{TTFE}	B/ CV2	25.6	33.9	204	3.6

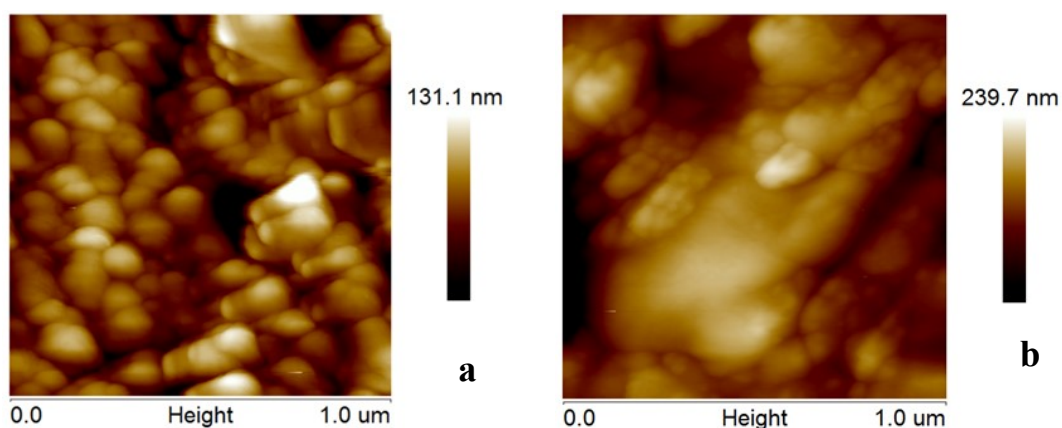


Figure 8.8. a. AFM image for SPC_{TTFE} control electrode and b. AFM image for AuNPs/ SPC_{TTFE} prepared by plating at 0.18 V during 15 seconds.

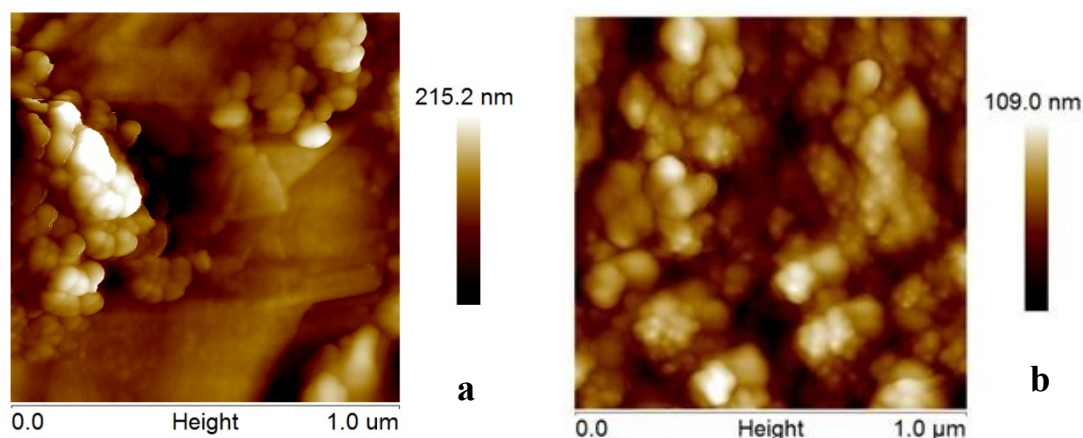


Figure 8.9. a. AFM image of PdNPs/SPC_{TTFE} prepared under method B, CV1 conditions and b. AFM image of PdNPs/SPC_{TTFE} prepared under method B, CV2 conditions.

Once AFM parameters of NPs/SPC_{TTFE}s were analyzed, it was observed that PdNPs/SPC_{TTFE}s modified by means of method B, CV2 conditions, showed lower RA and RMS values, indicating higher surface homogeneity. Therefore, it was decided to study the effect of this electrode on EPI response in presence of PdNPs and SOD enzyme, besides Al(III) inhibitory effect on SOD/NPs/SPC_{TTFE}s.

8.3.5. Inhibition behavior of Al(III) on SOD enzyme

Figure 8.10 shows amperometric recording of SOD/AuNps/SPC_{TTFE}s (obtained under method A); Figure 8.11 shows amperometric recording of SOD/PdNps/SPC_{TTFE}s (obtained by method B, CV2 conditions) respectively. Michaelis Menten Km apparent values estimated by Lineweaver-Burk plot, were obtained in presence and absence of Al(III) with SPC_{TTFE}s modified with AuNps, PtNps, RhNps, PdNps, prepared under the best conditions for each one of NPs deposition methods used, 0.18 V for method A and CV2 conditions for method B.

