



Universidad de Burgos

Departamento de Química

Área de Química Analítica

***DETERMINACIÓN
ELECTROQUÍMICA DE VANADIO
Y TUNGSTENO EN AGUAS CON
ELECTRODOS SERIGRAFIADOS
MODIFICADOS CON
NANOMATERIALES Y ENZIMAS***

Ana Lorena Alvarado Gámez

Burgos 2016

Tesis Doctoral



ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE BURGOS

Memoria de investigación titulada ***“Determinación Electroquímica de Vanadio y Tungsteno en Aguas con Electroodos Serigrafiados Modificados con Nanomateriales y Enzimas”*** presentada para optar al Grado de Doctora en la Universidad de Burgos.

Fdo.: Ana Lorena Alvarado Gámez



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 Vanadio y Tungsteno en Aguas con Electroodos Serigrafiados Modificados con Nanomateriales y Enzimas*”, realizada en el Área de Química Analítica del Departamento de Química de la Universidad de Burgos por Dña. Ana Lorena Alvarado Gámez.

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

Fdo.: M. Julia Arcos Martínez



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



Dedicatoria

A mi amado esposo por toda una vida a mi lado, y por los años de sacrificio y apoyo que me permitieron realizar esta investigación. A mis dos hijos amados, como ejemplo para que luchen sin descanso por alcanzar sus metas y cumplirlas a cabalidad y a mis padres y hermanos por su amor incondicional.





Agradecimientos

A Dios Nuestro Señor por darme la fuerza y perseverancia para llegar hasta aquí. A la Dra. Julia Arcos Martínez por su paciencia y valiosa guía, durante todo el tiempo de esta investigación; a la Dra. María Asunción Alonso Lomillo y la Dra. Olga Domínguez Renedo por sus aportes y acertadas recomendaciones, a Silvia, Marisol, y demás compañeras de Química Analítica de la Universidad de Burgos, por su desinteresada colaboración en todo momento. A Miriam mi compañera y amiga por más de 25 años, por todo el apoyo y acompañamiento en esta larga travesía juntas para cumplir las metas propuestas. A la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, por el apoyo a los proyectos de investigación que hicieron realidad este trabajo. Al Centro de Electroquímica y Energía Química, CELEQ y a la Escuela de Química de la Universidad de Costa Rica, y a sus autoridades, por el apoyo recibido para cumplir con parte de esta investigación, en especial al Dr. Carlos León Rojas, director del CELEQ, al Dr. Cristian Campos Fernández, y al M.Sc. Carlos Herrera Ramírez, director y exdirector de la Escuela de Química, a don Orando Bravo por sus consejos siempre pertinentes y a los compañeros del CELEQ y de la Sección de Química Analítica que de una u otra forma colaboraron para llevar a cabo esta investigación, mi eterno agradecimiento.



*Determinación electroquímica de
vanadio y tungsteno en aguas con
electrodos serigrafados
modificados con nanomateriales y
enzimas*

Índice



Índice	1
Abreviaturas	7
1. Introducción	15
2. Objetivos	21
3. Fundamentos teóricos y antecedentes bibliográficos	25
3.1 El vanadio	27
3.1.1 Generalidades del vanadio	27
3.1.2 Vanadio en el medio ambiente	28
3.1.3 Toxicidad del vanadio	31
3.2 El tungsteno	33
3.2.1 Generalidades del tungsteno	33
3.2.2 El tungsteno en el ambiente	35
3.2.3 Toxicidad del tungsteno	36
3.3 Revisión bibliográfica de los métodos de análisis empleados en la determinación de vanadio y tungsteno	38
3.3.1 Técnicas electroquímicas	41
3.4 Biosensores enzimáticos	52
3.5 La fosfatasa alcalina	54
3.6 La lacasa	55
3.7 Nanomateriales	57
3.8 Cinética Enzimática	60
3.8.1 Inhibición enzimática	61
3.8.1.1 Inhibición Reversible	61
3.8.1.2 Inhibición Irreversible	65
3.8.2 Ecuación de Michaelis-Menten	67
3.8.3 La inhibición enzimática por metales	70
3.9 Bibliografía	73
4. Vanadium Determination In Water Using Alkaline Phosphatase Based Screen-Printed Carbon Electrodes Modified With Gold Nanoparticle	101
4.1 Introduction	105
4.2. Experimental section	106

4.2.1 Chemical Reagents.....	106
4.2.2 Apparatus	107
4.2.3 Manufacturing of SCPEs	107
4.2.4 Modification of SCPEs with AuNPs (AuNPs–SPCEs)	107
4.2.5 Functionalization of AuNPs–SCPEs by ALP	108
4.2.6 Amperometric procedure for the determination of vanadium	109
4.3 Results and discussion	109
4.3.1 Characterization of the developed biosensor for vanadium determination.....	111
4.3.2. Limit of detection.....	113
4.3.3. Precision	113
4.3.4 Accuracy and trueness determination	114
4.3.5 Study of possible interferences in the determination of vanadium	116
4.3.6 Analysis of vanadium in tap water samples.....	116
4.4 Conclusions	117
4.5 References	118
5. A Disposal Alkaline Phosphatase Based-Biosensor For Vanadium Chronoamperometric Determination Using p-Nitrophenylphosphate As A Substrate.	125
5.1 Introduction	189
5.2 Experimental Section	132
5.2.1 Chemical Reagent	132
5.2.2 Apparatus	132
5.2.3 Manufacturing of ALP/AuNPs/SCPEs	133
5.2.4 Measurement Procedure.....	135
5.3 Results and Discussion	136
5.3.1 Optimization of experimental parameters.....	137
5.3.2 Study of vanadium inhibitory effect on alkaline phosphatase	141
5.3.3 Validation parameters	143
5.3.3.1 Limit of detection.....	143
5.3.3.2 Precision, replicability and reproducibility.....	144
5.3.3.3 Accuracy and trueness	146

5.3.3.4 Vanadium determination in water samples	147
5.4. Study of interference cations	147
5.5 Conclusions	148
5.6 References	149
6. Chronoamperometric Screen Printed Biosensor Based On Alkaline Phosphatase Inhibition For W(VI) Determination In Water, Using 2-Phospho-L-Ascorbic Acid Trisodium Salt As A Substrate	155
6.1 Introduction	159
6.2 Experimental Section.....	162
6.2.1. Chemical Reagents	162
6.2.2 Apparatus	163
6.2.3 Preparation of Modified SCPEs Biosensor	163
6.2.4 Optimization of Experimental Conditions.....	163
6.2.5 Tungsten Chronoamperometric Determination Procedure.....	164
6.2.6 Validation	164
6.3 Results and Discussion	164
6.3.1 Optimizing conditions	166
6.3.2 Inhibitory Effect of W(VI) Over the ALP Enzyme.....	171
6.3.3 Characterization of ALP Biosensor Performance	174
6.4 Interferences	178
6.5 Conclusions	180
6.6 References	180
7. Modified Laccase-Gold Nanoparticles Tetrathiafulvalene SPCES Based Biosensor to Determine W(VI) in Water	185
7.1 Introduction	189
7.2 Experimental	192
7.2.1 Reagents	192
7.2.2. Apparatus and software	193
7.3 Methods	193
7.3.1 Home-made SPCTTFEs preparation.....	193
7.3.2 Functionalization of SPCTTFEs with gold nanoparticles (AuNPs)	194

7.3.3 Functionalization of AuNPs/SPCTTFEs) with MWCNT.....	194
7.3.4 Functionalization of AuNPs/SPCTTFEs with self-assembled monolayers (SAMs)	194
7.3.5 Immobilization of laccase enzyme on AuNPs/SPCTTFEs.....	194
7.3.6 Measuring amperometric procedure	196
7.4 Results and Discussion	196
7.4.1 Electrodes characterization and validation	199
7.4.2 Kinetics and laccase inhibition	202
7.5 Interferences study	206
7.6 Conclusions	207
7.7 References	208
8. Conclusiones Generales	213

Abreviaturas

Lista de abreviaturas

<u>Abreviatura</u>	<u>Significado</u>
A	Amperios
AAS	Espectroscopia de Absorción Atómica
AAdsV	<i>Anodic Adsorptive Voltammetry</i> (Voltamperometría de adsorción anódica)
ACSV	<i>Alternating Current Stripping Voltammetry</i>
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AdsCSV	<i>Adsorptive Cathodic Stripping Voltammetry</i> (Voltamperometría de redisolución catódica)
AdsASV	<i>Adsorptive Anodic Stripping Voltammetry</i> (Voltamperometría de redisolución anódica)
AdsSV	<i>Adsorptive Stripping Voltammetry</i> (Voltamperometría de redisolución adsorptiva)
AdsSV-FIA	<i>Adsorptive Stripping Voltammetry with Flow Injection Analysis</i> (Voltamperometría de redisolución con preconcentración adsorptiva e inyección de flujo)
ALP	Fosfatasa alcalina
ALP/%-RFP	SPCE modificado con ALP y sustrato 5-monofosfato de rioxflavina
AuNPs	Nanopartículas de oro
AuNPs/SPCE	SPCE modificado con AuNPs
ALP/AuNPs/SPCE	SPCE modificado con AuNPs y fosfatasa alcalina
BSA	Albúmina de suero bovino

DCP	Polarografía de corriente directa
CDC	Centro de control de enfermedades, por sus siglas en inglés
CIC	Cromatografía de intercambio catiónico
CL	Quimioluminiscencia
CP	<i>Catalytic polarography</i> (Polarografía catalítica)
CPE	<i>Carbon paste electrode</i> (Electrodo de pasta de carbono)
CSV	<i>Cathodic Stripping Voltammetry</i> (Voltamperometría de redisolución catódica)
CTAB	<i>Cetyl trimethylammonium bromide</i> (Bromuro de cetiltrimetilamonio)
DHN	2,3-dihidroxinaftaleno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DME	<i>Dropping mercury electrode</i> (Electrodo goteante de mercurio)
DMG	Dimetilglioxima
DPAdsASV	Voltamperometría adsortiva de redisolución anódica con pulso diferencial
DPAdsCSV	Voltamperometría adsortiva de redisolución catódica con pulso diferencial
DPASV	<i>Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry</i> (Voltamperometría diferencial de pulso con redisolución anódica)
DPCSV	<i>Differential Pulse Cathodic Stripping Voltammetry</i> Voltamperometría de redisolución catódica con pulso diferencial
DPP	Polarografía de pulso diferencial

DPSV	<i>Differential Pulse Stripping Voltammetry</i> (Voltamperometría diferencial de pulso con redisolución)
DPV	<i>Differential Pulse Voltammetry</i> (Voltamperometría diferencial de impulsos)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido etilendiamino tetraacético)
EPA	Agencia de Protección Ambiental (de Estados Unidos)
Eap	Potencial aplicado, applied potential
ETA AAS	Espectroscopia de absorción atómica electrotérmica
GA	Glutaraldehído
GCE	<i>Glassy Carbon Electrode</i> (Electrodo de carbono vítreo)
GCMFE	<i>Glassy Carbon Mercury Film Electrode</i> (Electrodo de carbono vítreo modificado con película de mercurio)
GFAAS	Absorción atómica con horno de grafito
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin -1-il]etanosulfónico
HMDE	<i>Hanging Mercury Drop Electrode</i> (Electrodo de gota suspendida de mercurio)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alto desempeño)
ICP-AES	Emisión atómica con fuente de plasma de acoplamiento inductivo
ICP-MS	Espectroscopia de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

<i>K_m app</i>	Constante aparente de Michaelis-Menten
LAC	Lacasa
LAC/SPC _{TTFE}	SPCE modificado con TTF y LAC
LAC/AuNPs/SPC _{TTFE}	SPCE modificado con TTF, AuNPs, MWCNT y LAC
LAC/MWCNT/AuNPs/SPC _{TTFE}	SPCE modificado con TTF, AuNPs, SAMs y LAC
LAC/SAMs/AuNPs/SPC _{TTFE}	SPCE modificado con TTF, AuNPs, y LAC
LC ₅₀	Concentración letal, 50%
LC-ICP-MS	<i>Liquid Chromatography Induced-Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de Líquidos con Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo)
LIBS	<i>Laser-induced breakdown spectroscopy</i> (Espectroscopia de emisión atómica con láser inducido)
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LSAdSV	<i>Differential Pulse Adsorptive Stripping Voltammetry</i> (Voltamperometría de Barrido Lineal con Preconcentración Adsorptiva)
LSASV	<i>Linear Sweep Anodic Stripping Voltammetry</i> (Voltamperometría de Barrido Lineal con Redisolución Anódica)
LSV	<i>Linear Sweep Voltammetry</i> (Voltamperometría de Barrido Lineal)
M	mol L ⁻¹
mM	mili mol L ⁻¹ , 10 ⁻³ M
μM	micro mol L ⁻¹ , 10 ⁻⁶ M

MFGCE	Electrodo de carbón vítreo con película de mercurio
MWCNT	<i>Multiwall Carbon Nanotubes</i> (Nanotubos de carbono de pared múltiple)
MTB	2-mercaptobenzotiazol
2-PLAsc	2 fosfo-L-ascorbato trisódico
PVA	Alcohol polivinílico
REFER	
RFP	5-monofosfato de riboflavina
RGCMFE	<i>Rotatory Glassy Carbon Mercury Film Electrode</i> (Electrodo rotatorio de carbon vítreo y con film de mercurio)
RSD	Desviación estándar relativa
SAMs	Monocapas autoensambladas
SCE	Electrodo de calomelanos saturado
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño,
SME	<i>Stationary Mercury Electrode</i> (Electrodo estacionario de mercurio)
SMDE	<i>Static Mercury Drop Electrode</i> (Electrodo estático de gota de mercurio)
SPCEs	Electrodos serigrafiados de carbono
SPE	Electrodo serigrafiado
SWASV	<i>Square Wave Anodic Stripping Voltammetry</i> (Voltamperometría de onda cuadrada con redisolución anódica)
SWCNT	<i>Simple Wall Carbon Nanotube</i> (nanotubos de carbono de pared simple)

SWSV	<i>Square Wave Stripping Voltammetry</i> (Voltamperometría de onda cuadrada con redisolución)
TTF	Tetratiafulvaleno
SPC _{TTFE}	Electrodo de carbono serigrafiado con TTF
VBB	Azul de Victoria B
V_m	Velocidad de reacción enzimática
% w/w	Porcentaje volumen-volumen

1. Introducción

1. Introducción

Los metales traza han sido tema de estudio desde hace mucho tiempo, por sus efectos dañinos sobre el medio ambiente y los seres vivos. Entre estos, los metales de transición han generado gran interés, no solo por sus múltiples aplicaciones a nivel industrial, sino también por su importancia biosanitaria, ya que algunos de estos metales, siendo esenciales en pequeñas concentraciones para ciertos organismos vivos, se convierten en tóxicos a concentraciones mayores para los mismos.

Tradicionalmente, el hecho de que estos elementos formen complejos estables, muchos de ellos coloreados, ha conducido a que las técnicas espectroscópicas y electroquímicas hayan sido ampliamente utilizadas en su determinación. Es así como se reportan en la literatura muchos métodos de análisis espectroscópicos y electroquímicos que hacen uso de compuestos de coordinación de estos elementos. También se describen otros métodos como los de absorción y emisión atómica, emisión con plasma, cromatografía líquida de alta eficiencia y cromatografía de intercambio iónico.

Para realizar esta investigación, se seleccionaron el vanadio y el tungsteno, que son metales de transición que no habían sido reportados por sus efectos tóxicos. Sin embargo, en publicaciones más recientes, se recomienda evaluar sus posibles efectos nocivos para plantas, animales y humanos, pues se les vincula con algunas enfermedades.

En la bibliografía están descritos algunos métodos para la determinación de estos dos elementos mediante técnicas electroquímicas como las voltamperometrías adsorptivas basadas en la adsorción de complejos de ambos metales; sin embargo existen pocas referencias que se refieren a métodos electroquímicos basados en la inhibición enzimática, producida por la presencia de vanadio o tungsteno. En este trabajo se han puesto a punto biosensores electroquímicos enzimáticos utilizando dos enzimas cuya actividad biológica frente a diversos sustratos, se ve afectada por la presencia de algunos metales, como la fosfatasa alcalina y la lacasa.

Por sus múltiples ventajas se han seleccionado los electrodos serigrafados que

han sido modificados con nanopartículas de oro, y sobre los cuales se han inmovilizado las enzimas mencionadas. Se utilizó la enzima fosfatasa alcalina con varios sustratos y nanopartículas de oro para determinar vanadio y tungsteno. En el caso de la utilización de la enzima lacasa para determinar tungsteno, los electrodos se modificaron con nanomateriales como nanopartículas de oro, nanotubos de carbono de pared múltiple, y también mediante la formación de monocapas autoensambladas con 1,2-etanoditiol o ácido 3-mercaptopropiónico. La inmovilización de las enzimas se ha llevado a cabo utilizando albúmina de suero bovino BSA, alcohol polivinílico en unos casos y en otros glutaraldehído, para fijar la enzima por atrapamiento o entrecruzamiento.

Los mejores resultados los presentaron los biosensores basados en la utilización de la fosfatasa alcalina empleando la riboflavina-5-monofosfato y el para-nitrofenilfosfato como sustratos. Igualmente, se han obtenido buenos resultados utilizando lacasa, y pirocatecol como sustrato.

Para optimizar las condiciones experimentales se ha aplicado en algunos casos, el diseño de experimentos 2^k estrella. En otros, se fueron variando sistemáticamente los parámetros influyentes, con el objetivo de elegir en cada caso los que proporcionaban mejores señales amperométricas. Además se han empleado otras técnicas como la voltamperometría cíclica, o las técnicas de impulsos para escoger el potencial de trabajo o electrodepositar las nanopartículas de oro.

Se evaluaron los parámetros de desempeño de los diferentes biosensores como la precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad, expresando la desviación estándar relativa en % (RSD), así como los límites de detección y cuantificación, el ámbito lineal, la veracidad con muestras de agua enriquecidas y los porcentajes de recuperación de patrones de referencia certificados trazables al NIST. Igualmente, se llevaron a cabo estudios de interferencias de diferentes cationes metálicos, a varios niveles de concentración. Todos los biosensores preparados se aplicaron en la determinación de los niveles de vanadio y tungsteno en diferentes muestras de agua de grifo, agua ultrapura y agua embotellada comercial.

El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido utilizar los electrodos serigrafiados para desarrollar biosensores electroquímicos con características analíticas optimizadas y aplicarlos a la determinación de vanadio y tungsteno en muestras de agua.

2. Objetivo

2. Objetivos

En esta investigación se pretende desarrollar diferentes sensores enzimáticos utilizando como base los electrodos serigrafiados, y modificar sus superficies con diversos nanomateriales y enzimas, para dar una mejor respuesta a la presencia en agua de ciertos metales de interés.

Para alcanzar este objetivo se llevarán a cabo una serie de tareas que se describen someramente a continuación:

2.1 Estudio del comportamiento electroquímico de los sensores funcionalizados empleando superficies nanoestructuradas y diversas enzimas.

Se probarán materiales como nanopartículas de oro, nanotubos de carbono y monocapas autoensambladas de tioles unidas a las nanopartículas de oro, para funcionalizar los electrodos serigrafiados hechos en el laboratorio. Con objeto de evaluar el efecto de dichas nanopartículas sobre el comportamiento electroquímico de los biosensores, se utilizarán técnicas electroquímicas como voltamperometría cíclica y amperometría en disolución agitada, y se compararán los resultados con los obtenidos empleando biosensores preparados en idénticas condiciones pero en ausencia de los nanomateriales.