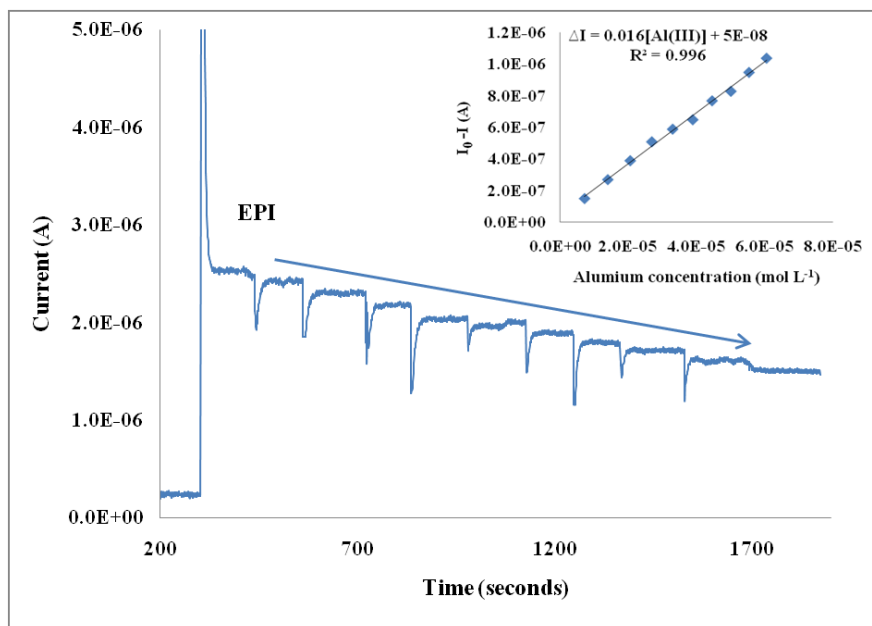


Figure 8.10. Amperometric recording performed with an SOD/AuNPs/SPC_{TTFE} prepared under method A, [EPI] = 1.6×10^{-4} M and consecutive additions of 100 μL of Al(III) 3.7×10^{-4} M into the cell, Britton Robinson buffer pH 5.0, $E_{\text{ap}} = +0.20$ V vs. Ag/AgCl. Inset: calibration curve corresponding to this amperogram.

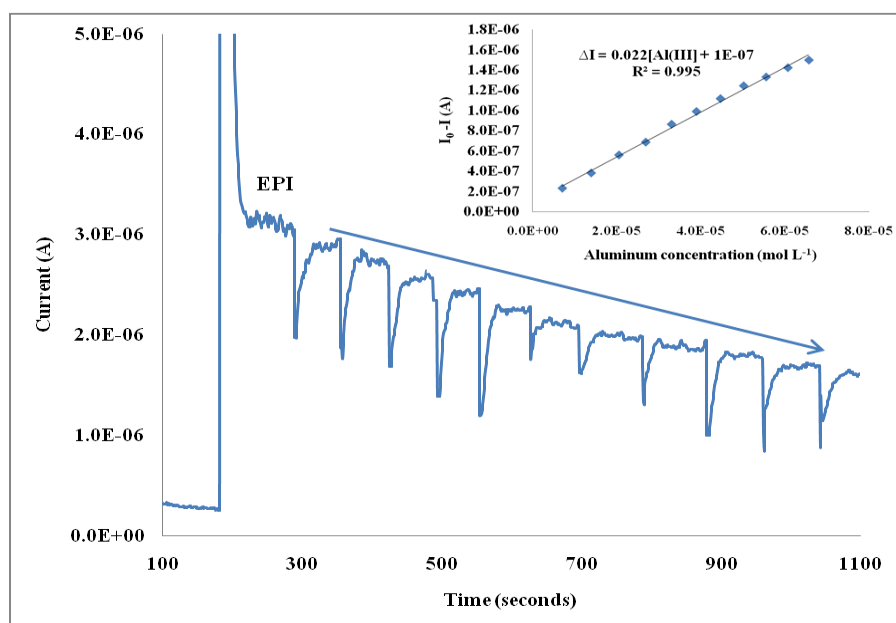


Figure 8.11. Amperometric recording performed with SOD/PdNPs/SPC_{TTFE}, prepared under method B, CV2 conditions, [EPI] = 1.6×10^{-4} M and consecutive additions of 100 μL of Al(III) 3.7×10^{-4} M into the cell, Britton Robinson buffer pH 5.0, $E_{\text{ap}} = +0.20$ V vs. Ag/AgCl. Inset: calibration curve corresponding to this amperogram.

The inhibitory effect is confirmed through the increasing $K_m(\text{app})$ values with the increasing Al(III) concentration. However the last measurement for SOD/RhNPs/SPC_{TTF}Es, displayed an unusual behavior. Table 8.3 shows K_m apparent values for SOD/SPC_{TTF}Es modified with AuNPs, PtNPs, RhNPs, PdNPs.

Table 8.3. K_m apparent values for SPC_{TTF}Es modified with AuNPs, PtNPs, RhNPs, PdNPs.

K_m apparent (M)	SOD/AuNPs/ SPC_{TTF}Es	SOD/PtNPs/ SPC_{TTF}Es	SOD/PdNPs/ SPC_{TTF}Es	SOD/RhNPs/ SPC_{TTF}Es
Method A 0.18 V				
Without Al	7.81×10^{-4}	1.17×10^{-4}	1.51×10^{-3}	3.26×10^{-3}
Al(III) 7.25×10^{-6} M	1.31×10^{-3}	1.43×10^{-2}	1.02×10^{-2}	1.42×10^{-2}
Al(III) 2.18×10^{-5} M	3.65×10^{-3}	1.83×10^{-2}	1.26×10^{-2}	
Method B, CV2 conditions				
Without Al	3.08×10^{-3}	5.80×10^{-4}	3.00×10^{-3}	1.20×10^{-4}
Al(III) 7.25×10^{-6} M	1.27×10^{-3}	1.34×10^{-3}	1.33×10^{-2}	6.39×10^{-3}
Al(III) 2.18×10^{-5} M	3.05×10^{-3}	3.04×10^{-3}	2.32×10^{-2}	5.41×10^{-3}

8.4. Validation of SOD/PdNps/SPC_{TTF}E based biosensor

SOD/PdNps/SPC_{TTF}Es was selected to perform validation of the developed biosensor. The selection was based on the Al(III) inhibition calibration curves of SOD enzyme, that clearly showed higher sensibility by modifying SPC_{TTF}Es with PdNPs prepared under method B, CV2 conditions than the other metallic NPs.