Para preparar los biosensores enzimáticos amperométricos y determinar los metales como vanadio y tungsteno, se emplearán diferentes superficies electródicas y distintas estrategias de modificación de las mismas, empleando siempre nanopartículas de oro. Así, se prepararán biosensores basados en electrodos serigrafiados preparados en el laboratorio, modificados con nanopartículas de oro electrodepositadas, y diferentes enzimas inmovilizadas. También se pretende utilizar algún mediador incorporado al electrodo de trabajo, para mejorar la señal amperométrica y disminuir el potencial a aplicar.

2.2 Optimización de las variables analíticas para el funcionamiento óptimo de los biosensores.

Los mejores resultados obtenidos en cuanto a sensibilidad, reproducibilidad de las medidas, y la estabilidad de los dispositivos preparados, permitirán demostrar las propiedades conductoras y catalíticas de estos nanomateriales, así como la mejor forma de inmovilización de las enzimas sin producirse pérdidas apreciables de la bioactividad enzimática. Se optimizarán las variables experimentales que afecten tanto a la modificación de la superficie del electrodo de trabajo, como a las respuestas amperométricas. Asimismo, se calcularán los parámetros cinéticos de la reacción enzimática, sobre las superficies de los biosensores basados en la inhibición enzimática por parte de los metales en estudio.

2.3 Validación de los biosensores específicos en diferentes muestras de agua y agua enriquecida.

Se evaluarán los mejores biosensores en su desempeño analítico para la determinación de vanadio y de tungsteno. Para esto se estimarán las características analíticas de los métodos desarrollados con ellos, lo que implica establecer los intervalos de linealidad de los calibrados, la evaluación de la precisión y el cálculo de los límites de detección y cuantificación para los dos metales en estudio.

2.4 Aplicación de los biosensores enzimáticos desarrollados al análisis de muestras de agua.

Los biosensores desarrollados se aplicarán a la determinación de los metales de interés en muestras de agua. La validez de las metodologías empleadas se verificará mediante el enriquecimiento de muestras o blancos con el fin de evaluar la exactitud de los métodos.

***3. Fundamentos Teóricos Y Antecedentes
Bibliográficos***

3. Fundamentos teóricos y antecedentes bibliográficos

El vanadio y el tungsteno son elementos de transición con características similares; al igual que los metales representativos son sólidos a temperatura ambiente. Poseen estructura cristalina cúbica, centrada en el cuerpo, y tienen buena conductividad térmica y eléctrica. Son de gran interés en la industria, especialmente en la metalurgia del acero, ya que se utilizan en muchas aleaciones y además son buenos catalizadores. Se encuentran en estados de oxidación 2+, 3+, 4+, 5+, el tungsteno tiene además 6+. Forman complejos iónicos coloreados y paramagnéticos. Tradicionalmente, se ha considerado que estos elementos no tienen carácter tóxico, sin embargo, actualmente se está cuestionando su toxicidad.

3.1 El vanadio

3.1.1 Generalidades del vanadio

El mineralogista español Andrés Manuel Del Río, de la Escuela de Minas de México, en 1801 analizó un mineral de plomo de la mina mexicana de Cardonal en Hidalgo (Zimapan), y encontró que producía óxidos, disoluciones y precipitados de diversos colores. Supuso entonces de que se trataba de un nuevo metal, al que llamó **pancromio**, (del griego *pan o pas* y *chromos*) y que posteriormente cambió a **eritronio**, (de *eritro*, rojo), al observar que con los álcalis y otras tierras producían sales que se ponían rojas al fuego, lo mismo ocurría con los ácidos.

En 1830 el químico sueco Nils Sefström, encontró en un mineral de hierro extraído de una cantera de Falun, en su país, una nueva sustancia que Friedrich Wöhler identificó como el mineral de Del Río, y lo nombró **vanadio**, derivado de la diosa nórdica de la belleza *Vanadis*, debido a las llamativas coloraciones de sus disoluciones.

Tanto Sefström como Wöhler eran discípulos de Jacob Berzelius, y los trabajos de identificación fueron realizados en los laboratorios de este último en Estocolmo bajo su dirección. Es allí donde en enero de 1831, separa el óxido del nuevo metal en estado puro. Wöhler había demostrado que el mineral mexicano era

realmente vanadato de plomo $Pb_3(VO_4)_2$ y el color rojo no dependía realmente del vanadio, sino en este caso del ión Pb^{2+} [1, 2].

El vanadio es un metal que en la tabla periódica se ubica como el primer elemento de transición del grupo VB, con número atómico 23 y masa atómica de 50.942 uma. Tiene un punto de fusión de 1902 °C y un punto de ebullición 3409 °C. Es un metal de color gris resistente a la corrosión, no existe en la naturaleza en estado metálico, es poco abundante, con carácter dúctil y maleable y se utilizó inicialmente en aleaciones con hierro y acero [3 -5]. Es un elemento común en la litosfera, combinado formando diferentes compuestos. En el suelo acompaña a los óxidos de hierro, minerales arcillosos y la fracción orgánica [6]. Una cantidad promedio de vanadio en suelos ronda entre 10 mg kg⁻¹ y 220 mg kg⁻¹. El vanadio metálico reacciona con el oxígeno, el nitrógeno y el carbono a temperaturas menores a 300 °C y forma diferentes estados de oxidación: -1, 0, +2, +3, +4 y +5, siendo el menos común el estado -1 [7].

El vanadio es utilizado en la industria metalúrgica en manufactura de aleaciones de alta resistencia y baja corrosión; forma amalgamas principalmente con aluminio, titanio, boro, cromo, níquel, manganeso y tungsteno. Es un componente de la preparación del vidrio, de pinturas de aplicación común, en colorantes para fotografía y cinematografía. En la industria agrícola se emplea en la elaboración de fungicidas e insecticidas y como micronutriente en fertilizantes, además en la producción de ácido sulfúrico y caucho sintético. Se utiliza en materiales de superconductividad y es importante en la industria de la energía atómica, en la construcción de maquinaria aérea, tecnología espacial y como agente catalítico en diversas aplicaciones [3, 8, 9].

3.1.2 Vanadio en el medio ambiente

Es el metal de transición más abundante en la acuosfera y está presente en un promedio similar al del zinc; se observa como contaminante en ríos, lagos, océanos y en aguas subterráneas y superficiales mayormente por el impacto de la minería [10]. En ambientes naturales el vanadio se encuentra en bajas concentraciones, del orden

de unos pocos $\mu\text{g L}^{-1}$. Las concentraciones normales en agua de consumo humano oscilan entre 0.2 a más de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ y los valores típicos están entre 1 y $6 \mu\text{g L}^{-1}$. Esta concentración depende del área geográfica en que se encuentre [11, 12]. Así en las aguas minerales cercanas al Monte Fuji en Japón, las concentraciones de vanadio pueden alcanzar valores entre 24.5 y $81.5 \mu\text{g L}^{-1}$. Esta agua es comercializada en botellas plásticas con concentraciones hasta de $59 \mu\text{g L}^{-1}$ [13].

El V(V) existe como ion vanadato VO_3^- , pero puede encontrarse como vanadilo (VO_2^+) cuando el pH es inferior a 3.5 y en soluciones básicas su forma predominante es el orthovanadato (VO_4^{3-}). También se encuentra como H_2VO_4^- en soluciones neutras, mientras que el metavanadato (VO_3^-) es la especie predominante en los fluidos corporales [14].

El V(IV) como catión vanadilo VO^{2+} puede estar presente en ambientes reductores. Es estable en disoluciones ácidas a pH menor a 2, pero se oxida al estado pentavalente por el oxígeno atmosférico a pH mayores. Esto complica la determinación de V(IV) en muestras naturales con pH mayor a 2 pues se hace necesario estabilizar esta especie. La coexistencia de estas especies depende el pH, del potencial redox y de la fuerza iónica del sistema [15, 16].

El vanadio puede entrar en los sistemas acuáticos a través de la liberación de rocas primitivas, del suelo y por el transporte en las aguas. Sin embargo la actividad antropogénica es la que más contribuye a su presencia en estos sistemas. Pequeñas cantidades de vanadio son retenidas en productos derivados del petróleo y se produce la contaminación por el proceso de refinado y uso de combustibles fósiles [17]. La combustión de estos materiales liberan una cantidad significativa de este elemento y sus compuestos como óxidos con estado de oxidación entre 2+ y 5+, tales como VO, V_2O_3 , VO_2 y V_2O_5 , al ambiente [18], al igual que en las emisiones de partículas debidas a las actividades mineras e industriales [13, 14, 19 -21]. Estas emisiones se precipitan sobre el suelo y son drenadas por la lluvia hasta llegar a las aguas subterráneas u otros medios acuosos y a la vez pueden ser adsorbidos directamente por las plantas [11].

El vanadio es el tercero en la lista de contaminantes en la comunidad europea,

debido a las emisiones de las plantas eléctricas de combustión de carbón después del Zn y el Pb. Más aún, la contaminación atmosférica debida al vanadio es considerablemente mayor cerca de las zonas industriales y refinerías de petróleo. Las fuentes naturales como polvo continental, emisiones volcánicas, aerosoles marinos y minería ayudan a dicha contaminación [22-24]. Se calculan 60 mil toneladas de vanadio liberadas a la atmósfera anualmente por contaminación antropogénica, especialmente de los combustibles fósiles [8, 9].

Los niveles de vanadio en el ambiente [16, 21, 25, 26] dependen de las condiciones climáticas, la ubicación geográfica y las condiciones de urbanización entre otros factores [27-29]. En las grandes urbes se han detectado concentraciones en el aire que oscilan entre $0.15 - 1.4 \mu\text{g} / \text{m}^3$ y en áreas rurales hasta $0.024 \mu\text{g} \text{m}^{-3}$ [3]. Recientemente se ha publicado que los materiales de construcción liberan metaloides, dependiendo de su área superficial, del tamaño de partícula, y la fuerza iónica de los mismos. No así con el vanadio, que se determinó en escorias de cobre en concentraciones de $(57 \pm 17) \text{mg kg}^{-1}$ y en rocas basálticas de $(118 \pm 24) \text{mg kg}^{-1}$ [30].

El vanadio puede encontrarse en el ambiente en algas, plantas, invertebrados, peces y muchas otras especies. El crecimiento de ciertas plantas acuáticas es estimulado por concentraciones traza de vanadio ($1 \mu\text{g L}^{-1} - 10 \mu\text{g L}^{-1}$), pero concentraciones superiores a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ son tóxicas [31]. Algunos invertebrados marinos tales como los tunicatos acumulan vanadio a niveles superiores al 0.3 % de masa seca. Estos invertebrados son generalmente menos sensibles al vanadio (9 días LC_{50} en el ámbito de $10 \text{mg L}^{-1} - 65 \text{mg L}^{-1}$) mientras que los peces (4-6 días LC_{50}) a valores entre $0.5 \text{mg L}^{-1} - 22 \text{mg L}^{-1}$), entendiéndose por LC_{50} la concentración del metal que mata el 50% de los individuos de ensayo. El pH es un importante modulador de la toxicidad, sin embargo en suelos, el vanadio a concentraciones de 10mg kg^{-1} o más, es tóxico para las plantas terrestres [7, 32]. En mejillones y cangrejos se acumula fuertemente, y puede ser acumulado en concentraciones de 10^5 a 10^6 veces mayores que las concentraciones encontradas en el agua salada. Las ascidias son organismos acuáticos que acumulan este metal en células especiales llamadas vanadocitos y logran tener concentraciones de vanadio en sangre de 10

mM, mientras que en el mar se encuentran concentraciones de 35 mM [8, 22, 24]. Hay enzimas que contiene vanadio, por ejemplo se ha encontrado en enzimas de algas marinas [23, 33].

La presencia de vanadio en el suelo no es neutral para las plantas y su influencia en ellas depende de la concentración [26, 34-36]. Concentraciones inferiores a 2 mg kg⁻¹ de vanadio influyen positivamente en la síntesis de la clorofila, el consumo de potasio o la asimilación de nitrógeno. Mayores concentraciones de vanadio son tóxicas para las plantas, ya que causa la clorosis y limita el crecimiento. [37, 38]

3.1.3 Toxicidad del vanadio

El vanadio es un elemento traza esencial con funciones fisiológicas específicas [39-42], además posee propiedades para reducir los efectos de diferentes desórdenes fisiológicos [25, 43-45]. No obstante, numerosos reportes han prevenido a la población sobre su carcinogénesis y los efectos tóxicos por exposiciones excesivas a dicho metal [3, 9, 10, 46].

En 1876 fue reportada por primera vez la toxicidad del vanadato de sodio por parte de Priestley y Gamgee, en algunas especies de animales. En 1911 se encontró gran cantidad de vanadio en la sangre de ascidias [47], y en 1912 en el Journal de Pharmacology se reportaba sobre las acciones toxicológicas y farmacéuticas del V(V) [48].

A pesar del hecho de que el V(V) es la especie más tóxica, se le ha dado muy poca importancia a su determinación en aguas, suelos y plantas [49]. Recientemente la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, (EPA) incluyó al vanadio en la lista de los candidatos a contaminantes ambientales, tomando en cuenta el modelo de movilización y remoción del vanadio a lo largo de los flujos de los sistemas de aguas subterráneas, sin embargo se subestima la importancia de investigar el vanadio en los acuíferos y otras fuentes de agua. A la fecha son muy pocos los países donde los estándares y las regulaciones sobre la contaminación de suelos con vanadio han sido aceptados [21].

El vanadio puede tener efectos adversos sobre la salud humana. Es absorbido pobremente por el tracto gastrointestinal, se transforma en VO^{2+} en el estómago y pasa al duodeno de la misma forma. Algunos estudios señalan que el vanadato entra en las células vía fosfato o por otro anión transportador y es por eso que el V(V) se absorbe de tres a cinco veces más efectivamente que el V(II) [50]. Se sabe que los compuestos de vanadio que se ingieren se eliminan por las heces, siendo la ruta que predomina, la eliminación por la orina.

Algunos autores mencionan que el vanadio es esencial para diferentes organismos, pero no se ha encontrado una verdadera función para los humanos. Se conocen los efectos adversos de los compuestos de vanadio tetravalente y pentavalente, sobre la integridad de los cromosomas y se ha observado segregación *in vitro*. Ambos inducen micronúcleos, rompimiento del ADN, y alteraciones cromosómicas [3, 51, 52].

En humanos la toxicidad del vanadio incluye perturbaciones en el sistema nervioso central, temblor y deterioro en reflejos condicionados, así como congestión de la médula espinal. En pacientes con esclerosis múltiple se han encontrado altos niveles de V(V) y otros metales en cabello y sangre [9]. Algunos desórdenes mentales como el síndrome maniaco depresivo puede asociarse con niveles de vanadio superiores en la sangre [53]. También se hallaron habilidades cognitivas reducidas en humanos crónicamente expuestos a este elemento [54].

Cuando el vanadio es acumulado en el cuerpo, a través del aire contaminado, puede causar bronquitis y neumonía. Los efectos graves del vanadio son irritación de pulmones, garganta, ojos y cavidades nasales, daño cardiaco y vascular, inflamación del estómago e intestinos, dafecciones en el sistema nervioso, sangrado en hígado y riñones, irritación de la piel, temblores severos y parálisis, sangrado de la nariz y dolor de cabeza, mareos y cambios de comportamiento, etc. [3].

Los alimentos son la principal fuente de exposición a vanadio para la población en general, con un estimado diario de unas pocas décimas de microgramos. El agua potable contribuye en menor escala aun cuando se han encontrado concentraciones de vanadio relativamente altas en algunas fuentes suplidoras de agua [9, 50, 55]. Por

lo tanto, la evaluación de los posibles efectos de vanadio en la salud humana debe ser objeto de control y los valores de referencia de vanadio en sangre, suero y orina de personas no expuestas, debería establecerse como una base para la evaluación de la exposición humana y sus riesgos toxicológicos [29].

En contraposición a su toxicidad, el vanadio presenta algunas aplicaciones en medicina, abarcando diferentes áreas de interés; por ejemplo muchos estudios desarrollados *in vitro* o en animales de laboratorio, han revelado que algunos compuestos de vanadio tienen propiedades miméticas tales como efectos mitogénicos, acciones inhibitorias o estimulantes sobre diferenciación celular y otros efectos metabólicos [56-58]. También presenta ventajas en el tratamientos de algunos tipos de cáncer, así como de agente antiviral, antiparasitario y antibacterial. [1, 6, 7, 59].

3.2 El tungsteno

3.2.1 Generalidades del tungsteno

En 1779, Peter Woulfe, mientras estudiaba una muestra del mineral wolframita, (Mn, Fe) (WO₄), predijo que debía de contener un nuevo elemento. Dos años después, en 1781, Carl Wilhelm Scheele y Torbern Bergman sugirieron que se podía encontrar un nuevo elemento reduciendo un ácido (denominado "ácido túngstico") obtenido a partir del mineral scheelita (CaWO₄). En 1783, en España, los hermanos Juan José y Fausto Elhúyar encontraron un ácido, a partir de la wolframita, idéntico al ácido túngstico.

En 1820 el químico sueco Jacob Berzelius obtuvo wolframio mediante una reducción con hidrógeno. El método, empleado todavía la actualidad, comenzó a abrir las posibilidades de uso de este metal extraordinario, pero su desarrollo fue muy lento. La necesidad constante de nuevos materiales para alimentar las guerras del siglo XIX, hizo que los fabricantes de acero austriaco e inglés empezaran a investigar las propiedades del wolframio como elemento de aleación [9, 60].

La palabra tungsteno procede del sueco, tungque se traduce como "pesado" y sten, "piedra", es decir, "piedra pesada". La palabra wolframio procede de dos palabras alemanas *wolffy rahm*, pudiendo significar "poco valor". También se traduce como "Baba de Lobo" en referencia a las supersticiones de los mineros medievales sajones que creían que el diablo se aparecía en forma de lobo y habitaba las profundidades de las minas socavando la casiterita con sus fauces babeantes. Este mineral aparecía mezclado con el ácido de otro desconocido —wolframio— que actuaba corroyéndolo [10].

La IUPAC denomina al elemento 74, de símbolo W, como "tungsten" (en inglés, su único idioma oficial). El nombre alternativo "wolfram" fue suprimido en la última edición de su Libro Rojo (Nomenclatura de Química Inorgánica. Recomendaciones de la IUPAC de 2005) [61, 62].

El tungsteno es un metal de transición al igual que el vanadio, con propiedades similares a las del molibdeno [63], perteneciente al grupo VIB del sistema periódico. Es muy valioso por su gran resistencia a altas temperaturas y por su alta conductividad de calor y electricidad [34]. Sus propiedades físicas y mecánicas son únicas, presenta un punto de fusión de 3422 ° C y de ebullición de 5555 ° C, los más altos entre los metales, y una densidad de 19.1 g cm³. Este metal es escaso en la corteza terrestre, se encuentra en forma de óxidos y sales en ciertos minerales [64].

Es un metal denso y duro de color gris acerado. Se utiliza en los filamentos de las lámparas incandescentes, en electrodos no consumibles de soldaduras, en resistencias eléctricas, y aleado con el acero, en la fabricación de aceros especiales para la fabricación de fuselaje de equipos espaciales, puntas de taladros, bordes de herramientas de corte, equipos médicos y municiones [64-67]. Su variedad de carburo de tungsteno sinterizado se emplea para fabricar herramientas de corte. Esta variedad absorbe más del 60 % de la demanda mundial de tungsteno. A pesar de sus extensas aplicaciones, los efectos biológicos y bioquímicos del tungsteno y sus compuestos no se conocen muy bien [68].

Se considera que el tungsteno tiene actividad química limitada y a menudo se cita como no reactivo frente a ácidos minerales fuertes y agua. Estas propiedades únicas se pueden cambiar en aleaciones con carbón y otros metales, que hacen al tungsteno altamente deseable y difícilmente sustituible en aplicaciones comunes y especializadas de las tecnologías modernas. Por consiguiente el tungsteno es considerado como un elemento indispensable y de importancia estratégica a corto plazo [69].

3.2.2 El tungsteno en el ambiente

La corteza terrestre, concretamente la ecosfera, es la principal fuente de tungsteno y se estima que contiene 0.00013% de este metal, lo que equivale en términos de concentración de tungsteno a 1.3 mg kg^{-1} [69, 70]. Existe combinado formando minerales como la *scheelita* (CaWO_4) o *wolframita* ($[\text{Fe/Mn}]\text{WO}_4$) [60, 72].

La biogeoquímica del tungsteno en el ambiente es muy poco conocida y los datos existentes en cuanto a su presencia en aguas naturales en particular es muy limitada. Sin embargo, en estudios recientes se indica que las concentraciones elevadas de tungsteno en aguas naturales están asociadas a condiciones reductoras, alta alcalinidad y altas acumulaciones de minerales de tungsteno relacionadas con óxidos de hierro [73-76].

Con el rápido desarrollo de nuevas tecnologías, algunos metales traza poco comunes como el tungsteno, utilizados en la industria, se acumulan en los desechos y en aguas residuales y posteriormente son liberados a los ecosistemas aledaños, a pesar de los tratamientos antes de sus descargas [77].

El tungsteno puede ser liberado a los sistemas acuáticos a través de múltiples rutas naturales y antropogénicas, desde ambientes terrestres, atmosféricos y bióticos. Una lista no exhaustiva de procesos naturales incluyendo la erosión de rocas ricas en tungsteno, en suelos, en disolución en actividades hidrotermales y volcánicas, precipitaciones atmosféricas secas y húmedas, y excreción de metabolitos, pueden ser las causas de la movilidad de este metal. Las fuentes antropogénicas encierran

una variedad de actividades industriales, comerciales y militares, junto con actividades municipales, agrícolas y desechos industriales [45, 78].

El tungsteno está presente en agua de mar a nivel de trazas, a concentraciones menores a 0.2 ng kg^{-1} - 1.0 ng kg^{-1} . Sin embargo, se han reportado concentraciones de 8 mg L^{-1} a 100 mg L^{-1} en el Atlántico Norte y en sedimentos marinos entre 10 mg kg^{-1} y 60 mg kg^{-1} [79]. Las aguas subterráneas en áreas de deposición de tungsteno, o de actividad hidrotermal y lagos alcalinos en regiones áridas, contienen elevadas concentraciones de este metal. En zonas de recarga por ejemplo, se han reportado hasta 70 mg kg^{-1} en salmueras del lago Searles en California. En Fallon, Nevada, se han encontrado en aguas de grifo concentraciones entre $0.25 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ y 335 mg L^{-1} y en pozos de agua de consumo humano $0.27 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ a $742 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ [80].

Las reacciones de tungsteno en agua, juegan un papel importante en el comportamiento y movilidad de este elemento y sus compuestos en el medio ambiente. Los diagramas de equilibrios de pH-potencial y las reacciones pertinentes de los sistemas agua-tungsteno bajo condiciones de equilibrio termodinámico a 25° C , y la especie más importante en ausencia de sustancias precipitantes o complejantes, es el ion WO_4^{2-} [81].

3.2.3 Toxicidad del tungsteno

El tungsteno es un metal que ha sido poco estudiado a pesar de sus efectos ecológicos. Sus aniones se polimerizan tanto en los sistemas medioambientales como en condiciones fisiológicas de los seres vivos [63, 68]. Estas reacciones de polimerización-condensación producen varios tipos de oxianiones estables. Ciertas propiedades químicas en particular de óxido-reducción y ácidas, diferencian a estos polianiones de los monotungstatos. Sin embargo, los efectos biológicos y ambientales se basan enteramente en experimentos donde los monotungstatos fueron utilizados y asumidos por los autores como la forma de tungsteno presente y que produce los efectos observados [82].

Algunos descubrimientos recientes indican que la especiación de tungsteno debe ser importante para la ecotoxicología. Diferentes grupos han demostrado que

los politungstatos desarrollan y persisten en los sistemas ambientales y que los politungstatos son mucho más tóxicos que los monotungstatos. Otros estudios se refieren a la formación de tungstatos monoméricos y una variedad de especies poliméricas definidas como dañinas en suelos viejos que contienen tungsteno. Además las aleaciones de tungsteno utilizadas en municiones frente al uso de tungsteno metálico complican el panorama geoquímico de las especies de tungsteno debido a la formación de especies poco solubles después de la oxidación, a niveles de pH ácidos. Los procesos naturales de oxidación y especiación aumentan la complejidad de las implicaciones biológicas de este metal en el ambiente [83].

Se sospecha que el tungsteno está potencialmente relacionado con un cluster de leucemia linfocítica aguda en tres comunidades de Estados Unidos, (Fallon, Nevada; Sierra Vista, Arizona y Elk Grove, California) y también es perjudicial para los peces.

A pesar de que se han hecho algunos estudios del comportamiento y los efectos del tungsteno en animales de laboratorio, se le ha dado muy poca atención a los problemas de desarrollo de modelos biológicos realistas de la cinética del tungsteno en el cuerpo humano [84, 85].

Las concentraciones de tungsteno en el agua potable, generalmente no son objeto de estudio. Esto se debe probablemente a que los niveles de tungsteno están por debajo del nivel detectable, o a que los laboratorios destinados a este fin no tienen en su protocolo la cuantificación de este metal. Tampoco se conocen las cantidades de tungsteno contenidas en los alimentos, probablemente por las mismas razones. El tungsteno en plantas proviene de la incorporación por parte de la planta o debido a que se encontraba adherido a la planta [85]. En un estudio realizado en Dinamarca se encontró una concentración de tungsteno en cebollas de $17 \mu\text{g kg}^{-1}$ en las hortalizas frescas. Aunque hay muy pocos datos, la exposición al tungsteno a través del aire, el agua potable y los alimentos es muy baja [86, 87].

En ciertos lugares de trabajo, el personal puede estar expuesto a niveles de tungsteno en el aire, más altos que los normales, a pesar de que se consideren muy bajos o inexistentes. Las exposiciones más comunes se dan con tungsteno metálico o

carburo de tungsteno. La exposición ocupacional al tungsteno ocurre principalmente en lugares en donde los trabajadores manipulan metales duros que contienen tungsteno, por ejemplo puliendo electrodos de soldadura de tungsteno metálico antes de usarlos. De hecho, se recomienda el uso de máscaras para personas que participan en actividades que potencialmente pueden producir polvo de carburo de tungsteno, por ejemplo el pulido o la abrasión [71, 88].

El tungsteno puede entrar al cuerpo a través de los alimentos, el agua, o el aire, o por contacto con la piel. Los compuestos de tungsteno que pueden disolverse fácilmente en agua, pueden pasar a la sangre y transportarlo a través de todo el cuerpo. La mayor parte del tungsteno que pasa a la sangre es eliminado rápidamente a través de la orina y de las heces [89].

En general, estos estudios indican que la visión histórica de tungsteno como no tóxico e inerte para el ambiente, debe ser reevaluado y se necesitan regulaciones ambientales para este metal [90].

3.3 Revisión bibliográfica de los métodos de análisis empleados en la determinación de vanadio y tungsteno.

Debido a las bajas concentraciones de vanadio y tungsteno presentes en el medio ambiente, en aguas naturales, en agua de mar y de consumo humano, es obvia la necesidad de disponer de métodos de análisis sensibles, precisos y rápidos para determinar su contenido.

Se ha demostrado la importancia de determinar estos metales en aguas, ya que pequeñas concentraciones pueden tener efectos dañinos para el ambiente, los animales y la salud humana. De ahí la importancia de contar con técnicas analíticas sensibles, que permitan detectar este metal a bajas concentraciones.

Entre las diferentes técnicas analíticas para determinar el vanadio y el tungsteno, la absorción atómica es la más utilizada para el análisis de elementos trazas, debido a su alta sensibilidad, bajo consumo de muestra, simplicidad de

operación y reducidos efectos de matriz. Se puede utilizar la técnica de llama y la electrotérmica con horno de grafito que es mucho más sensible [91-95]. Además de otras técnicas como la emisión atómica [96], la espectrometría de fluorescencia con chispa y de rayos X [97], la espectrofluorimetría [75], la espectrofotometría ultravioleta y visible [98], la espectrometría de resonancia [99] y la espectroscopia de emisión atómica con láser inducido, (LIBS) por sus siglas en inglés [100], la espectrometría de masas [101], y algunas otras técnicas empleadas [102-104].

A continuación se describen algunos métodos empleados para la determinación de los metales de interés en diferentes muestras medioambientales.

El vanadio comúnmente se determina por espectrofotometría visible, debido al gran número de complejos coloreados que forma este metal en soluciones acuosas y orgánicas. Zhang y colaboradores desarrollaron un método de análisis de trazas de vanadio utilizando espectrofotometría con inyección de flujo, basado en los efectos catalíticos de una reacción indicadora entre el azul Victoria (VBB) y el bromato de potasio, en presencia de ácido cítrico como activador y monitoreado espectrofotométricamente, presenta bajos límites de detección, $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ [105]. Pourreza y Mohammadi-Sedehi desarrollaron un método muy sensible, selectivo y simple para la determinación de tungsteno, basado en el efecto activador del tiocianato sobre la reacción catalizada del tungsteno con verde de malaquita [106].

Igualmente Liu y colaboradores desarrollaron un método simple, rápido y selectivo basado en detección quimioluminiscente (CL) para determinar V(V) a nivel de subnanogramos en aguas naturales, utilizando una técnica de liberación controlada de reactivo y una columna de intercambio aniónico con luminol y peryodato, en un sistema de inyección de flujo [107].

Chandravanshi *et al.* han realizado una determinación simultánea de Fe(III) y V(V) con ácido fenilcinamohidroxámico y tiocianato a través de una extracción y posterior análisis por espectrofotometría visible [108].

Santelli *et al.* en 2008 [109] desarrollaron un método para vanadio no volátil en diesel y gasolinas utilizando absorción atómica con horno de grafito, permitiendo la

determinación con límites de detección y cuantificación de $14 \mu\text{g L}^{-1}$ y $45 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente [37, 110, 111].

Zhao y colaboradores aplicaron una técnica de extracción con líquidos iónicos para separar V(V) de Cr(VI) y cuantificarlos posteriormente con ICP-MS. Ésta es la técnica más utilizada para la separación de iones metálicos, debido a las ventajas que ofrece incluyendo la operación de modo continuo, empleo de equipo simple y fácil de acoplar con otras técnicas. [112]

Padmasubashini y colaboradores en 1999 [113], utilizaron dos técnicas espectrofotométricas para el análisis simultáneo de los dos metales en muestras geológicas, utilizando espectrofotometría derivativa e ICP-AES. Se obtuvieron límites de detección en el orden de mg kg^{-1} . En forma similar Bednar y colaboradores en 2010, utilizaron la técnica de ICP-AES para el análisis de tungsteno en muestras de suelo, desarrollando una técnica de digestión con ácidos e incorporando además ácido fosfórico, para extraer el tungsteno de las muestras de suelo [114].

Gómez *et al.* aplicaron una técnica combinada para la determinación de tungsteno elemental en sueros de ratas con diabetes y sin diabetes. El análisis de especiación se llevó a cabo con una separación 2D, que incluía un empaquetamiento de inmunoafinidad y una columna cromatográfica de exclusión por tamaño SEC, acoplada a un ICP-MS, para la determinación elemental de tungsteno total por acoplamiento de las técnicas de cromatografía líquida y espectroscopia de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo LC-ICP-MS [115].

Huang y colaboradores determinaron simultáneamente vanadio, tungsteno y molibdeno utilizando dos resinas quelantes [116]. Para llevar a cabo el análisis de metales traza en matrices complejas, se acopló un método de quelación hifenado con cromatografía iónica (CIC) acoplada en línea a un espectrómetro de masas con plasma de acoplamiento inductivo. Los límites de detección para los tres metales fueron menores a $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ y un intervalo lineal válido hasta $100 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada elemento [11, 117, 118]. También han sido utilizadas técnicas radioquímicas basadas

en la activación de neutrones para determinar vanadio, manganeso y tungsteno en aleaciones de aceros [119].

Gervasio *et al.* han mejorado la técnica de inyección de flujo en espectrofotometría para la determinación de tungsteno y molibdeno en herramientas de acero. Además presentaron una nueva estrategia de separación de intercambio iónico de especies interferentes, utilizando minicolumnas de resina catiónica de poliestireno sulfonatada, AG50W-X8 [120].

Chiung *et al.* determinaron vanadio, molibdeno y tungsteno en muestras sintéticas de agua de mar, por cromatografía iónica CIC, utilizando dos tipos de resinas quelantes con detección acoplada en línea a un ICP-MS. [121]. A su vez Bednar y colaboradores analizaron tungsteno, molibdeno y oxianiones de fósforo utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC, con intercambio aniónico, para separar las especies y determinar cada oxianión por ICP-MS. Analizaron muestras de aguas subterráneas y extractos de suelos [122].

El uso de la mayoría de las técnicas mencionadas anteriormente se deben llevar a cabo en un laboratorio con personal especializado y algunas de ellas bajo condiciones específicas de presión y temperatura, lo que las hace técnicas de alto costo. Además los reactivos, los gases y otros consumibles, al igual que el mantenimiento de dichos equipos elevan su coste aún más.

Otro aspecto que hay que considerar es el hecho de que las muestras deben tratarse previamente con digestión húmeda, extracción con solventes, microextracción en fase sólida, separaciones en columna, uso de resinas quelatantes, etc. con el fin de adecuar la muestra a la técnica utilizada [29, 52, 84, 123-129].

3.3.1 Técnicas electroquímicas

Las técnicas electroquímicas son más sencillas y alcanzan buenos límites de detección y cuantificación, con bajo coste, fáciles de manipular y utilizan pocos reactivos, por lo que también han sido ampliamente utilizadas en la determinación de vanadio y tungsteno. Las más empleadas han sido las técnicas de impulsos con redisolución adsorbtiva que han permitido obtener límites de detección hasta ng L^{-1} .

En las tablas 3.1 y 3.2 se indican algunas técnicas electroanalíticas utilizadas en la determinación de vanadio [130-155] y tungsteno [156-162] en diferentes matrices. Por ejemplo técnicas como la voltamperometría diferencial de impulsos (DPV) y la diferencial de impulsos con redisolución anódica o catódica, (DPASV y DPCSV) las técnicas con diferencial de impulsos y preconcentración adsortiva DPAdSV o de barrido lineal LSAdSV, también se ha utilizado la técnica adsortiva modificada con inyección de flujo. AdsSV-FIA. La voltamperometría de barrido lineal con redisolución anódica (LSASV), la voltamperometría de onda cuadrada con redisolución anódica (SWASV), y algunas técnicas mixtas acopladas a un ICP-MS, son otras técnicas muy utilizadas.

Las técnicas de diferencial de impulsos con redisolución catódica, (DPCSV) [142] o anódica (DPASV) [145], utilizan diversos electrodos como el electrodo de gota suspendida de mercurio HMDE, [138-144], de pasta de carbón [137, 145], de carbón vítreo [136] o con película de mercurio MFGCE [147]. También se aplican estas mismas técnicas con preconcentración adsortiva. Las técnicas adsortivas tienen la ventaja de proporcionar límites de detección más bajos, ya que preconcentran el analito hasta en dos órdenes de magnitud, formando complejos con una gran variedad de ligandos que se adsorben en la superficie del electrodo de trabajo. Entre los ligandos que se utilizan están el cupferrón [130, 131, 147, 151], el catecol [133, 140, 148, 151, 155, 161], el violeta de alizarina [134] o el rojo de alizarina [136, 137], el cromoxano y la cianina [138], el ácido cloroanílico con bromato [135, 139] o con benzoquinona [141], el 2-(5-bromo-2-piridilazo)5-dietilaminofenol [143] la 1,10-fenantrolina [142], el bromuro de cetiltrimetilamonio [145], la voltamperometría diferencial de impulsos (DPV) aplicada con 2,3-dihidroxibenzaldehído [132], de barrido lineal (LSV) con bromato de galocianina [144], o con el rojo de metilo [151], y la técnica de redisolución con onda cuadrada [SWSV] con 2,3-dihidroxinaftaleno [146], y la voltamperometría de barrido catódico con antipirilazo III [149].

En la tabla 3.2 se presentan otras técnicas para analizar tungsteno, [156-163], como las técnicas adsortivas ya mencionadas formando un complejo tungsteno - oxina [159], tungsteno-rodamina con electrodo de grafito [160], o tungsteno catecol

[161], la técnica de barrido lineal con diferencial de impulsos (DLSV) que utiliza el complejo formado por el tungsteno, el tungsteno-2-mercaptobenzotiazol [163], la voltamperometría de barrido lineal (LSV) con rojo de metilo [158] y otras más [162]. Todas ellas con buenos límites de detección y cuantificación a niveles de μM o nM .

En la literatura consultada, a la fecha no se ha reportado, el uso de biosensores electroquímicos enzimáticos para determinar vanadio o tungsteno en aguas u otras matrices.

Tabla 3. 1 Métodos electroquímicos aplicados a la determinación de vanadio en agua y otras matrices.