8.4.1. Limit of detection.

Limit of detection (LOD) is the least amount of analyte that can be determinate with a level of certainty previously established. LOD is usually estimated from calibration curves. The limit of detection under the optimum working conditions (2.0 ± 0.1) μM was calculated from the standard deviation (Sy/x) of five Al(III) inhibition calibration curves accordingly with the criteria $3Sy/x$, [46], its RSD was 7.9 %. Analogous to LOD, quantification limit (LOQ) was estimated under optimal conditions from the standard deviation of five Al(III)inhibition calibration curves using the criteria $10Sy/x$, its value was (6.7 ± 0.5) μM , with a RSD of 7.9 %. Parameters of inhibition

calibration curves performed to estimate LOD and LOQ and their values are shown in Table 8.4.

Table 8.4. Parameters of Al(III) inhibition calibration curves performed in order to estimate method LOD and LOQ of SOD/PdNPs/_{TTF} SPC_{TTF}Es based biosensor.

Calibration	Slope [A/M]	Intercept (A)	Sy/x	R ²	LOD (M)	LOQ (M)
I	0.02655	6.65×10^{-7}	1.6×10^{-8}	0.996	1.8×10^{-6}	5.9×10^{-6}
II	0.02487	1.35×10^{-7}	1.8×10^{-8}	0.994	2.2×10^{-6}	7.3×10^{-6}
III	0.03269	5.26×10^{-7}	2.1×10^{-8}	0.995	2.0×10^{-6}	6.5×10^{-6}
IV	0.03288	5.21×10^{-7}	2.3×10^{-8}	0.993	2.1×10^{-6}	6.9×10^{-6}
V	0.02283	5.34×10^{-8}	1.6×10^{-8}	0.995	2.1×10^{-6}	7.1×10^{-6}
Mean					2.0×10^{-6}	6.7×10^{-6}
SD					1.6×10^{-7}	5.3×10^{-7}
RSD					7.9	7.9

8.4.2. Precision

This parameter is usually calculated in terms of reproducibility and repeatability. Repeatability was assessed using the same electrode surface. In this way, successive calibrations for Al(III) were tested with SOD/PdNPs/SPC_{TTF}Es prepared under CV2 conditions. The electrodes were conditioned in a Britton Robinson buffer solution, pH 5.0, stirring for 5 min, between experiments.

The RSD obtained for the slopes of the first two graphs was 5.1%, but in the third measurement a decrease on the biosensor sensitivity and a RSD increase, reaching 15%, were observed. Because the electrodes are disposables, the reproducibility is a better estimate of performance. Likewise, the reproducibility of the amperometric signal was checked using the slopes of five regression lines carried out with different electrode surfaces. Table 8.5 shows the parameters of calibration curves and slope estimation, whereas the RSD slope value was 7.0%. These results suggest that the fabrication procedure of the SOD/PdNPs/SPC_{TTF}Es based biosensors is reliable and allows reproducible amperometric responses to be obtained with different electrodes constructed using the method described in this work.

Table 8.5. Parameters of Al(III) inhibition calibration curves performed in order to estimate reproducibility of SOD/PdNPs/TFE SPC_{TFE}s based biosensors.

Calibration	Slope [A/M]	Intercept (A)	S _{y/x}	R ²
I	0.02655	6.65×10 ⁻⁷	1.6×10 ⁻⁸	0.996
II	0.02319	1.80×10 ⁻⁷	4.0×10 ⁻⁸	0.992
III	0.02487	1.35×10 ⁻⁷	1.8×10 ⁻⁸	0.994
IV	0.02283	5.34×10 ⁻⁸	1.6×10 ⁻⁸	0.995
V	0.02214	9.62×10 ⁻⁸	3.1×10 ⁻⁸	0.995
Mean	0.02436			
SD	1.7×10 ⁻³			
RSD	7.0			

8.4.3. Accuracy

The accuracy of the developed method was tested by a recovery study in which a known amount of Al(III) standard reference material (SRM), SRM High Purity Standards solution (Lot Number 1121015, (1000 ± 3) mg L⁻¹) was spiked to a buffer solution. Calibration parameters used to calculate recovery are shown in Table 8.6.

Table 8.6. Parameters of Al(III) inhibition calibration curves performed to calculate recovery of SRM spiked to a buffer solution.

Calibration	Slope [A/M]	Intercept (A)	S _{y/x}	R ²
I	0.0233	5.11×10 ⁻⁸	3.2×10 ⁻⁸	0.990
II	0.0382	3.01×10 ⁻⁷	4.1×10 ⁻⁸	0.991
III	0.0299	5.38×10 ⁻⁷	3.3×10 ⁻⁸	0.991
IV	0.0279	3.85×10 ⁻⁸	3.4×10 ⁻⁸	0.992
V	0.0380	7.78×10 ⁻⁸	4.9×10 ⁻⁸	0.990
VI	0.0207	4.22×10 ⁻⁸	2.7×10 ⁻⁸	0.991

The aluminum average concentration quantified by the developed procedure, (1047 ± 53) mg/L (n =6; α = 0.05), matches the certified value of the sample considering the associated uncertainty. The mean recovery percentage obtained was (102.4 ± 2.5).