Técnica Electroquímica	Electrodo	Modificación	Rango dinámico	LOD	Potencial	pH /tampón	Tipos de muestras	Referencias
AdsSV	HMDE	cupferrón	0 0.10 μgL^{-1} y 105 μgL^{-1} 0.01 $\times 10^{-6}$ M y 0.9 $\times 10^{-6}$ M	0.01 $\mu\text{g L}^{-1}$ 0.09 nM	-100 mV	4.8 fosfato	alimentos y agua	[130-131]
DPVS.	SME	2,3-dihidroxiben-zaldehído BrO_3^-	5.0 $\times 10^{-8}$ M y 1.0 $\times 10^{-10}$ M	2 $\times 10^{-10}$ M	- 200 mV Potencial de acumulación	5.4 acetato	agua	[132]
AdsCSV	HMDE	DMG catecol	39 nM y 300 nM 3.9 $\times 10^{-8}$ M 3.0 $\times 10^{-7}$ M	2.5 $\times 10^{-9}$ M 2.5 $\times 10^{-9}$ M	-300 mV	6.8 -7.0	aguas de estuarios y de la costa y sedimentos	[133]
dsASV	electrodo de pasta negra de acetileno	violeta de alizarina	8.0 $\times 10^{-10}$ M 1.0 $\times 10^{-7}$ M	6 $\times 10^{-10}$ M	564 mV	4.4	aguas naturales	[134]
DPAdsCSV	electrodo con película de Hg MFE	ácido cloroanilínico	0.25 nM y 150 nM 2.5 $\times 10^{-10}$ M 1.5 $\times 10^{-7}$ M	0.5 ngL^{-1} 9.8 $\times 10^{-12}$ M	-100 mV -200 mV	4.2 - 4.8	agua enriquecida y muestras de orina	[135]

Continuación tabla 3.1

Técnica Electroquímica	Electrodo	Modificación	Rango dinámico	LOD	Potencial	pH / tampón	Tipos de muestras	Referencias
AAdsV	electrodo de carbón vítreo	MWCNT	6.0 nM y 1.0 µM	2.0 nM	706 mV	5.3	muestras de agua	[136]
	GCE	rojo de alizarina	6×10^{-9} M y 1.0×10^{-6} M	2×10^{-9} M				
Voltamperometría lineal de barrido con derivativa de 2do. orden	CPE	rojo de alizarina	$0.10 \mu\text{g/L}$ y $5.0 \mu\text{g/L}$	$0.04 \mu\text{g/L}^{-1}$ y 7.8×10^{-10} M	-100 mV	5.1 acetato	muestras de agua	[137]
		S(ARS)	1.96×10^{-9} M y 2.95×10^{-7} M					
AdsCSV	HMDE	cromoxano y cianina R	0.3 y 24 µg/L	0.1 µg/L	-100 mV	3.6 acetato	aguas de río, de molinos y del grifo	[138]
			5.9×10^{-9} M y 4.7×10^{-7} M	1.9×10^{-9} M				
AdsSV catalítico	HMDE	ácido cloroanílico	2×10^{-10} M y 5×10^{-8} M	2.8×10^{-9} M y 9×10^{-12} M	-100 mV	4.5 - 4.8 acetato	muestras de agua	[139]
		BrO_3^-						

Continuación tabla 3.1

Técnica Electroquímica	Electrodo	Modificación	Rango dinámico	LOD	Potencial	pH / tampón	Tipos de muestras	Referencias
ACSV	HMDE	DMG catecol	22.7nM y 100nM $2.27 \times 10^{-8} M$ y $1.96 \times 10^{-6} M$	0.3 nM $5.9 \times 10^{-12} M$	-350 V	7.35 HEPES	agua de mar	[140]
AdsV	HMDE	ácido cloroanílico benzoquinona	$0 - 15 \mu g L^{-1}$ y $2.95 \times 10^{-7} M$	0.14 mM $1.4 \times 10^{-7} M$	50 V	2.3 - 3.0	agua de mar y agua potable y residual	[141]
DPCSV	HMDE	1,10-fenantrolina	4 y 250 $\mu g L^{-1}$ $7.85 \times 10^{-8} M$ $4.9 \times 10^{-6} M$	1.6 $mg L^{-1}$ $3.1 \times 10^{-8} M$	-488 mV	5.7 acetato	agua de mar enriquecida muestras de aleaciones	[142]
DPAdsV	HMDE	2-(5-bromo-2-piridilazo)5-dietilaminofenol, BrO_3^-	$2 \times 10^{-9} M$ y $8 \times 10^{-9} M$	20 $ng L^{-1}$ $3.9 \times 10^{-10} M$	-800 mV	4.5	muestras de agua natural y de pozo.	[143]
LSV	HMDE	bromato de galocianina	0.30 $\mu g L^{-1}$ 200 $\mu g L^{-1}$ $5.9 \times 10^{-9} M$ $3.9 \times 10^{-6} M$	0.05 $\mu g L^{-1}$ $9.8 \times 10^{-10} M$	-100 mV	fosfatos, pH 4.0	muestras de agua y de gasolina	[144]

Continuación tabla 3.1

Técnica Electroquímica	Electrodo	Modificación	Rango dinámico	LOD	Potencial	pH / tampón	Tipos de muestras	Referencias
DPASV	CPE		5 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.07 $\mu\text{g L}^{-1}$				
	Electrodos de pasta de carbón	Bromuro de cetiltrimetil-amonio (CTAB)	$9.8 \times 10^{-8} \text{ M}$ y $3.9 \times 10^{-6} \text{ M}$	$1.38 \times 10^{-9} \text{ M}$	-900 mV	2.2 ácido oxálico	muestras de combustible	[145]
SWSV	HMDE	2,3-dihidroxinaftaleno (DHN)	$5 \times 10^{-11} \text{ M}$ y $4 \times 10^{-9} \text{ M}$	$1.5 \times 10^{-11} \text{ M}$	-100 mV	4.8	muestras de aguas naturales	[146]
			0 y $3. \mu\text{g L}^{-1}$ 0 y $6.9 \times 10^{-8} \text{ M}$	8.0 ng L^{-1} $1.6 \times 10^{-10} \text{ M}$			agua y muestras con matrices bajas contenidos de sal	[147]
AdsSV-FIA	GCMFE	Cupferron BrO_3^-	0.35 nM y 1.35 nM	$7.0 \times 10^{-11} \text{ M}$	100 mV	4.2	aguas naturales y agua de mar	[148]
AdsCSV	HMDE	Bromato de potasio y Catecol	0.2 y 10 nM $3.5 \times 10^{-10} \text{ M}$ y $1.3 \times 10^{-9} \text{ M}$		-100 mV	6.6		

Continuación tabla 3.1

Técnica Electroquímica	Electrodo	Modificación	Rango dinámico	LOD	Potencial	pH / tampón	Tipos de muestras	Referencias	
CSV	SME	antipirilazo III	1.0 x 10 ⁻⁴ M	4 x 10 ⁻¹⁰ M	-750 mV	HOAc-	agua y agua enriquecida	[149]	
			1.0 x 10 ⁻⁸ M			NaOAc			
AdsCSV	Electrodo rotatorio de carbón vítreo y con film de Hg	Pirgalol EDTA	0 -75 µg L ⁻¹	1.0 µg L ⁻¹	-300 mV	NaOAc	hígado	[150]	
			0 y	1.96x10 ⁻⁸ M			bovino, hojas de manzano, y melocotón,		
			1.47x10 ⁻⁶ M				SRM de material particulado urbano		
DPP, DPCSV, DPASV	HMDE, DME, SMDE	Catecol cupferron	0.5-50 mg L ⁻¹	0.25ng L ⁻¹	-100mV - 800 mV	7.8 - 8.9 PIPES	muestras de petróleo	[151]	
			9.8 x 10 ⁻⁶ M	4.9x10 ⁻¹² M					
			y 9.8 x 10 ⁻⁴ M						
LSV	SMDE	2-(2' tiazolilazo)-p-cresol TAC 4-(2-tiazolilazo) resorcinol	9.8 x 10 ⁻⁸ M	39 nM	425mV 460 mV	4.2	agua mineral	[152]	
			y 5.9 x10 ⁻⁷ M	3.9x10 ⁻⁸ M					
			1.96 x10 ⁻⁷ M						
			y 1.37 x10 ⁻⁶ M						

Continuación tabla 3.1

Técnica Electroquímica	Electrodo	Modificación	Rango dinámico	LOD	Potencial	pH / tampón	Tipos de muestras	Referencias
DPSV	SMDE static mercury drop electrode.	Violeta de solocromo RS complejo	0 y $2.1 \mu\text{g L}^{-1}$ o $4.12 \times 10^{-7} \text{ M}$	$1.7 \times 10^{-10} \text{ M}$	-220mV		agua de mar y agua de río	[153]
LSAdsV	HMDE	2-(5'-bromo-2'-piridilazo)-5-dietilaminofenol	$5 \times 10^{-10} \text{ M}$ y $2 \times 10^{-7} \text{ M}$	$2.5 \times 10^{-11} \text{ M}$	-240mV	HOAc- NaOAc pH 4.5	agua de grifo y de grifo enriquecida	[154]
CV			$4.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ y $1.2 \times 10^{-7} \text{ M}$	0.30 nM	700 mV			
LSCSV	HMDE	catecol			900 mV	6.9 HEPES	Muestras de agua de mar	[155]

Tabla 3. 2. Métodos electroquímicos aplicados a la determinación de tungsten en agua y otras matrices

Técnica Electroquímica	Electrodo	Modificación	Rango dinámico	LOD	Potencial	pH / tampón	Tipos de muestras	Referencias
CP	Electrodo de gota de Hg DME	Preconcentrac. por columna de resina Kelex, ácido bencílico y 2-metil-8-quinolinol.	1×10^{-6} M y 1×10^{-5} M	1.0 pM	-0.82 V	5.0	agua de mar y agua artificial	[156]
DPP y de corriente directa DCP	DME	Extracción con salicoilhidroxamato y LiCl metanólico	1.0×10^{-5} M y 1.0×10^{-4} M	$> 10^{-5}$ M	-840 mV	H_3PO_4 0.17M	Muestras de agua enriquecidas y de aceros	[157]
LSV	Electrodo de gota de Hg DME	Rojo de metilo y Ti(III)	$3.2 \mu g L^{-1}$ y $72 \mu g L^{-1}$	$1.1 \mu g L^{-1}$	0.68 V	HCl diluido 5.0 y 6.0 en muestras	Muestras de acero	[158]
AdsCSV	Electrodo de gota suspendida de Hg HMDE	oxina, ácido 3 metoxi-4-hidroxi mandélico	1 nM y 200 nM	5 ng L ⁻¹	1.05 V	Tris HCl pH 8 DDT y cisteína	proteínas y enzimas	[159]
DPASV	Electrodo de grafito	Complejo de W(V) rodamina, antipirina o 4-dimetil-aminoantipirina		1 nM	-400 a -50 mV	H_2SO_4 NH_4SCN	Agua, acero y hojas de aceituno	[160]

Continuación tabla 3.2

Técnica Electroquímica	Electrodo	Modificación	Rango dinámico	LOD	Potencial	pH / tampón	Tipos de muestras	Referencias
DPAdsCSV	Electrodo de film de Hg, renovado	Catecol como ligando	0.025 nM - 130 nM	0.20 nM		clorato V	Material de referencia certificado y agua enriquecida	[161]
DPP	DME midiendo Pico catalítico	Timer	1.0×10^{-7} M y 1.0×10^{-6} M	1.3 nM	-1.09 V	pH 2.2 H_3PO_4 - KCl	Tabaco	[162]
LSV		Complejo con MTB W-2-mercapto-benzotiazol	$4 \mu g L^{-1}$ y $1.4 mg L^{-1}$	$1.2 \mu g L^{-1}$	-1.100 mV	Medio de ácido fuerte	SRM de Sedimentos de río	[163]
	DME							

3.4 Biosensores enzimáticos

En los últimos veinte años, la investigación en el campo de los biosensores ha tenido un gran auge como resultado de la necesidad de desarrollar métodos cada vez más sensibles, rápidos y fáciles de utilizar; que sean capaces de proporcionar información cualitativa y cuantitativa en tiempo real, sobre la composición de una muestra con un mínimo de preparación [164, 165].

Los biosensores son dispositivos que cumplen con estas características, pues utilizan la sensibilidad y selectividad de un bio-receptor unido a una superficie de un transductor. La IUPAC define un biosensor como aquel dispositivo autointegrado que es capaz de responder y transformar una propiedad fisicoquímica o bioquímica en una señal medible, como resultado de un reconocimiento entre el bio-receptor y el analito de interés. Es capaz de proporcionar información cualitativa y cuantitativa utilizando un elemento de reconocimiento biológico (receptor bioquímico), que es retenido en contacto espacial directo con un elemento transductor [165].

El uso de biosensores para determinar compuestos tóxicos, es de gran utilidad debido, ya que son sistemas analíticos sencillos, sensibles y rápidos. Se utilizan cada vez más en diferentes campos tales como el control ambiental, [166, 168] la calidad de vida [169], la microbiología [170, 171], la defensa militar [172], la detección de metales pesados [173], la seguridad alimentaria [174, 175], la determinación de agroquímicos [176] y la detección de drogas y medicamentos en la industria farmacéutica [177, 178], entre otras muchas aplicaciones.

En la figura 3.1 se presenta un esquema de los diferentes componentes de un biosensor: el elemento de reconocimiento, el transductor y el procesador de señales. A menudo los elementos de reconocimiento son enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos o microorganismos. Por su parte los transductores se encargan de convertir cualquier cambio físico o químico en una señal que se puede medir.

Según el tipo de transductor, se tienen biosensores electroquímicos, voltamperométricos o conductimétricos, térmicos, piezoeléctricos u ópticos, siendo los primeros los que más se utilizan [174, 179].

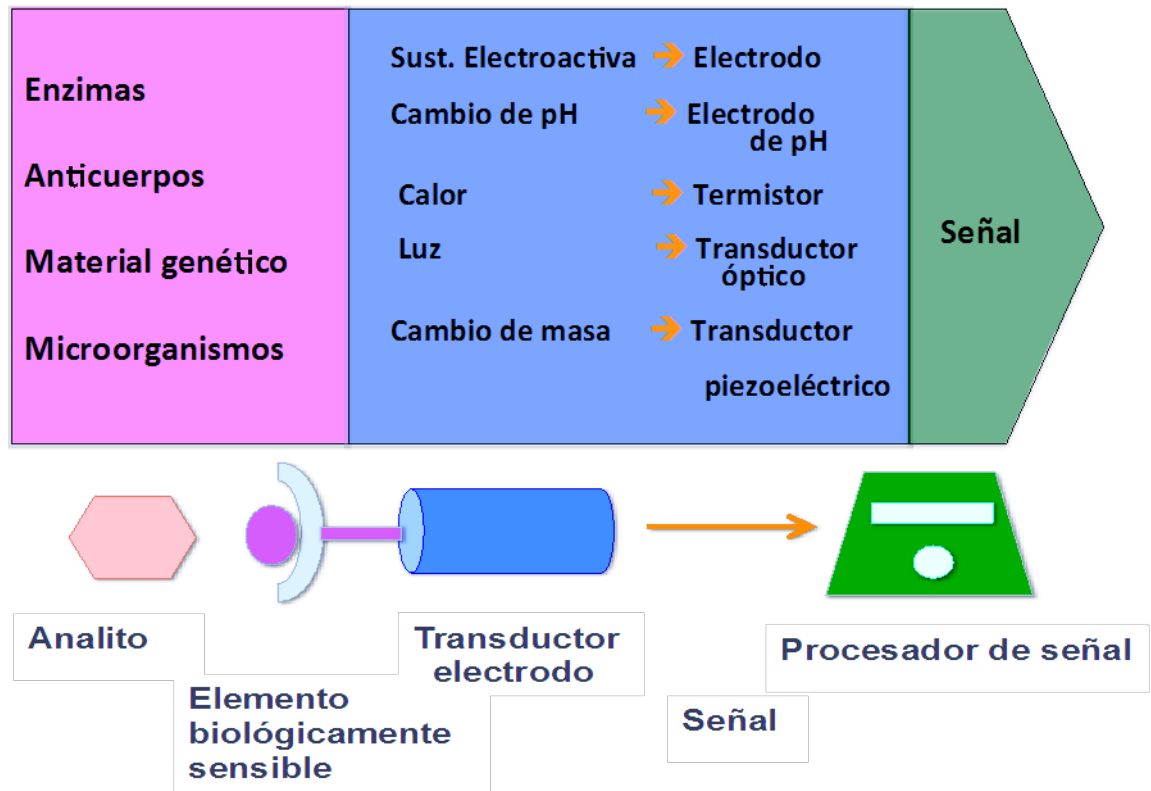


Figura 3.1. Esquema de un biosensor

El uso de enzimas como el componente biológico del biosensor, asegura la detección de todos los componentes que afectan la actividad catalítica de la enzima [176], siendo los biosensores amperométricos enzimáticos de gran utilidad por su sensibilidad y selectividad.

Por la creciente necesidad de llevar a cabo análisis rápidos, sensibles y precisos, los electrodos serigrafados o screen printed carbon electrodes (SPCE) son una alternativa muy interesante en la fabricación de transductores para los biosensores amperométricos enzimáticos, sobre los electrodos convencionales. Estos dispositivos se obtienen imprimiendo con diferentes tintas, sobre diversos tipos de sustratos plásticos o cerámicos. Su gran versatilidad descansa en la diversidad de formas en las que se pueden modificar sus electrodos. La composición de las tintas

puede alterarse por adición de diferentes sustancias tales como metales, enzimas, polímeros, agentes complejantes, mediadores, etc. [180-183].

3.5 La fosfatasa alcalina

Las fosfatasas son enzimas llamadas fosfomonoesterasas que catalizan la reacción de hidrólisis de los monoésteres del ácido ortofosfórico, independiente del tipo de alcohol, enlazado al fosfato. Pertenecen al grupo de enzimas no específicas que participan en la fotosíntesis y otros procesos metabólicos relacionados con la obtención de energía de los organismos. Su actividad enzimática es óptima a pH alcalino entre 8.0 y 9.0, y se utiliza en la industria láctea para controlar la pasteurización. También se utiliza en análisis de diagnóstico de algunas enfermedades.

La fosfatasa alcalina es una metaloproteína que contiene dos iones Zn^{2+} y un residuo de arginina, en contacto directo con el sustrato. Las cargas positivas de los iones zinc y la cadena del residuo de arginina, en el sitio activo de la ALP, se supone generan interacciones electrostáticas con el grupo fosforilo cargado negativamente, del éster de fosfato del sustrato. La fosfatasa alcalina tiene un tercer ion metálico, el Mg^{2+} que parece estar menos involucrado en la acción de la enzima, sin embargo la remoción de este ion metálico tiene efectos adversos sobre la catálisis y sobre la estabilidad de la fosfatasa alcalina [184].

Su actividad catalítica se manifiesta en la hidrólisis de fosfoésteres a fosfato a su correspondiente alcohol o fenolato, que es óptima a pH entre 8.0 y 10.0 [185, 186]. Tiene una amplia especificidad de sustratos de ésteres de fosfato, presumiblemente mediante un intermediario de la fosforil-enzima donde el centro activo es un residuo de serina, el cual es fosforilado [187]. El estado de transición para la formación y descomposición de este intermediario de fosforilo debe presentar una especie pentacovalente trigonal bipyramidal, en la cual los grupos entrantes y salientes son axiales.

La selección de sustratos para aplicaciones analíticas depende del método de detección empleado para monitorizar el producto de la reacción biocatalítica o del

propósito de la medida analítica [188]. Se han utilizado fundamentalmente con esta enzima como sustrato, el fenil fosfato y el 2-fosfo-L-ascorbato trisódico, p-nitrofenil fosfato, p-nitrofenol, α -naftil fosfato, α -naftol, p-aminofenilfosfato, catecol y monofosfato de catecol. La fosfatasa alcalina, en las últimas décadas se ha utilizado ampliamente como enzima marcadora en inmunoensayos, debido al alto número de conversión del sustrato, a la variedad de sustratos que se pueden utilizar y a las posibilidades de aplicación para determinar su actividad, por métodos espectrofotométricos y electroquímicos [189-192].

3.6 La lacasa

La lacasa es una óxido reductasa, que pertenece al grupo de cobre multinuclear, que contienen las enzimas llamadas oxidasas azules, que catalizan la oxidación de los grupos orto, meta y para fenoles, aminofenoles, otras diaminas arilo y otros grupos funcionales [193, 194] con reducción de oxígeno a agua [195, 196]. Se ha reportado el uso de la lacasa como un biocatalizador atractivo para cátodos enzimáticos de biocombustibles, por su alto potencial redox y buena estabilidad. La lacasa junto a la bilirrubina oxidasa son enzimas típicas de reducción de oxígeno, frecuentemente utilizadas para construir biocátodos [197-199].