Results indicate that developed SOD/PdNPs/TF SPC_{TF}Es biosensors can be applied to Al(III) determination in aqueous solutions. Recovery values are shown in Table 8.7.

Table 8.7. Recovery of Al(III) SRM (1000 ± 3) mg/L spiked to buffer solution.

Added SRM (M)	Found SRM (M)	FD (5700/200) (M)	mg/L	SRM FD (100)	Recovery %
1.290×10^{-5}	1.23×10^{-5}	3.506×10^{-4}	9.46	946	97.6
	1.43×10^{-5}	4.068×10^{-4}	10.98	1098	104.9
	1.37×10^{-5}	3.894×10^{-4}	10.51	1051	102.5
	1.37×10^{-5}	3.894×10^{-4}	10.51	1051	102.6
	1.37×10^{-5}	3.917×10^{-4}	10.58	1058	102.9
	1.40×10^{-5}	3.995×10^{-4}	10.79	1079	103.9
			Mean	1047	102.4
			SD	52.7	2.5
			RSD	5.0	2.5

8.4.4. Study of interferences on SOD/PdNps/SPC_{TF}E biosensor

Interference study was performed comparing the percentage of inhibition showed by the developed SOD based biosensor in the presence of aluminum and other foreign ions. Three concentration levels were tested, namely 1×10^{-3} M, 1×10^{-4} M and 1×10^{-6} M. As it can be seen in Figure 8.12, the highest interference effect was found for Hg(II), Sn(II) and Mo(VI) for the lowest level of concentration tested, but these toxic ions should not be naturally present in water. Ca(II), Mg(II) and Fe(III), usually found in water are no interfering. At level of 10^{-4} M and 10^{-3} M, most interfering ions are Sn(II), Cd(II) and Mo(VI). Al(III) showed inhibition on SOD enzyme at all tested concentrations.

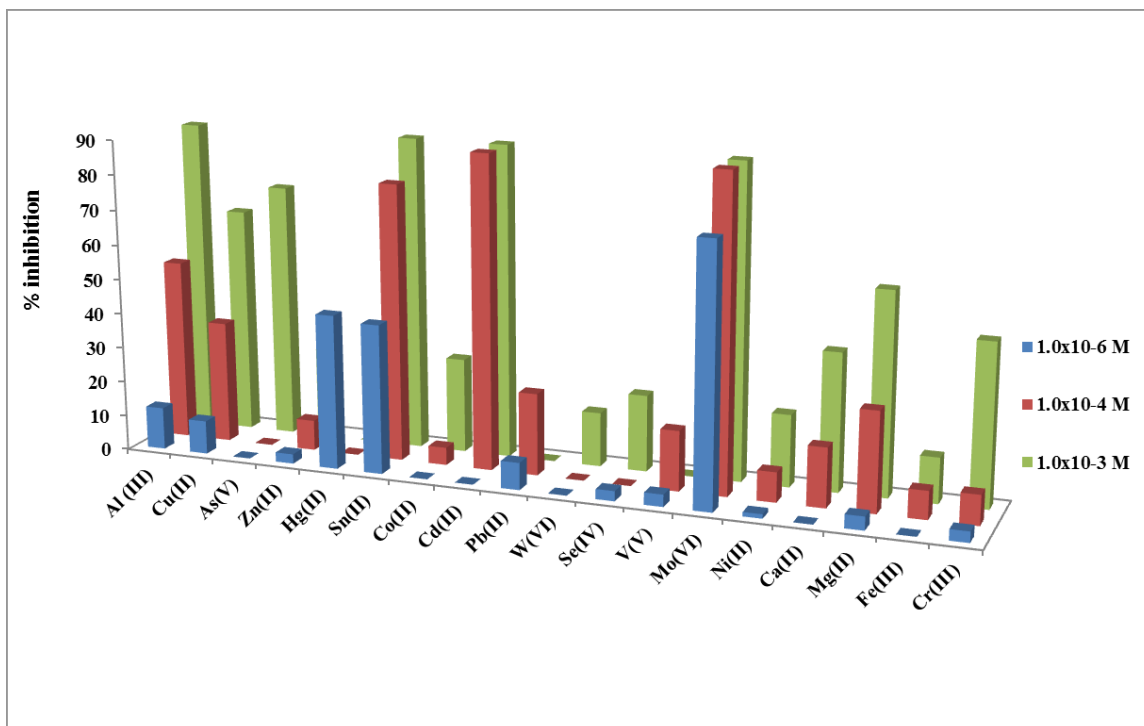


Figure 8.12. Inhibition percentage of current at SOD/PdNPs/SPC_{TTFE}, (method B, CV2 conditions) in presence of: Al(III), Cu(II), As(V), Zn(II), Hg(II), Sn(II), Co(II), Cd(II), Pb(II), W(VI), Se(IV), V(V), Mo(VI), Ni(II), Ca(II), Mg(II), Fe(III) and Cr(III) at three concentration levels; [EPI] = 1.6×10^{-4} M ; Britton Robinson buffer pH 5.0, $E_{ap} = +0.2V$ vs. Ag/AgCl.