La lacasa es una de las enzimas conocida desde el siglo XIX. Contiene entre dos y cuatro átomos de cobre, del tipo polifenol oxidasa, y fue descubierta en 1883 por Yoshida, quien describió su presencia en los exudados del árbol de laca japonés, *Rhus vernicifera*, sin embargo no fue sino hasta 1896, que Bertrand y Laborde demostraron que esta enzima también estaba en los hongos [200, 201].

Las lacasas se pueden encontrar en plantas y hongos, pero además en unos cuantos insectos y bacterias. Se clasifican en dos grupos de acuerdo con las principales fuentes de que proceden, ya sean hongos o plantas. Además las difenol oxidasas (lacasas) han sido identificadas en bacterias e insectos. En plantas se les puede encontrar en árboles, repollos, remolachas, nabos, espárragos, papas y otros muchos vegetales y frutas como manzanas, peras, mangos, melocotones, ciruelas, y otros. Se les ha detectado en docenas de insecto de géneros tales como Bombyx,

Alliphora, Diploptera, Drosophila, Lucilia, Manduca, Musca, Oryctes, Papilio, Phornia, Rhodnius, Sarcophaga, Schistocerca y Tenebrio [202, 203].

La enzima lacasa presenta una amplia especificidad de sustratos, que pueden ser mejorados por adición de mediadores redox. La eficiencia de estos mediadores ha sido demostrada en trabajos presentados en varias publicaciones. [166, 204]. Debido a la amplia variedad de reacciones catalizadas por la lacasa, esta enzima promete una amplia variedad de aplicaciones potenciales.

La lacasa contiene entre dos y cuatro átomos de cobre por molécula de enzima. La principal característica de la lacasa como oxidasa de multicobre [166, 203, 205] es el potencial estándar de reducción, del sitio T_1 de Cu. Se ha demostrado que para algunas lacasas el sitio activo T_1 es el principal centro aceptor de electrones de los sustratos donadores o electrodos. [205-207]. El alto potencial redox de este sitio (780 mV vs. ENH, pH 6.5) permite mediciones de electrocatálisis directas de la reducción de O_2 , por parte de la lacasa adsorbida sobre el electrodo desnudo de grafito con bajos sobrepotenciales, comparados con el equilibrio termodinámico del par O_2 / H_2O [208]. Adicionalmente la eficiencia catalítica de algunos sustratos donadores, depende del potencial redox del sitio activo (k_{cat} / K_m) T_1 [209]. Esto explica por qué los altos potenciales redox de las lacasas generan un interés especial en el campo de la biotecnología, particularmente en procesos de blanqueamiento [210, 211] y biorremediación [212-214].

En la década pasada, se dieron importantes avances tecnológicos en el desarrollo de herramientas y materiales para construir dispositivos como los biosensores [215, 216]. El desarrollo de biosensores amperométricos basados en la inmovilización de enzimas sobre la superficie del electrodo, que puedan mantener su actividad y estabilidad, es uno de los aspectos más importantes en algunos campos que van desde el aspecto ambiental hasta en diagnóstico clínico [193, 217]. En el caso particular de los biosensores basados en la lacasa, se han hecho grandes esfuerzos para desarrollar varias estrategias de inmovilización de esta enzima, sobre diferentes superficies, con el fin de diseñar biosensores con una amplia variedad de aplicaciones [190, 206, 218-222]. La retención de la bioactividad depende

principalmente del método de inmovilización, por ejemplo por enlace covalente, atrapamiento y atracción electrostática y ensamblados mixtos, entre otros [223, 224].

Diferentes métodos de inmovilización de las lacasas se describen en la literatura, por ejemplo por adsorción física de la enzima sobre superficies de electrodos sólidos, enlaces covalentes sobre materiales de carbón, oro o platino, con reactivos bifuncionales, o incorporación de la enzima en una matriz polimérica [176, 225-229]. También ha sido reportada la adsorción de la lacasa sobre el electrodo de oro, o la inmovilización de la enzima sobre electrodos de oro modificados con monocapas autoensambladas de moléculas de aminotiofenol [230, 231].

3.7 Nanomateriales

El desarrollo de nuevos materiales a nanoescala ha adquirido gran importancia en años recientes, ya que presentan un amplio espectro de aplicaciones en muchos campos. Estos materiales hechos de metales, semiconductores y compuestos orgánicos, pueden mejorar las propiedades ópticas, magnéticas, eléctricas y químicas relevantes, para sensores con propósitos analíticos [232-235]. Entre estos materiales se encuentran las nanopartículas de metales como platino, oro, plata, entre otros, lo mismo que nanotubos de carbono de pared simple o múltiple y las monocapas autoensambladas de tioles.

En la literatura se enumeran numerosos métodos que describen la síntesis de nanopartículas metálicas en solución y por deposición sobre superficies sólidas [236]. En estas se incluyen síntesis química por medio de la reducción con diferentes reactivos [237], por irradiación de luz ultravioleta o rayo de electrones [238] y métodos electroquímicos [239-242]. Estos últimos proporcionan un método rápido y fácil de preparar electrodos de estas nanopartículas metálicas en un periodo de tiempo corto. Solo algunas pocas referencias describen la síntesis de nanopartículas de oro AuNPs, sobre electrodos serigrafiados de carbono SPCE. Se incluye la síntesis química por reducción con NaBH_4 [243, 244], citrato [245] y la electrodeposición electroquímica [242].

Desde principios de la década de 2000, el uso de los diferentes nanomateriales mejoraron las propiedades analíticas de los biosensores enzimáticos. El uso de las nanopartículas de oro, AuNPs, mejoran la capacidad electroanalítica y se observa un incremento creciente de la conductividad, la biocompatibilidad y la fácil transferencia de carga entre la proteína y la superficie del electrodo. Más aún, las AuNPs mejoran la inmovilización de las biomoléculas manteniendo su bioactividad [235, 246, 247].

Los nanotubos de carbono (CNT) son un nuevo material inorgánico nanoestructurado, utilizado como sustancia de inmovilización, para diferentes mediadores de transferencia de electrones, los cuales también han sido utilizados para aumentar las características de los biosensores enzimáticos. El uso de estos materiales en la preparación de sensores electroquímicos y biosensors está bien documentado por parte de diferentes grupos de investigación. Sus propiedades electrónicas son aprovechadas como un medio de promover la transferencia electrónica de un amplio grupo de moléculas y especies biológicas [203, 249-252]. Estos CNTs representan un importante grupo de nanomateriales con propiedades geométricas, mecánicas, electrónicas y químicas únicas, además de una área superficial específica, una alta relación superficie/volumen, gran fuerza mecánica, estabilidad química y altamente modificables químicamente, por lo que tienen actualmente una amplia utilidad en diferentes aplicaciones [206, 209, 212, 253-258].

Los nanotubos de carbono se pueden dividir en nanotubos de pared simple (SWCNT) por sus siglas en inglés, y los de pared múltiple (MWCNTs). Los SWCNT poseen una nanoestructura cilíndrica formada por una sola hoja de grafito arrollada en forma de tubo. Los de pared múltiple consisten en un arreglo de esos nanotubos que están arrollados como los anillos de un tronco de madera. Sus propiedades características los hacen únicos y extremadamente atractivos para las tareas de modificación de superficies y detección electroquímica. Los estudios más recientes señalan que pueden promover la reactividad electroquímica de analitos importantes e impartir resistencia contra fallas en la superficie.

Además la integración de MWCNTs y las AuNPs con un efecto sinérgico ha demostrado ser una promesa en sensores químicos [259, 260]. Las nanopartículas de oro AuNPs, funcionalizadas conjuntamente con nanotubos de carbono MWCNT, se reportan con muy buena biocompatibilidad para la lacasa y otras enzimas [235, 254].

La formación de las monocapas autoensambladas de compuestos organosulfurados (SAMs) por sus siglas en inglés, ha atraído la atención de muchos investigadores desde finales de la década de 1980, por su uso potencial en muchas aplicaciones científicas y tecnológicas como protector de superficies ante la corrosión, como interface en biosensores, como un híbrido de celdas fotovoltaicas o en electrónica orgánica [261-263].

Las películas de monocapas se adsorben espontáneamente sobre la superficie de oro, a partir de una mezcla alcohólica de dos mercaptanos para formar una superficie sin poros, esto ha sido reportado por Chailapakul y Crooks en 1992 [264]. Estas monocapas están formadas por un marco de un n-alcanotiol retardante de la transferencia de carga, que pasiva la superficie de oro. Un mercaptano aromático más corto induce defectos de tamaño de molécula con el enmarcado de pasivación [226, 265, 266]. Las monocapas adsorbidas espontáneamente de n-alcanotioles [$X(CH_2)_nSH$, con $n > 10$] sobre las superficies de oro, basadas en una fuerte interacción entre el oro y el sulfuro, son apropiadas para controlar y manipular la reactividad en la interfase. Estas monocapas de alcanotioles se pueden formar sumergiendo durante varias horas un electrodo de oro, o de carbono recubierto con una película de oro o con nanopartículas de oro, en soluciones etanólicas que contienen concentraciones milimolares de alcanotioles. Se basan en fuertes interacciones entre el oro y el azufre, y se pueden utilizar para controlar y manipular la reactividad en la interfase del electrodo [267-269].

Estas SAMs permiten diseñar superficies de electrodos con propiedades controladas, por lo que se han convertido en una técnica muy útil para crear superficies funcionalizadas. Las SAMs con grupos químicos específicos están siendo utilizadas cada vez más en el reconocimiento molecular [269]. Las ventajas de estas técnicas incluyen simplicidad en la preparación, versatilidad, estabilidad,

reproducibilidad y la posibilidad de introducir diferentes funcionalidades químicas con un alto grado de orden en la dimensión molecular [271, 272]. Muchas son las aplicaciones de estas monocapas en la preparación de sensores y biosensores, dispositivos de almacenamiento de información y en electrodos serigrafiados [273, 274].

La reacción del oro y el azufre se resume en la siguiente reacción del enlace S-H que es el centro de la formación de la monocapa



Las fuerzas de Van der Waals entre los grupos metileno orientan la monocapa, por lo tanto ese proceso de autoensamblaje es el resultado de una buena organización. Las terminales de sulfuro de las moléculas están unidos al oro vía enlace fuerte S-Au, mientras que un grupo funcional está enlazado al otro extremo, controla las propiedades de la superficie de los electrodos que pueden diseñarse para muchas aplicaciones [230].

3.8 Cinética Enzimática

Un catalizador es una sustancia que acelera una reacción química sin que cambie la naturaleza o las cantidades de los productos formados y que no se consume en el proceso. Las enzimas son catalizadores biológicos que proceden de los tejidos plantas y animales y están constituidas por proteínas de alto peso molecular, macromoléculas de 10^4 a 10^6 g mol⁻¹ con 10^2 a 10^4 aminoácidos; algunas contienen coenzimas o grupos prostéticos que son unidades orgánicas no proteicas.

Las enzimas poseen un sitio activo que contiene aminoácidos y grupos sustituyentes específicos, los cuales enlazan a molécula llamadas sustratos catalizando reacciones químicas específicas. A menudo el sitio activo encierra al sustrato formando un complejo enzima-sustrato, que es el punto central de la actividad enzimática. La función de un catalizador es aumentar la velocidad de una reacción, sin alterar los equilibrios involucrados.

La velocidad de una reacción catalizada por una enzima es proporcional a la concentración de la enzima y en presencia de un exceso de sustrato, muestra una relación lineal entre la velocidad y la concentración de la enzima, hasta que la velocidad de reacción alcanza un valor constante. También esa velocidad depende de la concentración del sustrato. A baja concentración de sustrato y en presencia de exceso de enzima, la relación de la velocidad de reacción y la concentración del sustrato es casi lineal y cumple con una reacción de primer orden [275].

3.8.1 Inhibición enzimática

Algunas moléculas pueden interferir en la catálisis, alterando o disminuyendo la actividad enzimática, por lo que se les considera como inhibidores enzimáticos. La unión de un inhibidor puede evitar la entrada del sustrato al sitio activo de la enzima, con lo que puede impedir que la enzima catalice la reacción correspondiente. Sin embargo, no todas las moléculas que se unen a las enzimas son inhibidores; otras moléculas actúan como activadores enzimáticos ya que cuando se unen a una enzima pueden incrementar su actividad. Esta unión del inhibidor con la enzima puede ser reversible o irreversible, por lo que se clasifican como inhibidores enzimáticos: reversibles e irreversibles.

3.8.1.1 Inhibición Reversible

La inhibición reversible se puede caracterizar de acuerdo al tipo de unión del inhibidor a la enzima, del complejo enzima-sustrato y de los efectos en las constantes cinéticas de la enzima. En el esquema clásico de Michaelis-Menten mostrado abajo, una enzima se une a su sustrato para formar el complejo enzima-sustrato. En la catálisis, este complejo se rompe para liberar el producto y la enzima libre. El inhibidor puede unirse tanto a la enzima como al complejo enzima-sustrato según las constantes de disociación K_i o K_i' respectivamente. Los inhibidores reversibles se unen a las enzimas mediante interacciones no covalentes como los puentes de hidrógeno, enlaces iónicos e interacciones hidrofóbicas. Los enlaces que se dan entre el inhibidor y el sitio activo son débiles pero se combinan para producir una unión más fuerte y específica. Generalmente los inhibidores reversibles no sufren

reacciones químicas cuando se unen a la enzima, por lo tanto se pueden eliminar con facilidad ya sea por dilución o por diálisis [276].

Los inhibidores reversibles se clasifican según el efecto sobre el inhibidor, que se produce por la variación de la concentración del sustrato afin a la enzima: la inhibición competitiva, la inhibición no competitiva y la inhibición mixta, además hay algunos casos especiales que no se incluyen en esta discusión.

3.8.1.1.1. Inhibición Competitiva

En la inhibición competitiva, que se esquematiza en la figura 3.2, el sustrato y el inhibidor no se pueden unir a la enzima simultáneamente. Esto ocurre cuando el inhibidor tiene afinidad por el sitio activo de la enzima, al cual es afín el sustrato, por tanto el sustrato y el inhibidor compiten por el mismo sitio activo. Esta inhibición se puede evitar con concentraciones suficientemente altas del sustrato, de manera que se deje fuera de competencia al inhibidor.

Los inhibidores competitivos se asemejan en estructura al sustrato verdadero, de manera que se pueden unir a la enzima pero no al complejo enzima-sustrato. La inhibición competitiva aumenta el valor de K_m (es decir, el inhibidor interfiere con la unión del sustrato), pero no afecta a la V_{max} (el inhibidor no obstaculiza la catálisis en la enzima-sustrato porque no se puede unir a dicho complejo. En la figura 3.2 se observa que el sitio activo de la enzima puede ser ocupado por el sustrato o por el inhibidor.

En la inhibición acompetitiva el inhibidor se enlaza en un sitio distinto al sitio activo y a diferencia del inhibidor competitivo solamente se une al complejo enzima sustrato. La figura 3.3 muestra la unión enzima-sustrato-inhibidor.

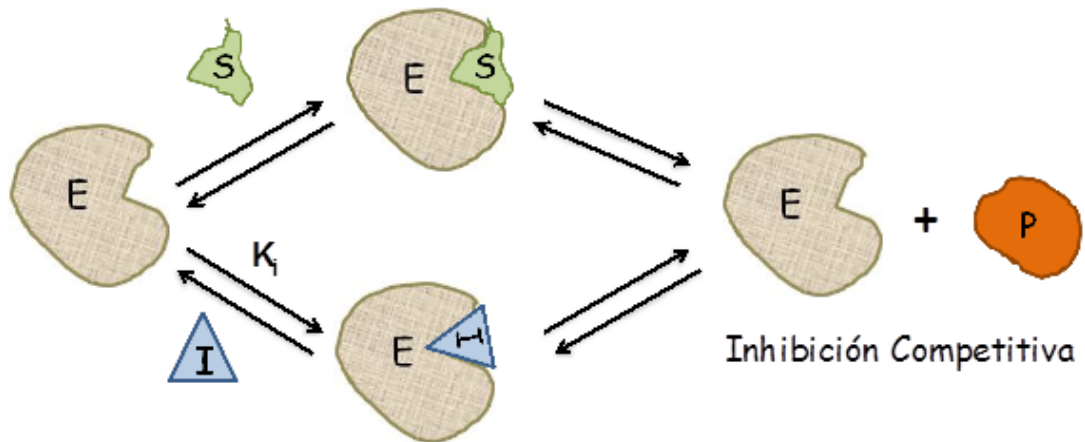


Figura 3. 2. Representación de la inhibición competitiva. (E) enzima, (S) sustrato, (I) inhibidor, (ES) enzima-sustrato, (EI) enzima inhibidor y (P) producto [276].

3.8.1.1.2 Inhibición no Competitiva

En la inhibición no competitiva el inhibidor se puede unir a la enzima al mismo tiempo que el sustrato. Sin embargo, la unión del inhibidor afecta la unión del sustrato, y viceversa. Este tipo de inhibición se puede reducir, pero no se puede mejorar, al aumentar las concentraciones del sustrato. Aunque es posible que los inhibidores de tipo mixto se unan en el sitio activo, este tipo de inhibición resulta generalmente de un efecto alostérico, ya que el inhibidor se une a otro sitio que no es el sitio activo de la enzima. La unión del inhibidor con el sitio alostérico cambia la conformación (es decir, la estructura terciaria o la forma tridimensional) de la enzima, de modo que la afinidad del sustrato por el sitio activo se reduce. Por tanto los inhibidores no competitivos tienen afinidades idénticas por la enzima y la enzima-sustrato, por lo que $K_i = K_i'$. La inhibición no competitiva no cambia la K_m (es decir, no afecta a la unión del sustrato) pero disminuye la V_{max} , o sea la ordenada en el origen aumenta (la unión del inhibidor obstaculiza la catálisis). En la figura 3.4 se observa que el sitio activo de la enzima es ocupado por el sustrato y el inhibidor, formando un complejo enzima-sustrato-inhibidor, y se considera a este tipo de inhibición como un tipo particular de inhibición mixta.

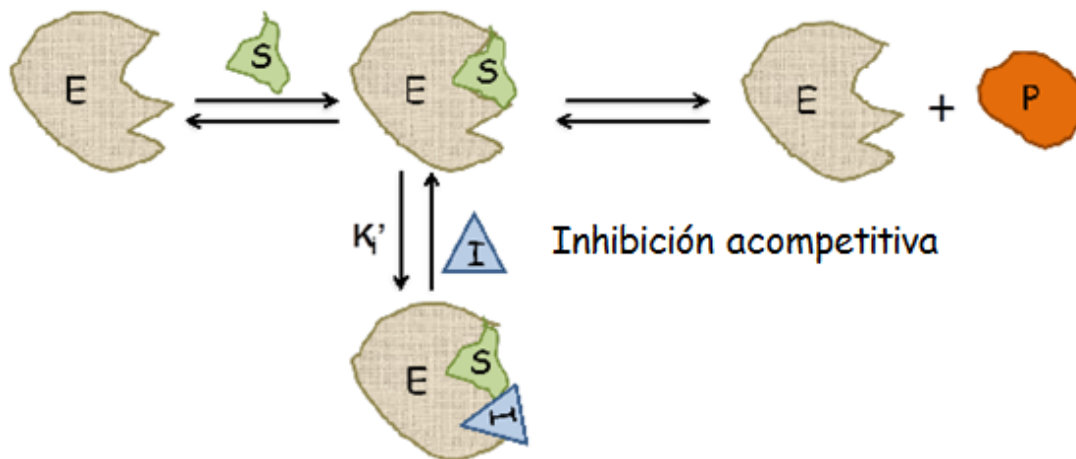


Figura 3.3. Representación esquemática de la inhibición acompetitiva, (E) enzima, (S) sustrato, (I) inhibidor, (ES) enzima-sustrato, (ESI) enzima sustrato-inhibidor y (P) producto [276].

3.8.1.1.3 Inhibición Mixta

La inhibición mixta, es una forma de inhibición, donde la unión del inhibidor con la enzima reduce su actividad, pero no afecta la unión con el sustrato. Como resultado, el grado de inhibición depende solamente de la concentración de inhibidor. Los inhibidores de tipo mixto se unen tanto a la enzima como al complejo enzima-sustrato, pero sus afinidades por estas dos formas de enzimas son distintas ($K_i \neq K_i'$). Por lo tanto, los inhibidores de tipo mixto interfieren con la unión del sustrato, aumentando el valor de la K_m y dificulta la catálisis en el complejo enzima-sustrato, disminuyendo la V_{max} [276, 277]. En la figura 3.4 se observa que el sitio activo de la enzima puede ser ocupado por dos vías, primero por el sustrato y luego por el inhibidor, formando el complejo enzima-sustrato-inhibidor, o se une primero el inhibidor y luego el sustrato formando el mismo complejo enzima-sustrato-inhibidor.

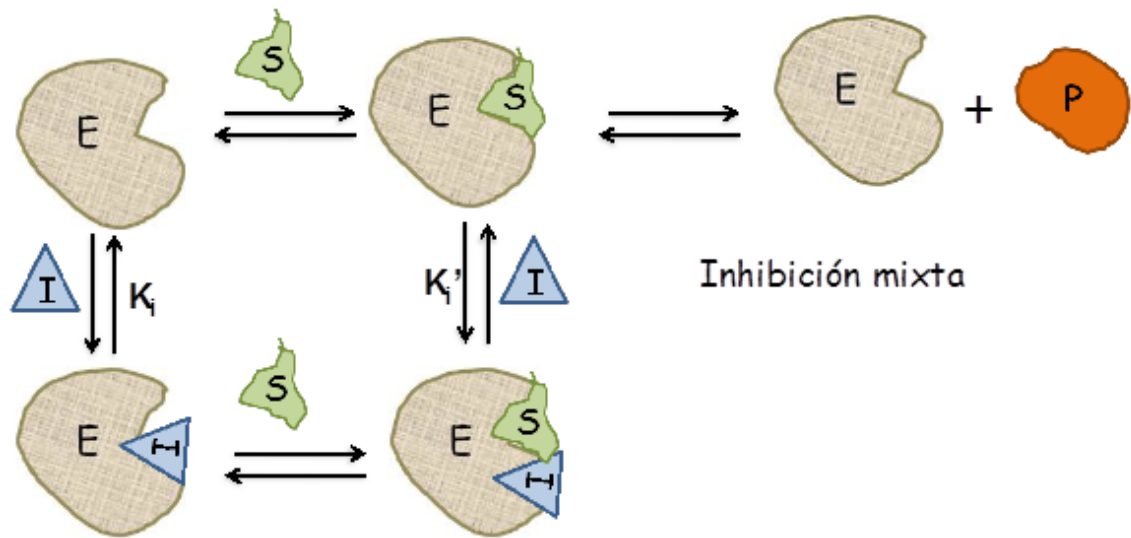


Figura 3.4. Representación de la inhibición mixta y no competitiva, (E) enzima, (S) sustrato, (I) inhibidor, (ES) enzima-sustrato, (ESI) enzima sustrato-inhibidor y (P) producto.[272]

3.8.1.2 Inhibición Irreversible

Generalmente los inhibidores irreversibles son específicos para un tipo de enzima, por lo que pueden inactivar a todas las proteínas, no destruyen la estructura proteica, sino que alteran específicamente la estructura tridimensional del sitio activo y lo inhabilitan. Estos inhibidores reaccionan con la enzima en forma covalente, entre el sitio activo de la enzima y el inhibidor, también pueden destruir los grupos funcionales o modificar su estructura química, a nivel de residuos esenciales de los aminoácidos, necesarios para la actividad enzimática. Casi todas las proteínas se desnaturalizan por efectos del pH o de temperaturas extremas, pero no es una alteración específica. Algunos tratamientos químicos no específicos destruyen la estructura de la proteína, por ejemplo los ácidos fuertes hidrolizan los enlaces peptídicos que enlazan los aminoácidos de las proteínas [276-278].

El término irreversible significa que la descomposición del complejo enzima-inhibidor produce la destrucción de la enzima, por ejemplo por hidrólisis, oxidación, etc. Este proceso generalmente ocurre por pasos y podría acelerarse con reactivos particulares; la cinética de inhibición depende fuertemente de la configuración del biosensor y la inhibición no puede ser invertida. Los inhibidores irreversibles suelen

contener grupos funcionales reactivos como aldehídos, haloalcanos o alquenos. Estos grupos electrofílicos reaccionan con las cadenas de aminoácidos para formar uniones covalentes. Los residuos modificados son aquellos que contienen en sus cadenas laterales nucleófilos como por ejemplo un grupo hidroxilo o un grupo sulfhidrilo. Esto incluye a los aminoácidos como la serina, la cisteína, la treonina o la tirosina [279-281].

Como se muestra en la figura 3.5, los inhibidores irreversibles forman inicialmente un complejo reversible y no covalente con la enzima, que reaccionará posteriormente para producir una modificación covalente en lo que se denomina el "complejo del punto muerto", ya que la formación del complejo enzima-inhibidor puede competir con el complejo enzima-sustrato. La unión de los inhibidores irreversibles puede prevenirse por competencia, tanto con el sustrato como con un segundo inhibidor reversible. Este efecto de protección es una buena evidencia de una reacción específica del inhibidor irreversible con el sitio activo [282-284].

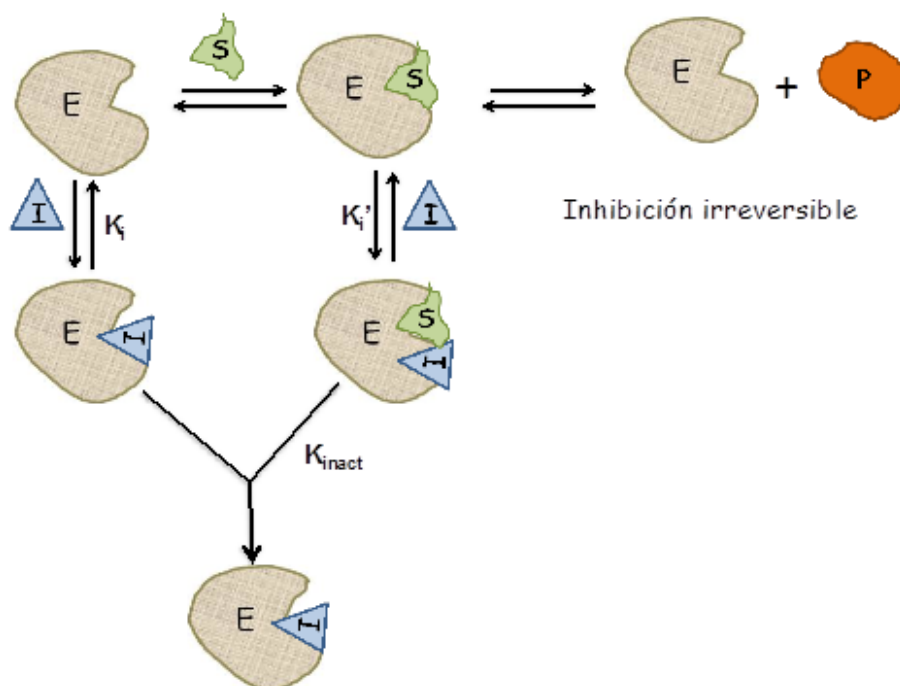


Figura 3.5. Esquema de la cinética enzimática de los inhibidores irreversibles, (E) enzima, (S) sustrato, (I) inhibidor, (ES) enzima-sustrato, (EI) enzima-inhibidor, (ESI) enzima sustrato-inhibidor, (EI*) enzima-inhibidor activado y (P) producto [281].

3.8.2 Ecuación de Michaelis-Menten

La concentración de sustrato que da como resultado una velocidad de reacción igual a un medio de la velocidad máxima $1/2V_m$, es la constante de Michaelis-Menten, cuya ecuación es característica para cada enzima actuando sobre un sustrato específico. Esta ecuación en ausencia de un inhibidor se puede expresar como sigue:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

V_{max} = máxima velocidad, V_0 = máxima velocidad en ausencia del inhibidor, K_m = constante de Michaelis-Menten del sustrato y $[S]$ = concentración de sustrato. En presencia de un inhibidor competitivo, la ecuación de Michaelis-Menten se transforma en:

$$V_i = \frac{V_{max} [S]}{K_m(1 + [I]/K_i) + [S]}$$

Siendo V_i = velocidad en presencia de inhibidor, $[I]$ = concentración del inhibidor, K_i = constante de disociación del complejo enzima-sustrato. Cuando $I = I_{50}$, significa que se ha consumido un 50 % del inhibidor y $V_0 = V_i$, entonces

$$\frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} = \frac{2V_{max} [S]}{K_m(1 + [I_{50}]/K_i) + [S]}$$

por lo tanto

$$\frac{I_{50}}{K_i} = \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right)$$

Los métodos gráficos que presentan pendientes constantes y líneas rectas de mejor ajuste, se han utilizado para generar e interpretar los datos cinéticos, con el fin de determinar las constantes de disociación de los compuestos enzima-sustrato y enzima-inhibidor y otras constantes relacionadas, cuando los datos encontrados son consistentes con los mecanismos asignados [282, 285, 286].

Por ejemplo una gráfica de Lineweaver-Burk se contruye con el inverso de la

velocidad observada en "Y" contra el inverso de la concentración del sustrato $[S]$, en "X" que genera en el caso más simple, una línea recta, cuya pendiente e intercepto en la ordenada, proporciona el valor de la constante K_m de disociación de Michaelis-Menten y V_{max} la velocidad teórica máxima respectivamente [277, 278].

Los inhibidores enzimáticos son usados en la naturaleza y están implicados en la regulación del metabolismo. Por ejemplo, entre los inhibidores enzimáticos naturales se encuentran los venenos, utilizados como defensa contra los depredadores o para matar a una presa. Otros inhibidores enzimáticos celulares son proteínas que se unen específicamente e inhiben una llamada enzimática. Esto puede ayudar a controlar enzimas que pueden ser dañinas para la célula, como las proteasas o nucleasas. Un buen ejemplo es el inhibidor de la ribonucleasa, que se une a esta enzima en una de las interacciones proteína-proteína más fuertes conocidas. Las enzimas en una ruta metabólica pueden ser inhibidas por los productos resultantes de sus propias rutas. Este tipo de retroalimentación negativa retarda el flujo a través de la ruta, cuando los productos comienzan a acumularse y es una manera importante de mantener la homeostasis en una célula. Muchos medicamentos son inhibidores enzimáticos, por lo que su descubrimiento y mejora es un campo de investigación activo en la bioquímica y la farmacología.

Cuando una enzima tiene múltiples sustratos, los inhibidores pueden mostrar distintos tipos de inhibiciones, dependiendo del sustrato que se considere, ya que el sitio activo posee dos diferentes lugares, para la unión con el sustrato en el mismo sitio activo, uno para cada sustrato. Por ejemplo, un inhibidor puede competir con el sustrato A por el primer sitio de unión, pero ser un inhibidor no competitivo con respecto al sustrato B en el segundo sitio de unión [287].

Según lo mencionado anteriormente, un inhibidor enzimático está caracterizado por sus dos constantes de disociación, K_i y K_i' , de la enzima y del complejo enzima-sustrato, respectivamente. La constante del complejo enzima-inhibidor K_i puede ser medida directamente por varios métodos. Un método extremadamente exacto es la calorimetría isoterma de titulación, en donde se valora el inhibidor en una solución de enzimas y se mide el calor liberado o absorbido

[288.] Sin embargo, la otra constante de disociación K_i' es difícil de medir directamente, ya que el complejo enzima-sustrato tiene un periodo de vida muy corto y da lugar a la reacción química para formar el producto. Por lo tanto, K_i' suele medirse de forma indirecta, observando la actividad enzimática bajo varias concentraciones de sustrato e inhibidor, y ajustando los datos a una ecuación de Michaelis–Menten modificada [289]:

$$V = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_m + \alpha'[S]} = \frac{(1/\alpha')V_{max}[S]}{(\alpha/\alpha')K_m + [S]}$$

donde los factores de modificación α y α' son definidos por la concentración del inhibidor y sus dos constantes de disociación:

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i} \quad y \quad \alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_i'}$$

La efectividad de la enzima K_m y V_{max} es ahora $(\alpha/\alpha')K_m$ y $(1/\alpha')V_{max}$, respectivamente, en presencia del inhibidor. Esta ecuación de Michaelis-Menten modificada asume que la unión enzima-inhibidor alcanza el equilibrio, el cual puede ser un proceso muy lento para los inhibidores con constantes secundarias de disociación a nivel nanomolar. Por lo tanto, en estos casos es preferible tratar al inhibidor de unión fuerte, como un inhibidor irreversible (ver abajo). Sin embargo, todavía puede ser posible estimar K_i' cinéticamente si K_i es medido independientemente [289].

Los efectos de los diferentes tipos de inhibidores enzimáticos reversibles en la actividad enzimática, se pueden visualizar utilizando la representación gráfica de la ecuación de Michaelis–Menten, mediante los diagramas de Lineweaver-Burke o de Eadie-Hofstee, como se muestran en la figura 3.6.

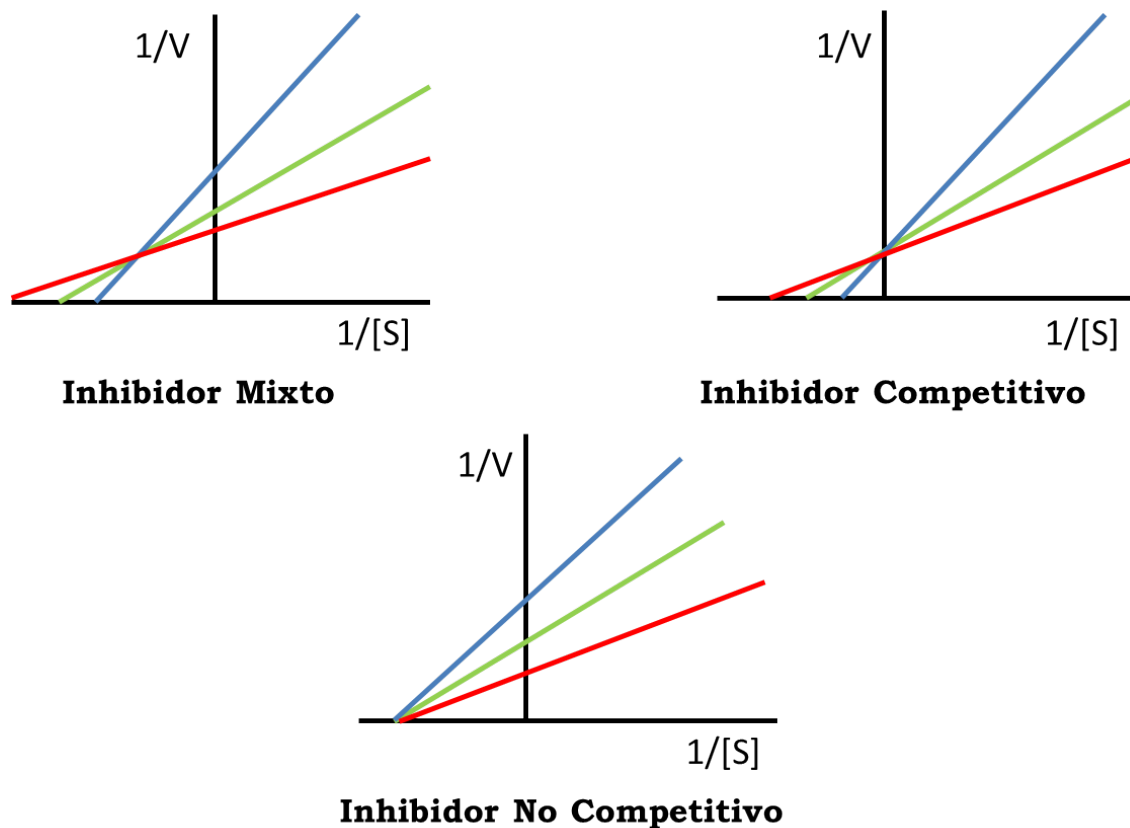


Figura 3. 6. Gráficas de Lineweaver Burk para los diferentes tipos de inhibidores, (rojo) enzima sin inhibidor, (verde) enzima con inhibidor, (azul) enzima con inhibidor a mayor concentración de inhibidor [289].

3.8.3 La inhibición enzimática por metales

La inhibición de enzimas por parte de iones metálicos es un tema bastante estudiado debido a su importancia, pues muchas de las enzimas tienen iones metálicos en su estructura o se ven afectadas por la presencia de muchos iones, lo que ha sido base para la preparación de infinidad de fármacos que combaten diversas enfermedades. Los iones metálicos tales como Cu(II) o Zn(II) son fisiológicamente importantes y juegan un papel crucial en muchas funciones biológicas. Se ha reportado que algunos metales como zinc, níquel, vanadio y otros han sido útiles en la terapia de la diabetes [290-292].

Ciertas especies metálicas como el V(V) y W(VI) inhiben la actividad de algunas enzimas y este hecho es utilizado para la determinación de dichos metales, por medio de biosensores enzimáticos. Por ejemplo Chouteau y colaboradores mencionan que la actividad de la fosfatasa alcalina se ve inhibida principalmente por iones de metales pesados, y que a partir de esta premisa se pueden preparar biosensores multienzimáticos, que permitan la detección de diferentes grupos de contaminantes con un mismo dispositivo [293].

Los compuestos de vanadio son considerados los mejores miméticos de la insulina y presentan efectos contra el cáncer. Estos compuestos específicamente los complejos de vanadato y de peroxivanadio, son inhibidores competitivos de la proteína tirosina fosfatasa (PTP). El vanadio actúa como un estado de transición análogo, enlazándose en forma reversible a un grupo tiol en el dominio catalítico, mientras que los complejos de peroxivanadio oxidan un residuo de cisteína crítica en el dominio catalítico [294].

El ion vanadato monomérico presenta una estructura tetraédrica y por lo tanto análoga a la de iones fosfato. El vanadato monomérico (VO_4^{3-}) es un inhibidor muy conocido y utilizado por una variedad de enzimas como las ATPasas y fosfatasa, debido a su capacidad de imitar la estructura del fosfato [33, 295]. Menos conocida es la capacidad del decavanadato polimérico para inhibir dos enzimas, la fosfofructoquinasa de corazón de oveja y la adenilato quinasa de hígado de rata [296].