8.5. Conclusions

A novel amperometric biosensor based on SOD/PdNPs/SPC_{TTFE} was developed, validated and applied to Al(III) determination in aqueous matrixes. The biosensor was based on inhibitory effect of Al(III) increasing concentrations on SOD enzyme and presents fast response, very good reproducibility, stability and low LOD. The calculated Michaelis Menten constants from Lineweaver-Burk plots showed increasing values with Al(III) concentration; and increasing K_m apparent values; supporting the role of Al(III) as an SOD inhibitor.

SOD enzyme immobilization was easily and rapidly achieved with glutaraldehyde and allowed to obtain a good reproducibility value.

Modification of SPC_{TTFE}s with PdNPs improves biosensor performance when compared with the other metallic NPs. A study of electrolytic generation conditions of

NPs of Au, Pt, Rh and Pd onto SPC_{TTFE} surface was carried out and results showed that SPC_{TTFE}s modified with PdNPs by means of cyclic voltammetry under method B, CV2 conditions: delay time 120 s, step potential, 0.025V, scan rate 0.1V/s) gave a higher sensibility on amperometric inhibition of Al(III) calibration curves.

SEM images showed presence of the metallic NPs deposited on SPC_{TTFE}s. The XRF study conducted led to evaluate percentages of every metal deposited on SPC_{TTFE}s. In addition, AFM performed study showed roughness, characteristic of SPC_{TTFE}s and NPs/SPC_{TTFE}s surfaces, and provided useful information about morphology and surface homogeneity. It was also found that PdNPs/SPC_{TTFE}s deposited by method B, CV2 conditions (delay time 120 s, step potential, 0.025 V, scan rate 0.1V/s) had lower RA, RMS and Rmax than other metallic NPs deposited.

Biosensor validation was performed under optimized conditions: pH 5.0, applied potential of 0.2 V and a concentration of EPI of 1.6×10^{-4} M. Under these conditions, the LOD of the developed method allowed to quantify Al(III) at low concentrations. The recovery value obtained using certified material, supported the feasibility of SOD/PdNPs/SPC_{TTFE}s based biosensor for Al(III) determination.

This new biosensor presents LOD similar to the other Al(III) biosensors developed, but it has the advantage of a low applied potential of only +0.2 V. The use this biosensor at such low potential, results on a notoriously higher selectivity compared with other Al(III) biosensors.

8.6. References

1. C. Exley, The coordination chemistry of aluminum in neurodegenerative disease. *Coordin. Chem. Rev.*, 256 (2012) 2142–2146.
2. R.W. Shin, Aluminum modifies the properties of Alzheimer's disease PHF tau proteins in vivo and in vitro. *J.Neurosci.*, 14 (1994) 7221–7233.
3. P. Zatta, D. Drago, S. Bolognin, S.L. Sensi, Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. *Trends in Pharmacol. Sci.*, 30 (2009) 346–353.

4. Z. Wu, Y. Du, H. Xue, Y. Wu, B. Zhou, Aluminum induces neurodegeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production. *Neurobiol. Aging*, 33 (2012) 199.e1–199.e12.
5. Y. Tian, L. Mao, T. Okajima, T. Ohsaka, Superoxide Dismutase-Based Third-Generation Biosensor for Superoxide Anion. *Anal. Chem.*, 74 (2002) 2428–2434.
6. M.A. Rahman, A. Kothalam, E. S. Choe, M.S. Won, Y.B. Shim, Stability and Sensitivity Enhanced Electrochemical In Vivo Superoxide Microbiosensor Based on Covalently Co-immobilized Lipid and Cytochrome c. *Anal. Chem.*, 84 (2012) 6654–6660.
7. G.S. Wilson, M.A. Johnson, In-Vivo Electrochemistry: What Can We Learn about Living Systems? *Chem. Rev.*, 108 (2008) 2462–2481.
8. X. Luo, S. Jia, Q. Ma, M. Zhong, P. Gao, Z. Yu, Y. Zhang, Suppressive Effects of Subchronic Aluminum Overload on the Splenic Immune Function May Be Related to Oxidative Stress in Mice. *Biol Trace Elem. Res.*, 157 (2014) 249–255.
9. D.K. Joshi, S. Tripathi, S. Kulshrestha, A.A. Mahdi, Docosahexaenoic acid ameliorates aluminum induced biochemical and morphological alteration in rat cerebellum. *Annals Neurosci.*, 21 (2014) 5–9.
10. A.C Razo-Estrada, S. García-Medina, E. Madrigal-Bujaidar, L.M Gómez-Oliván, M. Galar-Martínez, Aluminum-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in Liver of the Common Carp, *Cyprinus carpio*. *Water Air Soil Poll.*, 224 (2013) 1510–1518.
11. P. Bhasin, N. Singla, D.K. Dhawan, Protective role of zinc during aluminum-induced hepatotoxicity: Hepatoprotective Role of Zinc. *Environ. Toxicol.*, 29 (2014) 320–327.
12. D. Viezeliene, P. Beekhof, E. Gremmer, H. Rodovicius, I. Sadauskiene, E. Jansen, L. Ivanov, Selective induction of IL-6 by aluminum-induced oxidative stress can be prevented by selenium. *J. Trace Elem. Med. Bio.*, 27 (2013) 226–229.
13. S. Sivakumar, Ch.P. Khatiwada, J. Sivasubramanian, B. Raja, Protective Effects of Deferiprone and Desferrioxamine in Brain Tissue of Aluminum Intoxicated Mice: An FTIR Study. *Biomed. Preventive Nutr.*, 4 (2014) 53–61.