La glucosa en presencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y de vanadato forma ácido glucónico. La glucosa-6-fosfato es el sustrato normal para esta enzima, pero se ha demostrado que los grupos alcohol en presencia de vanadato, forman rápida y reversiblemente ésteres de vanadato, de modo que la glucosa-6-vanadato se producirá en solución, junto con otros derivados de vanadato, los cuales no sirven como sustratos enzimáticos [187]. El estado de la carga y el tamaño del grupo vanadato no difieren notablemente de la del fosfato correspondiente. De hecho, el grupo fosfato es utilizado por la enzima, para colocar adecuadamente el sustrato y luego promover una reacción química en una ubicación remota. En presencia de

vanadato, un número de enzimas metabolizadoras de fosfato, funcionan de una manera similar a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Tales enzimas incluyen epimerasas, mutasas e isomerasas. Para estas enzimas, el papel del vanadato es convertir un compuesto en una forma que es reconocida por la enzima, de manera que puedan ocurrir reacciones químicas [297].

El tungsteno está presente en varias enzimas, como la familia de las aldehído ferredoxin-oxidoreductas, la familia formaldehído ferredoxin oxidoreductasas, y la formato deshidrogenasa, que catalizan la oxidación de aldehídos a ácidos carboxílicos [298].

También esse sabe que el tungsteno es un inhibidor competitivo *in vivo* de las funciones del molibdeno en ciertos procesos, incluyendo la utilización del nitrato y la fijación del nitrógeno en varios organismos diferentes. Su efecto inhibitorio se debe a la formación de la tungsto-proteína inactiva, análoga a las enzimas correspondientes *in vivo* pero no *in vitro* [299]. También se reporta la inhibición de la nitrato reductasa por parte del molibdeno y el tungsteno [300].

Schröder et al. realizaron estudios con animales de laboratorio y encontraron que el tungsteno inhibe el 50% de la actividad de la xantino oxidasa en sangre de animales de control [301, 302].

Lorenzo et al. llevaron a cabo un estudio sobre la inhibición de la enzima lacasa, por parte de algunos compuestos orgánicos que forman complejos con el cobre enlazado a esta enzima, además estudiaron varios cationes metálicos como Cd^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} y observaron una fuerte inhibición por parte del Cd^{2+} seguido del Cu^{2+} mientras tanto ni el Mn^{2+} ni el Zn^{2+} afectaron la actividad enzimática a las concentraciones evaluadas [303].

Se realizó una búsqueda exhaustiva de la bibliografía disponible y no se ha encontrado ningún reporte sobre el efecto inhibitorio de este metal en la actividad enzimática de la lacasa.

3.9 Referencias

1. Featherstonhaugh, G.F. (1831). The Monthly American Journal of Geology and Natural Science, 69.
2. Roscoe, H.E. (1869-70). Researches on Vanadium. Part II. *P. R. Soc. London*, 18, 37.
3. Rodríguez-Mercado, J.J., Altamirano-Lozano, M.A. (2006). Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 22, 173–189.
4. Shaver, A. Ng, J.B., Hall, D.A., Posner B.I. (1995). The chemistry of the peroxovanadium compounds relevant to insulin mimesis. *Mol. Cell. Biochem.* 153, 5–15.
5. Crans, D. C. (2005). Fifteen years of dancing with vanadium. *Pure Appl. Chem.* 77, 1497-1527.
6. Pyrzynska, K., Wierzbicki T. (2005). Pre-concentration and separation of vanadium on Amberlite IRA-904 resin functionalized with porphyrin ligands. *Anal. Chim. Acta*, 540, 91–94.
7. Venkataraman, B.V., Sudha, S. (2005). Vanadium toxicity. *Asian J. Exp. Sci.* 19, 127–134.
8. Hope, B.A. (1994). Global biogeochemical budget for vanadium. *Sci. Total Environ.* 141, 1-10.
9. Sutradhar, M., Martins, L.M.D.R., Guedes Da Silva, F., Pombeiro, A.J.L. (2015). Vanadium complexes: Recent progress in oxidation catalysis. *Coord. Chem. Rev.* doi.org/10.1016/j.ccr.2015.01.020
10. Imtiaz, M., Rizwan, M. S., Xiong, S., Li, H., Ashraf, M., Shahzad, S. M., Shahzad, M., Rizwan, M., Tu, S. (2015). Vanadium: recent advancements and research prospects: A review. *Environ. Int.* 80, 79–88.
11. WHO, Vanadium: Environmental Health Criteria, (2001). Geneva.
12. WHO Regional Office for Europe, Chapter 6.12, Vanadium, Air Quality Guidelines - (2nd ed.). (2000). Copenhagen, Denmark.
13. Hamada, T. (1998). High vanadium content in Mount Fuji ground water and its relevance to the ancient biosphere. In: Nriagu, J. (Ed.), *Vanadium in the Environment. Part 1: Chemistry and Biochemistry* (pp. 97–123). New York, NY: John Wiley & Sons.

14. McLauchlan, C.C.; Peters, B.J.; Willsky, G.R.; Crans, D.C. (2015). Vanadium-phosphatase complexes: Phosphatase inhibitors favor the trigonal bipyramidal transition state geometries. *Coord. Chem. Rev.* doi.org/10.1016/j.ccr.2014.12.012
15. Pettersson, L., Andersson, I., Gorzsás, A. (2003). Speciation in peroxovanadate systems. *Coord. Chem. Rev.* 237, 77-87.
16. Pyrzynska, K. Wierzbicki, T. (2004). Determination of vanadium species in environmental samples. Review. *Talanta* 64, 823–829.
17. Hope, B.K. (1997). An assessment of the global impact of anthropogenic vanadium. *Biogeochemistry*, 37, 1–13.
18. Cint, D., Poncia, P.P., Brusca, L., Tassi, F. Quattrocchi, F., Vaselli, O. (2015). Spatial distribution of arsenic, uranium and vanadium in the volcanic-sedimentary aquifers of the Vicano-Cimino Volcanic District (Central Italy). *J. Geochem. Explor.* 152, 123–133.
19. Pourret, O., Dia, A., Gruau, G., Davranche, M., Bouhnik-Le Coz, M. (2012), Assessment of vanadium distribution in shallow groundwaters. *Chem. Geol.* 294-295, 89–102.
20. Sracek, O., Mihaljevic, M. Kríbek, B. Majer, V. Filip, J. Vanek A. Penížek, V. Ettler, V. Mapani B. (2014). Geochemistry and mineralogy of vanadium in mine tailings at Berg Aukas, northeastern Namibia. *J. Afr. Earth Sci.* 96, 180–189.
21. Telfeyan, K., Johannesson, K.H., Mohajerin, T.J., Palmore, C.D. (2015). Vanadium geochemistry along groundwater flow paths in contrasting aquifers of the United States: Carrizo Sand (Texas) and Oasis Valley (Nevada) aquifers. *Chem. Geol.* 410, 63-78.
22. Rehder, D. (2011). Transport, accumulation, and physiological effects of vanadium detoxification of heavy metals. *Soil Biol.* 30, 205-220.
23. Giammanco, S., Ottaviani, M., Valenza, M., Veschetti, E., Principio, E., Giammanco, G., Pignato, S. (1998). Major and trace elements geochemistry in the ground waters of a volcanic area: Mount Etna (Sicily, Italy). *Water Res.* 32, 19–30.
24. McCrindle, C., Mokantla, E., Duncan, N. (2001). Peracute vanadium toxicity in cattle grazing near a vanadium mine. *J. Environ. Monit.* 3, 580–582.

25. Wann, C.C., Jiang, S.J. (1997). Determination of vanadium species in water samples by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 357, 211-218.
26. Kumar, K.S., Kang S.H., Suvardhan, K., Kiran, K. (2007). Facile and sensitive spectrophotometric determination of vanadium in various samples. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 24, 37-44.
27. Crans D.C., Robin I., Theisen L.A. (1989). Interaction of trace levels of vanadium (IV) and vanadium (V) in biological systems. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 7597- 7607.
28. Crans D.C., Amin S.S., Keramidas, A.D. (1998). *Chemistry of Relevance to Vanadium in the Environment. Vanadium in the Environment.* Chemistry and Biochemistry, Nriagu, J.O. (Ed.). Nueva York: Wiley.
29. Chen, Z.L., Owens, G. (2008). Trends in speciation analysis of vanadium in environmental samples and biological fluids—a review. *Anal. Chim. Acta*, 607, 1-14.
30. Schmukat, A., Duyster, L., Ecker, D., Schmid, H., Heil, C., Heininger, P., Ternes, T. A. (2012). Leaching of metal(loid)s from a construction material: Influence of the particle size, specific surface area and ionic strength. *J. Hazard. Mater.* 227-228, 257-264.
31. Khan, S., Kazi, T. G., Kolachi, N. F., Baig, J. A., Afridi, H. I., Shah, A. Q., Kumar, S., Shah, F. (2011). Hazardous impact and translocation of vanadium (V) species from soil to different vegetables and grasses grown in the vicinity of thermal power plant. *J. Hazard. Mater.* 190, 738-743.
32. Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME). (1999). Author. Canadian soil quality guidelines, for environmental protection and human health. Vanadium 1997. Winnipeg, Canada. www.ccme.ca/files/ceqg/en/286.pdf.
33. Crans, D.C., Smee, J.J., Gaidamauskas, E., Yang, L. (2004). The chemistry and biochemistry of vanadium and biological activities exerted by vanadium compounds. *Chem. Rev.* 104, 849-902.
34. Poledniok, J., Buhl, F. (2003). Speciation of vanadium in soil. *Talanta*, 59, 1-8.
35. Steyn, C.E., Herselman, J.E. (2005). Trace elements in developing countries using South Africa as a case of study. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 36, 155-168.

36. Panichev, N. Mandiwana, K. Moema, D. Molatlhegi, R. Ngobeni, P. (2006). Distribution of vanadium (V) species between soil and plants in the vicinity of vanadium mine. *J. Hazard. Mater.* 137, 649–653.
37. Mandiwana, K., N. Panichev, N., (2006). Speciation analysis of plants in the determination of V(V) by ETAAS. *Talanta* 70, 1153–1156.
38. Khan, S., Kazi, T. G., Kolachi, N. F., Baig, J. A., Afridi, H. I., Shah, A. Q., Kumar, S., Shah, F. (2011). Hazardous impact and translocation of vanadium (V) species from soil to different vegetables and grasses grown in the vicinity of thermal power plant. *J. Hazard. Mater.* 190, 738–743.
39. Macara, I. (1980). Vanadium -an element in search of a role. Review. *Trends Biochem. Sci.* 5, 92-94.
40. Crans, D. C., Smee, J. J., Gaidamauskas, E., Yang, L. (2004). The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chem. Rev.* 104, 849–902.
41. Jandhyala, B.S., Hom, G.J. (1983). Physiological and pharmacological properties of vanadium. *Life Sci.* 33, 1325-1340.
42. Rehder, D. (2003). Biological and medicinal aspects of vanadium. Mini-review. *Inorg. Chem. Commun.* 6, 604-617.
43. Willsky, G.R. Goldfine, A.B. Kostlyniak, P.J. McNeill, J.H. Yang, L.Q. Khan, H.R. Crans, D.C. (2001). Effect of vanadium (IV) compounds in the treatment of diabetes: in vivo and in vitro studies with vanadyl sulfate and bis(maltolato)oxovanadium (IV). *J. Inorg. Biochem.* 85, 33–42.
44. Costa Pessoa, J., Etcheverry, S., Gambino, D. (2014). Vanadium compounds in medicine, *Coord. Chem. Rev.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2014.12.002>
45. Costa Pessoa, J. (2015). Thirty years through vanadium chemistry. *J. Inorg. Biochem.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.03.004>
46. Aydin, A., Sayal, A., Sayin, S., Erdem, O. (2005). An investigation on the relationship between vanadium and antioxidative enzyme system in rats. *Turk. J. Pharm. Sci.* 2, 17-24.
47. Ueki, T., Michibata, H. (2011). Molecular mechanism of the transport and reduction pathway of vanadium in ascidians. *Coord. Chem. Rev.* 255, 2249–2257.
48. Jackson, D.E. (1912). The pharmacological action of vanadium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 3, 477-514.

49. Kabata-Pendias, A. *Trace elements in soils and plants* (4th ed.) (2010). Boca Raton, FL: CRC Press.
50. Merian, E., Anke, M., Inhat, M., Stoeppler, M. (Eds.). (2004). *Elements and their Compounds in the Environment, Occurrence, Analysis and Biological Relevance*, Vol. II, (2nd ed.). Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
51. Owusu-Yaw, J., Cohen, M.D., Fernando, S.Y., Wei, C.I. (1990). An assessment of the genotoxicity of vanadium. *Toxicol. Lett.* 50, 327-336.
52. Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C., Jacono, F. L. (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mutat. Res.* 319, 205-213.
53. Filik, H., Berker, K.I., Balkis, N., Apak, R. (2004). Simultaneous preconcentration of vanadium (V/IV) species with palmitoyl quinolin-8-ol bonded to Amberlite XAD 2 and their separate spectrophotometric determination with 4-(2-pyridylazo)-resorcinol using CDTA as masking agent. *Anal. Chim. Acta* 518, 173–179.
54. Zhao, L., Zhu, X. Feng, K. Wang, B. (2006). Speciation analysis of inorganic vanadium (V(IV)/V(V)) by graphite furnace atomic absorption spectrometry following ion-exchange separation. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 86, 931–939.
55. Villani, P., Cordelli, E., Leopardi, P., Siniscalchi, E., Veschetti, E., Fresegna, A.M., Crebelli, R. (2007). Evaluation of genotoxicity of oral exposure to tetravalent vanadium in vivo. *Toxicol. Lett.* 170, 11-18.
56. Mukherjee, B., Patra, B., Mahapatra, S., Banerjee, P., Tiwari, A., Chatterjee, M. (2004). Vanadium—an element of atypical biological significance. *Toxicol. Lett.* 150, 135–143.
57. Pessoa, J. C., Etcheverry, S., Gambino, D.A. (2014). Review: Vanadium in medicine. *Coord. Chem. Rev.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2014.12.002>
58. Van de Velde, F., Arends, I. W., Sheldon, R. A. (2000). Biocatalytic and biomimetic oxidations with vanadium. *J. Inorg. Biochem.* 80, 81–89.
59. D’Cruz, O.J., Dong, Y., Uckun, F.M. (2003). Potent dual anti-HIV and spermicidal activities of novel oxovanadium (V) complexes with thiourea non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 253–264.
60. Elementymology and elements multidict, wolframium or tungsten. Consultado en www.elements.vanderkrogt.net/element.php?sym=W, 12-06-2015.

61. Damhus, T., Hartshorn, R.M., Hutton, A.T. (2005). Nomenclature of inorganic chemistry: IUPAC Recommendations 2005. U.K. Royal Society of Chemistry.
62. Goya, P., Martín, N., Román, P. (2011). W for tungsten and wolfram. *Nat. Chem.* 3, 336. doi: 10.1038/nchem.1014.
63. Kletzin, A., Adams, M.W. (1996). Tungsten in biological systems. *FEMS Microbiol. Rev.* 18, 5-63.
64. Haynes, W.M. (Editor) (2014-2015). Handbook of Chemistry and Physics, (95th ed.). USA, CRC Press.
65. Koutsospyros, A., Braida, W., Christodoulatos, C., Dermatas, D., Strigul, N. (2006). A review of tungsten: From environmental obscurity to scrutiny. *J. Hazard. Mater.* 136, 1-19.
66. Rieth, M. et al. Recent progress in research on tungsten materials for nuclear fusion applications in Europe. Review. *J. Nucl. Mater.* 432, 482-500.
67. Ravi Kiran, U., Panchal, A., Sankaranarayana, M., Nageswara Rao, G.V.S. Nandy, T.K. (2015). Effect of alloying addition and microstructural parameters on mechanical properties of 93% tungsten heavy alloys. *Mater. Sci. Eng. A*, 640, 82-90.
68. Clemente, R., Lepp, N.W. (2010). Tungsten. In B. Alloway, (Ed.) *Environmental Pollution 2, Heavy Metals in Soils* (3rd ed.). U.K. Springer.
69. Smith, G.R. (1994). *Materials Flow of Tungsten in the United States*. United States Department of the Interior, Bureau of Mines, Information Circular, C9388. USA: (Author).
70. Tungsten, (1997). En *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, (pp. 572-588). New York: John Wiley & Sons.
71. Tungsten (1972). En Krauskopf, K.B. Wedepohl, K.H. (Eds.). *Handbook of Geochemistry*, (Vol. 2-3, Chap. 74), New York: Springer Verlag.
72. Beu, A.A. (Ed.). (1986). *Geology of Tungsten* (pp. 9-10). Paris: UNESCO.
73. Wood, S.A., Samson, I.M. (2000). The hydrothermal geochemistry of tungsten in granitoid environments. I. Relative solubilities of ferberite and schelite as a function of T, P, pH and m NaCl. *Econ. Geol.* 95, 143-182.
74. Johannesson, K.H., Dave, H.B., Mohajerin, T.J., Datta, S. (2013). Controls on tungsten concentrations in groundwater flow systems: The role of adsorption, aquifer sediment Fe(III) oxide/oxyhydroxide content, and thiotungstate formation. *Chem. Geol.* 351, 76-94.

75. Mohajerin, T.J., Helz, G.R., White, C.D., Johannesson, K. H. (2014). Tungsten speciation in sulfidic waters: Determination of thiotungstate formation constants and modeling their distribution in natural waters. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 144, 157–172.
76. Cutler, N.K. (2009). Sediment phase association of tungsten in the alluvial aquifers, Fallon, Nevada. *Geol. Soc. Am.* 41, 328.
77. Hsu, S.C., Hsieh, H.L., Chen, C.P., Tseng C.M. (2011). Tungsten and other heavy metal contamination in aquatic environments receiving wastewater from semiconductor manufacturing. *J. Hazard. Mater.* 189, 193–202.
78. Bednar, A. J., Boyd, R. E., Jones, W. T., McGrath, C. J., Johnson, D. R., Chappell, M. A., Ringelberg, D. B. (2009). Investigations of tungsten mobility in soil using column tests. *Chemosphere*, 75, 1049–1056.
79. Crompton, T.R., (2006). *Analysis of Seawater: A Guide for the Analytical and Environmental Chemist*, (Chap. 5). Berlin, Germany: Springer-Verlag.
80. Quinby-Hunt, M.S., Turehian, K.K. (1983). Distribution of elements in sea water. *Eos Trans. Agu.* 64, 130. Doi:10.1029/EO064i014p00130.
81. Gecol, H., Ergican, E., Miakatsindila, P. (2005). Biosorbent for tungsten species removal from water: Effects of co-occurring inorganic species. *J. Colloid Interf. Sci.* 292, 344–353.
82. Strigul, N. (2010). Review: Does speciation matter for tungsten ecotoxicology? *Ecotox. Environ. Safe.* 73, 1099–1113.
83. Kennedy, A.J., Johnson, D.R., Seiter, J.M., Lindsay, J.H., Boyd, R.E., Bednar, A.J., Allison, P.G. (2012). Tungsten toxicity, bioaccumulation and compartmentalization into organisms representing two trophic levels. *Environ. Sci. Tech.* 46, 9646-9652.
84. Pawa, S., Ali, S. (2004). Liver necrosis and fulminant hepatic failure in rats: protection by oxyanionic form of tungsten. *Biochim. Biophys. Acta*, 1688, 210-22.
85. Tungsten. (2015). En Nordberg, G.F., Fowler, B.A., Nordberg, M. (Eds.). *Handbook of toxicology* (Vol. 2, pp.1297-1306). Amsterdam: Academic Press.
86. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2005). *Toxicological profile for Tungsten*. Atlanta, GA.