14. L. Yu, R. Jiang, Q. Su, H. Yu, J. Yang, Hippocampal neuronal metal ion imbalance related oxidative stress in a rat model of chronic aluminum exposure and neuroprotection of meloxicam. *Behav. Brain Funct.*, 10 (2014) 6–10.
15. A. Jelenković, M.D. Jovanović, I. Stevanović, N. Petronijević, D. Bokonjić, J. Živković, R. Igić, Influence of the Green Tea Leaf Extract on Neurotoxicity of Aluminium Chloride in Rats: Green Tea and Aluminium Neurotoxicity. *Phytother. Res.*, 28 (2014) 82–87.
16. X. Li, Y. Han, Y. Guan, L. Zhang, C. Bai, Y. Li, Aluminum Induces Osteoblast Apoptosis Through the Oxidative Stress-Mediated JNK Signaling Pathway. *Biol. Trace Elem. Res.*, 150 (2012) 502–508.
17. H. Celik, N. Celik, A. Kocyigit, M. Dikilitas, The relationship between plasma aluminum content, lymphocyte DNA damage, and oxidative status in persons using aluminum containers and utensils daily. *Clin. Biochem.*, 45 (2012) 1629–1633.
18. M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Screen-printed biosensors in microbiology; a review. *Talanta*, 82 (2010) 1629–1636.
19. S. Andreescu, J. Njagi, C. Ispas C, The New Frontiers of Organic and Composite Nanotechnology. Nanostructured Materials for Enzyme Immobilization and Biosensors. Department of Chemistry and Biomolecular Science, Clarkson University, Potsdam, New York, (2008) 355–394.
20. W. Siangproh, W. Dungchai, P. Rattanarat, O. Chailapakul, Nanoparticle-based electrochemical detection in conventional and miniaturized systems and their bioanalytical applications: A review. *Anal. Chim. Acta*, 690 (2011) 10–25.
21. T. Xia, M. Kovoichich, J. Brant, M. Hotze, J. Sempf, T. Oberley, C. Sioutas, J. I. Yeh, M.R. Wiesner, A.E. Nel, Comparison of the Abilities of Ambient and Manufactured Nanoparticles To Induce Cellular Toxicity According to an Oxidative Stress Paradigm. *Nano Lett.*, 6 (2006) 1794–1807.
22. O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta*, 73 (2007) 202–219.
23. O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, P. Recio-Cebrián, M.J. Arcos-Martínez, Screen-printed acetylcholinesterase-based biosensors for inhibitive determination of permethrin. *Sci. Total Environ.*, 426 (2012) 346–350.

24. X. Dai, O. Nekrassova, M.E. Hyde, R.G. Compton, Anodic Stripping Voltammetry of Arsenic(III) Using Gold Nanoparticle-Modified Electrodes. *Anal. Chem.* 76 (2004) 5924–5929.
25. S. Sanllorrente-Méndez, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Determination of Arsenic(III) Using Platinum Nanoparticle-Modified Screen-Printed Carbon-Based Electrodes. *Electroanalysis*, 21 (2009) 635–639.
26. M.A. Alonso-Lomillo, C. Yardimci, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, CYP450 2B4 covalently attached to carbon and gold screen printed electrodes by diazonium salt and thiols monolayers. *Anal. Chim. Acta*, 633 (2009) 51–56.
27. O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Anodic stripping voltammetry of antimony using gold nanoparticle-modified carbon screen-printed electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 589 (2007) 255–260.
28. D. Dua, J. Ding, J. Cai, J. Zhang, L. Liu, *In situ* electrodeposited nanoparticles for facilitating electron transfer across self-assembled monolayers in biosensor design. *Talanta*, 74 (2008) 1337–1343.
29. L. Del Torno-de Román, M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, C. Merino-Sánchez, M.P. Merino-Amayuelas, M.J. Arcos-Martínez, Fabrication and characterization of disposable sensors and biosensors for detection of formaldehyde. *Talanta*, 86 (2011) 324–328.
30. J. Huang, Y. Liu, H. Hou, T. You, A carbon nanofiber based biosensor for simultaneous detection of dopamine and serotonin in the presence of ascorbic acid. *Biosens. Bioelectron.*, 24 (2008) 632–637.
31. E. Araque, C.B. Arenas, M. Gamella, J. Reviejo, R. Villalonga, J.M. Pingarrón, Graphene–polyamidoamine dendrimer–Pt nanoparticles hybrid nanomaterial for the preparation of mediatorless enzyme biosensor. *J. Electroanal. Chem.*, 717–718 (2014) 96–102.
32. S.Q. Wang, L.P. Lu, X.Q. Lin, A selective voltammetric method for uric acid detection at a glassy carbon electrode modified with electrodeposited film containing DNA and Pt-Fe₂O₃ nanocomposites. *Electroanalysis*, 16 (2004) 1734–1738.
33. S. Thiagarajan, R.F. Yang, S.M. Chen, Palladium nanoparticles modified electrode for the selective detection of catecholamine neurotransmitters in presence of ascorbic acid. *Bioelectrochemistry*, 75 (2009) 163–169.

34. N.F. Atta, M.F. El-Kady, Novel poly (3-methylthiophene)/Pd, Pt nanoparticle sensor: Synthesis, characterization and its application to the simultaneous analysis of dopamine and ascorbic acid in biological fluids. *Sens. Actuat. B*, 145 (2010) 299–310.
35. Q.J. Ting, J.F. Liao, Y.S. Li, J.R. Peng, W.T. Li, B.Y. Chu, H. Li, Y.Q. Wei, Z.Y. Qian, Label-Free alpha feto protein immunosensor established by the facile synthesis of a palladium–graphene nanocomposite. *Biosens. Bioelectron.*, 61 (2014) 245–250.
36. G. Vitulli, C. Evangelisti, P. Pertici, A.M. Caporusso, N. Panziera, P. Salvadori, M.G. Faga, Ch. Manfredotti, G. Martra, S. Coluccia, A. Balerna, S. Colonna, S. Mobilio, Supported rhodium nanoparticles in catalysis: the role of stabilizers on catalytic activity and structural features. *J. Organomet. Chem.*, 681 (2003) 37–50.
37. R. Zapf, R. Thiele, M. Wichert, M. O’Connell, A. Ziogas, G. Kolb, Application of rhodium nanoparticles for steam reforming of propane in microchannels. *Catal. Commun.*, 41 (2013) 140–145.
38. K.S. Lokesh, Y. Shivaraj, B.P. Dayananda, S. Chandra, Synthesis of phthalocyanine stabilized rhodium nanoparticles and their application in biosensing of cytochrome c. *Bioelectrochemistry*, 75 (2009) 104–109.
39. S. Chandra, K.S. Lokesh, A. Nicolai, H. Lang, Dendrimer-rhodium nanoparticle modified glassy carbon electrode for amperometric detection of hydrogen peroxide. *Anal. Chim. Acta*, 632 (2009) 63–68.
40. S. Poorahong, P. Santhosh, G. Valdés, T.F. Tseng, J.I. Wong, P. Kanatharan, P. Thavarungkul, J. Wang, Development of amperometric α -ketoglutarate biosensor based on ruthenium–rhodium modified carbon fiber enzyme microelectrode. *Biosens. Bioelectron.*, 26 (2011) 3670–3673.
41. D. Xuan, O. Nekrassova, M.E. Hyde, R.G. Compton, Anodic Stripping Voltammetry of Arsenic(III) Using Gold Nanoparticle-Modified Electrodes. *Anal. Chem.*, 76 (2004) 5924–5929.
42. S. Thiagarajan, R.F. Yang, S.M. Chen. Palladium Nanoparticles Modified Electrode for the Selective Detection of Catecholamine Neurotransmitters in Presence of Ascorbic Acid. *Bioelectrochemistry*, 75 (2009) 163–169.

43. G.S. Nunes, G. Jeanty, J.L. Marty, Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides. Comparative study. *Anal. Chim. Acta*, 523 (2004) 107–115.
44. M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Enzyme Modified Screen Printed Electrodes in Biosensors: Properties, Materials and Applications. Nova Publishers, New York, (2009).
45. J.R. Evans, D.L. Olson, Introduction to Simulation and Risk Analysis. Chapter 3. Prentice Hall Inc, New Jersey, (1998).
46. J.N. Miller, J.C. Miller, Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Cuarta Edición. Prentice Hall, Madrid, (2002).



9. Conclusiones

9. Conclusiones

De los resultados de los capítulos precedentes se extraen las siguientes conclusiones:

1. La versatilidad de los electrodos serigrafiados permitió modificar su superficie con tres enzimas, α -quimotripsina, AChE y SOD, empleando tres diferentes métodos de inmovilización, la enzima α -quimotripsina se inmovilizó por medio de encapsulación-polimerización con PVA, la AChE por medio de enlace covalente con una carbodiimida, y la SOD por entrecruzamiento con glutaraldehído.
2. Todos los procedimientos de inmovilización empleados fueron muy simples, rápidos y proporcionaron a los electrodos modificados estabilidad apropiada que permitió obtener muy buenos parámetros de desempeño para los biosensores desarrollados.
3. Cuatro biosensores fueron desarrollados y validados con α -quimotripsina, AChE y SOD y aplicados a la determinación de Al(III) en matrices acuosas a niveles de concentración μM con bajos LOD.
4. Se emplearon dos sustratos con α -quimotripsina, estos fueron BTEE y ATEE, mostrando el sustrato ATEE una mayor sensibilidad en las curvas de calibración de Al(III) y mas bajo LOD que el BTEE, con AChE y SOD se usaron ATI y EPI respectivamente con LOD similares.
5. Los sustratos de las enzimas (BTEE, ATEE, ATI, EPI) mostraron inhibición cuantitativa con concentraciones crecientes de Al(III) de acuerdo con las $K_m(\text{app})$ de inhibición estimadas para los biosensores desarrollados.
6. Para el biosensor de α -quimotripsina/AuNPs/SPCEs/BTEE, el proceso óptimo de inmovilización fue obtenido mezclando 15 μL de una disolución de la enzima de 30 mg mL^{-1} , 7.5 μL de disolución de BSA 1.7% (m/v), 9 μL de una disolución de PVA 5% (m/v) y 7.5 μL de una disolución reguladora Britton Robinson de pH 7.8; 10 μL de la mezcla y 3 μL de enzima se vertieron sobre el electrodo de trabajo.
7. Para el biosensor de α -quimotripsina/AuNPs/SPCEs/BTEE, las condiciones experimentales óptimas se obtuvieron a 0.8 V, pH 6.8 y [BTEE] 0.286 mM en la celda electroquímica.
8. Para el biosensor de α -quimotripsina/AuNPs/SPCEs/BTEE, el LOD de 3.6×10^{-6} M con 8.3% de RSD, la repetibilidad con 5% de RSD, la reproducibilidad con 6.4% de RSD y la exactitud de 100.9% con 4.4% de RSD permiten la determinación de bajas concentraciones de Al(III) en agua potable.
9. Para el biosensor de α -quimotripsina/AuNPs/SPCEs/ATEE el óptimo procedimiento de inmovilización fue obtenido mezclando 40 μL de una disolución de enzima de 30 mg mL^{-1} , 20 μL de disolución de BSA 1.7% (m/v), 24 μL de PVA

- 5% (m/v) y 20 μL de disolución reguladora Britton-Robinson de pH 7.8; 10 μL de la mezcla y 3 μL de enzima se vertieron sobre el electrodo de trabajo.
10. Para el biosensor de α -quimotripsina/AuNPs/SPCEs/ATEE, las condiciones experimentales óptimas se obtuvieron a 0.7 V, pH 7.8, 40 mM CaCl_2 y una [ATEE] 0.196 mM en celda.
 11. Para el biosensor de α -quimotripsina/AuNPs/SPCEs/ATEE, el LOD de 1.5×10^{-6} M con 11.7% de RSD, la repetibilidad con 8.2% de RSD, la reproducibilidad con 6.6% de RSD y la exactitud de 102.6% con 4.4% de RSD, permiten la determinación de bajas concentraciones de Al(III) en vino blanco.
 12. Para el biosensor de AChE/AuNPs/SPCEs/ATI, el óptimo procedimiento de inmovilización se obtuvo colocando 5 μL de ciclohexil-N-2-morfolin etil carbodiimida metil-*p*-tolueno sulfonate 0.07 M en disolución reguladora Britton Robinson de pH 7.0 sobre el electrodo de trabajo, transcurridos 80 minutos; 5 μL de disolución de enzima de 300 mg/mL en Britton Robinson de pH 7.0 se colocaron sobre el electrodo de trabajo.
 13. Para el biosensor de AChE/AuNPs/SPCEs/ATI, las condiciones experimentales óptimas se obtuvieron a 0.8 V, pH 7.8, [ATI] 0.234 mM en celda.
 14. Para el biosensor de AChE/AuNPs/SPCEs/ATI, el LOD de 2.1×10^{-6} M con 5.7% de RSD, la reproducibilidad con 3.3% de RSD y la exactitud de 101.2% con 7.2% de RSD permiten la determinación de bajas concentraciones de Al(III) en muestras de agua potable.
 15. Para el biosensor de SOD/PdNPs/SPC_{TTF}E/EPI, el procedimiento óptimo de inmovilización fue obtenido mezclando 20 μL de disolución de SOD 5.9 mg/mL, 10 μL de BSA 1.69% m/v y 10 μL de glutaraldehído 2.5% v/v; 10 μL de la mezcla se vertieron sobre el electrodo de trabajo.
 16. Para el biosensor de SOD/PdNPs/SPC_{TTF}E/EPI, las condiciones experimentales óptimas se obtuvieron a 0.2 V, pH 5.0, [EPI] 0.167 mM en celda.
 17. Para el biosensor de SOD/PdNPs/SPC_{TTF}E/EPI, el LOD de 2.0×10^{-6} M con 7.9% de RSD, la reproducibilidad con 7.0% de RSD y la exactitud de 102.4% con 2.5% de RSD permiten la determinación de bajas concentraciones de Al(III) en agua potable.
 18. La determinación amperométrica de Al(III) con SOD/PdNPs/SPC_{TTF}E, se realizó a potencial mas bajo que los otros biosensores desarrollados, mejorando la selectividad de este biosensor.
 19. La incorporación de TTF en la tinta de carbón simplifica la fabricación del biosensor de SOD/PdNPs/SPC_{TTF}E desarrollado.

20. El electrodo de SOD/PdNPs/SPC_{TTFE} fue caracterizado por medio de sus parámetros de AFM, porcentajes de metales depositados por XRF, las fotografías de SEM mostraron la presencia de nanopartículas. Las curvas de calibración realizadas con el biosensor de SOD/PdNPs/SPC_{TTFE} mostraron pendiente mayor que la de los biosensores de SOD con AuNPs, PtNPs y RhNPs.
21. Se emplearon diferentes métodos para obtener NPs de Au y Pd sobre los SPC_{TTFE}s; las mejores condiciones para depositar NPs de Au sobre la superficie del electrodo de trabajo fueron obtenidas por aplicación de un potencial de 0.18 V durante 15 segundos bajo agitación empleando una disolución de H₂SO₄ 0.1 mM en H₂SO₄ 0.5 M.
22. Las mejores condiciones para obtener NPs de Pd fueron la voltametría cíclica, realizada por medio de siete barridos consecutivos entre +1 y -0.2 V en una celda de cuarzo conteniendo disolución de paladio 0.10 mM en H₂SO₄ 0.5 M, los electrodos fueron preparados bajo las condiciones denominadas CV2: tiempo de espera 120 s, pulso de potencial 0.025 V, velocidad de barrido 0.1V/s. Las NPs de Pd se perfilan como una interesante alternativa a las AuNPs debido a su actividad catalítica.