87. Shedd, K.B. (2013). US Department of Interior, Department of Health and Human Services, Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Geological Survey Minerals Yearbook—2011, Tungsten.
88. El-Shahawi, M. S., Al Khateeb, L. A. (2012). Spectrofluorometric determination and chemical speciation of trace concentrations of tungsten species in water using the ion pairing reagent procaine hydrochloride. *Talanta*, 88, 587–592.
89. Metals/Metalloids: Environmental Pollution and Health Effects, En Nriagu, J.O., (Ed). (2011). *Encyclopedia of Environmental Health* (pp. 418-426). UK: Elsevier.
90. Akyilmaz, E., Turemis, M. (2010). An inhibition type alkaline phosphatase biosensor for amperometric determination of caffeine. *Electrochim. Acta*, 55, 5195–5199.
91. Topping, J.J. (1978). Analytical methods for the determination of tungsten. *Talanta*, 25, 61-72.
92. Mandiwana, K.L., Penichev, N. (2004). Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of vanadium(V) in soil after leaching with Na₂CO₃. *Anal. Chim. Acta*, 517, 201–206.
93. Andrade, M.G., Santana Sodr  dos Santos, D., Weiz, B., Rodrigues Vale, M.G., Paix o Teixeira, A., de Castro Lima, D., Costa Ferreira, S.L. (2007). Atomic spectrometric methods for the determination of metals and metalloids in automotive fuels. A review. *Talanta*, 73, 1-11.
94. Fodor, P., Ipolyi, I. (2005). Atomic Absorption Spectrometry: Electrothermal. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (2nd ed., pp. 170-180). USA: Elsevier.
95. Butcher, D.J. (2005). Atomic Absorption Spectrometry, Interferences and background correction. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (2nd ed., pp. 157-163). USA: Elsevier.
96. Hirayama, K., Kageyama, S., Unohara, N., (1992). Mutual separation and preconcentration of vanadium (V) and vanadium (IV) in natural waters with chelating functional group immobilized silica gels followed by determination of vanadium by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Analyst*, 117, 13–17.
97. Tsuji, K., Nakano, K., Takahashi, Y., Hayashi, K., Ro, C.U. (2012). X-ray Spectrometry. *Anal. Chem.* 84, 636–668.

98. Hargis, L.G., Howell, J.A. (1980). Ultraviolet and light absorption spectrometry. *Anal. Chem.* 52, 306R-323R.
99. Mohajerin, T.J., Helz, G.R., White, C.D., Johannesson, K. H. (2014). Tungsten speciation in sulfidic waters: Determination of thiotungstate formation constants and modeling their distribution in natural waters. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 144, 157–172.
100. Novotný, K., Staňková, A., H. Häkkänen, H., J. Korppi-Tommola, J., Otruba, V., Kanický, V. (2007). Analysis of powdered tungsten carbide hard-metal precursors and cemented compact tungsten carbides using laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochim. Acta B*, 62, 1567-1574.
101. Duckworth, D. C., Barshick, C. M. (1998). Peer Reviewed: Ion Traps: What Do They Hold for Elemental Mass Analysis? *Anal. Chem.* 70, 709A–717A.
102. Chakrabarti, A.K., Bag, S.P. (1972). Spectrophotometric determination of tungsten with disodium cis-1, 2-dicyanoethylene dithiolate. *Anal. Chim. Acta*, 59, 225–230.
103. Ahmed, M.D.J., Banerjee, A.K., (1995). Non-extractive spectrophotometric determination of vanadium in alloys and environmental, biological and soil samples using 5,7- dibromo-8-hydroxiquinoline. *Analyst*, 120, 2019–2023.
104. Clement, R.E., Yang, P.W., Koester, C.J. (1997). Environmental analysis. *Anal. Chem.* 69, 251–288.
105. Zhang, Z.Q., Liu, X.P., Zhan, H.Y. (1999). Flow injection catalytic determination of vanadium using indicator reaction between Victoria blue B and bromate and citric acid activator. *Anal. Lett.* 32, 2115-2126.
106. Pourreza, N., Mohammadi-Sedehi, I. (2002). Catalytic spectrophotometric determination of tungsten using the malachite green–Ti (III) redox reaction and a thiocyanate activator. *Talanta*, 56, 435–439.
107. Liu, J., Qiao, B., Zhang, N., He, L. (2009). Direct detection of ultra-trace vanadium (V) in natural waters by flow-injection chemiluminescence with controlled-reagent-release technology. *J. Geochem. Explorat.* 103, 45-49.
108. Chandravanshi, B.S., Yenesew, A., Kebede, Z. (1985). Simultaneous determination of iron (III) and vanadium (V) with n-phenylcinnamohydroxamic acid and thiocyanate by extraction spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta*, 172, 175-182.
109. Santelli, R. E., Bezerra, M. A., Freire, A. S., Oliveira, E. P., de Carvalho, M. de F. B. (2008). Non-volatile vanadium determination in petroleum condensate,

- diesel and gasoline prepared as detergent emulsions using GFAAS. *Fuel*, 87, 1617–1622.
110. Bermejo-Barrera, P., Beceiro-Gonzalez, E., Bermejo-Barrera, A., Bermejo-Martinez, F., (1990). Determination of vanadium in water by electrothermal atomisation atomic absorption spectrometry after extraction with 8-hydroxyquinoline in isobutyl methylketone. *Analyst*, 115, 545–547.
111. Dobrowolski, R., Adamczyk, A., Otto, M. (2013). Determination of vanadium in soils and sediments by the slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry using permanent modifiers. *Talanta*, 113, 19–25.
112. Zhao, J., Hu, Q., Li, Y., Liu, H. (2015). Efficient separation of vanadium from chromium by a novel ionic liquid-based synergistic extraction strategy. *Chem. Eng. J.* 264, 487-496.
113. Padmasubashini, V., Ganguly, M.K., Satyanarayana, K., Malhotra, R.K. (1999). Determination of tungsten in niobium–tantalum, vanadium and molybdenum bearing geological samples using derivative spectrophotometry and ICP-AES. *Talanta*, 50, 669-676.
114. Bednar, A. J., Jones, W. T., Chappell, M. A., Johnson, D. R., Ringelberg, D.B.A. (2010). A modified acid digestion procedure for extraction of tungsten from soil. *Talanta*, 80, 1257–1263.
115. Gómez-Gómez, M.M., Rodríguez-Farin, N., Cañas-Montalvo, B., Domínguez, J., Guinovart, J., Carmen Cámara-Rica, C. (2011). Biospeciation of tungsten in the serum of diabetic and healthy rats treated with the antidiabetic agent sodium tungstate. *Talanta*, 84, 1011-1018.
116. Huang, C.Y., Lee, N.M., Lin, S.Y., Liu, C.Y. (2002). Determination of vanadium, molybdenum and tungsten in complex matrix samples by chelation ion chromatography and on-line detection with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 466, 161–174.
117. Colina, M., Gardner, P., Rivas, Z., Troncome, F. (2005). Determination of vanadium species in segments, mussel and fish muscle tissue samples by liquid chromatography–inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 538, 107-115. Lipschutz, M.E., Wolf, S.F., Culp, F.B., Kent, A.J.R. (2007). Geochemical and Cosmochemical Materials. *Anal. Chem.* 79, 4249–4274.
118. Ščančar, J., Berlinger, B., Thomassen, Y., Milačič, R. 2015 Simultaneous speciation analysis of chromate, molybdate, tungstate and vanadate in welding fume alkaline extracts by HPLC–ICP-MS. *Talanta*, 142, 164-169.

119. Lins, S.M., Costa, C. Van Grieken, R. Radio-isotope neutron activation analysis for vanadium, manganese and tungsten in alloy steels. *Anal. Chim. Acta*, 196, 337-343.
120. Gervasio, A.P.G., Fortes, P.R., Meneses, S.R.P., Miranda, C.E.S., Zagatto, E.A.G. (2006). An improved flow-injection system for spectrophotometric determination of molybdenum and tungsten in tool steels. *Talanta*, 69, 927-931.
121. Chiung-Yi Huang, N.-Ming Lee, Shu-Yu Lin, Chuen-Ying Liu Chiung (2002). Determination of vanadium, molybdenum and tungsten in complex matrix samples by chelation ion chromatography and on-line detection with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 466, 161-174.
122. B A.J. Bednar, J.E. Mirecki, L.S. Inouye, L.E. Winfield, S.L. Larson, D.B. Ringelberg. (2007). The determination of tungsten, molybdenum, and phosphorus oxyanions by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, 72, 1828-1832.
123. Kiriyaama, T., Kuroda, R. (1972). A combined ion-exchange-spectrophotometric determination of vanadium in sea and natural waters. *Anal. Chim. Acta*, 62, 464-467.
124. Akama, Y., Hayakawa, M., Nakai T., Kawamura F. (1984). The determination of vanadium in steel samples by x-ray fluorescence spectrometry after precipitation with 4-caprinoyl-3-methyl-1-phenyld-pyrazolone. *Anal. Chim. Acta*, 157, 207-210.
125. Wuiloud, R.G., Wuiloud, J.C., Olsina, R.A., Martinez, L.D. (2001). Speciation and pre-concentration of vanadium(V) and vanadium(IV) in water samples by flow injection-inductively coupled plasma optical emission spectrometry and ultra-sonic nebulization. *Analyst*, 126, 715-719.
126. Li, L., Hu, B. (2007). Hollow-fiber liquid phase microextraction for separation and preconcentration of vanadium species in natural waters and their determination by electrothermal vaporization-ICP-OES. *Talanta*, 72, 472-479.
127. Hu, Q., Paudyal, H., Zhao, J., Huo, F., Inoue, K., Liu, H. (2014). Adsorptive recovery of vanadium(V) from chromium(VI) containing affluent by Zr(IV)-loaded orange juice residues. *Chem. Eng. J.* 248, 79-88.
128. Dedkova, V.P., Shvoeva, O.P., Savvin, S.B. (2009). Determination of vanadium(V) and chromium(VI) in a single sample on a fibrous ion exchanger disk. *J. Anal. Chem.* 64, 350-353.

129. Poehle, S., Schmidt, K., Koschinsky, A. (2015). Determination of Ti, Zr, Nb, V, W and Mo in seawater by a new online-preconcentration method and subsequent ICP–MS analysis. *Deep Sea Res. Pt. I*: 98, 83-9130.
130. Qureshi M.S., Mohd Yusoff, A.R., Shah, A., Nafady, A., Sirajuddin. (2015). A new sensitive electrochemical method for the determination of vanadium(IV) and vanadium(V) in Benfield sample. *Talanta*, 132, 541–547.
131. Abbasi, S., Khani, H., Sahraei, R. (2012). A Highly Sensitive Adsorptive Stripping Voltammetric Method for Simultaneous Determination of Lead and Vanadium in Foodstuffs. *Food Anal. Method.* 5, 272-278.
132. Povar, I., Cazac, T., Chiriac, L., Sandulescu, R. (2011). Catalytic-adsorptive determination of vanadium in solutions of 2,3-dihydroxybenzaldehyde and bromate-ions. *J. Electroanal. Chem.* 661, 275-27
133. Santos-Echeandia, J. (2011). Direct simultaneous determination of Co, Cu, Fe, Ni and V in pore waters by means of adsorptive cathodic stripping voltammetry with mixed ligands. *Talanta*, 85, 506-512.
134. Deng, P.H., Fei, J.J., Feng, Y.L. (2010). Determination of trace vanadium(V) by adsorptive anodic stripping voltammetry on an acetylene black paste electrode in the presence of alizarin violet. *J. Electroanal. Chem.* 648, 85-91.
135. Piech, R., Bas, B., Paczosa-Bator, B., Kubiak, W.W. (2009). Adsorptive stripping voltammetric determination of vanadium(V) with chloranilic acid using cyclic renewable mercury film silver based electrode. *J. Electroanal. Chem.* 633, 333-338.
136. Deng, P.H., Fei, J.J., Zhang, J., Li, J.N. (2009). Trace determination of vanadium(V) using anodic adsorptive voltammetry at a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes. *Microchim. Acta*, 165, 211-216.
137. Li, Y.H. Wang, Y.X, Huang, M.H. (2008). Determination of trace vanadium by adsorptive stripping voltammetry at a carbon paste electrode. *Electroanal.* 20, 1440-1444.
138. Ensafi, A.A., Khayamian, T., Khaloo, S.S. (2008). Simultaneous determination of trace amounts of vanadium and molybdenum in water and foodstuff samples using adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Int. J. Food Sci. Tech.* 43, 416-422
139. Bobrowski, A., Nowak, K., Zarebski, J. (2005). Novel voltammetric methods for vanadium determination by exploitation of catalytic adsorptive vanadium-chloranilic acid-bromate system. *Anal. Chim. Acta*, 543, 150-155.

140. Cobelo-Garcia, A., Santos-Echeandia, J., Prego, R., Nieto, O. (2005). Direct simultaneous determination of Cu, Ni and V in seawater using adsorptive cathodic stripping voltammetry with mixed ligands. *Electroanal.* 17, 906-911.
141. Sander, S. (1999). Simultaneous adsorptive stripping voltammetric determination of molybdenum (VI), uranium (VI), vanadium (V) and antimony (III). *Anal. Chim. Acta* 394, 81-89.
142. Girousi, S.T., Gherghi, I., Voulgaropoulos, A.N., Stratis, J.A. (1999). Voltammetric determination of vanadium, by using 1,10-phenanthroline as a complexing agent. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 75, 83-91.
143. Rao, K.S., Palrecha, M.M., Dhaneshwar, R.G. (1997). Determination of trace vanadium in various waters by differential pulse adsorptive stripping voltammetry. *Electroanal.* 9, 804-806
144. Ensafi, A.A. Naderi, B. (1997). Catalytic determination of ultra trace amounts of vanadium with detection by linear sweep voltammetry. *Fresen. J. Anal. Chem.* 358, 480-483.
145. Stadlober, M., Kalcher, K., Raber, G. (1997). Anodic stripping voltammetric determination of vanadium (V) using a carbon paste electrode modified in situ with cetyltrimethylammonium bromide. *Electroanal.* 9, 225-230.
146. Li, H., Smart, R.B. (1996). Catalytic stripping voltammetry of vanadium in the presence of dihydroxynaphthalene and bromate. *Anal. Chim. Acta*, 333, 131-138.
147. Sander, S., Henze, G. (1996). Adsorptive stripping voltammetric determination of vanadium as chloranilic acid complex. *Fresen. J. Anal. Chem.* 356, 259-262.
148. Vega, M., Van Den Berg, C.M.G. (1994). Determination Of Vanadium In Seawater By Catalytic Adsorptive Cathodic Stripping Voltammetry. *Anal. Chim. Acta*, 293, 19-28.
149. Zhou, J.K., Neeb, R. (1994). Study On The Sensitive And Selective Adsorption Voltammetry Of Vanadium With Antipyrylazo-III. *Fresen. J. Anal. Chem.* 349, 516-519.
150. Adeloju, S.B.O., Pablo, F. (1994). Adsorptive Cathodic Stripping Voltammetric Determination of Ultra-Trace Concentrations of Vanadium on a Glassy-Carbon Mercury Film Electrode. *Anal. Chim. Acta*, 288, 157-166
151. Esteban, M., Ariño, C., Ruisanchez, I., Larrechi, M.S., Rius, F.X. (1993). Expert System for the Voltammetric Determination of Trace Metals, Part III.

- Methods for Determining Mercury, Selenium and Vanadium. *Anal. Chim. Acta*, 284, 435-443.
152. Farias, P., Ohara, A.K., Takase, I., Ferreira, S.L.C., Gold, J.S. (1993). Adsorptive Preconcentration For Voltammetric Measurements of Trace Level of Vanadium In The Presence of Copper. *Anal. Chim. Acta*, 271, 209-215
153. Farias, P.A.M., Takase, I. (1992) Cathodic Stripping Voltammetry Of Vanadium Based On Adsorptive Accumulation Of Its Solochrome Violet Rs Complex At The Static Mercury Drop Electrode. *Electroanal. 4*, 823-828
154. Jin, W.R., Shi, S., Wang J.Y. (1990). Determination of Ultra-Trace Vanadium By 1.5th and 2.5th Order Derivative Adsorption Voltammetry. *J. Electroanal. Chem.* 291, 41-47
155. Van den Berg, C.M.G., Qiang, Z. (1984). Direct electrochemical determination of dissolved vanadium in seawater by cathodic stripping voltammetry with the hanging mercury drop electrode. *Anal. Chem.* 56, 2383-2386.
156. Sohrin, Y., Isshikib, K., Nakayama, E. (1989) Simultaneous determination of tungsten and molybdenum in sea water by catalytic current polarography after preconcentration on a resin column. *Anal. Chim. Acta*, 218, 25-35.
157. Bhowal, S. K., Bhattachary, M. (1989). Determination of traces of molybdenum and tungsten by extraction and polarography of their salicylhydroxamates. *Talanta*, 36, 989-992.
158. Jiang, Z.L., Liao, L.X., Liu, M.D. (1995) Catalytic method for the determination of traces of tungsten by linear scan voltammetry. *Anal. Chim. Acta*, 300, 107-110.
159. Hagedoorn, P. L.; van't Slot, P.; van Leeuwen, H. P.; Hagen, W. R. (2001). Electroanalytical determination of tungsten and molybdenum in proteins. *Anal. Biochem.* 297, 71-78.
160. Malakhova, N.A., Popkova, G.N., Wittmann, G., Kalnichevskaia, L.N., Brainina, K.Z. (2005). Anodic stripping voltammetry of tungsten at graphite electrodes. *Electroanalysis*, 8, 375-380.
161. Piech, R.; Bugajna, A.; Baś, S.; Kubiak, W. W. (2010). Ultrasensitive determination of tungsten (VI) on picomolar level in voltammetric catalytic adsorptive catechol-chlorate(V) system. *J. Electroanal. Chem.* 644, 74-79.
162. Ünal, Ü., Somer, G. (2012). A new and very simple procedure for the differential pulse polarographic determination of ultra trace quantities of

- tungsten using catalytic hydrogen wave and application to tobacco sample. *J. Electroanal. Chem.* 687, 64–70.
163. Dan, D., Re, J. (1992). A new catalytic polarographic system for determination of trace amounts of tungsten. *Talanta*, 39, 119-122.
164. Albareda-Sirvent, M., Merkoci, A., Alegret, S., (2000). Configuration used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 69, 153–163.
165. Andreescu, S. Marty, J.L. (2006). Twenty years research in cholinesterase biosensors: from basic research to practical applications. *Biomolec. Eng.* 23, 1–15.
166. Rodríguez-Mozaz, S., López de Alda, M.J. and Barceló, D. (2006) Review: Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring. *Anal. Bioanal. Chem.* 4, 1025-1041.
167. Stoytcheva, M., Sharkovab, V., Panayotova M. (1998). Electrochemical approach in studying the inhibition of acetylcholinesterase by arsenate (III): analytical characterization and application for arsenic determination *Anal. Chim. Acta*, 364, 195-201.
168. Mochizuki, M., Ueda, F., Sasaki, F., Hondo, R. (1999). Vanadium contamination and the relation between vanadium and other elements in wild birds. *Environ. Pollut.* 106, 249-251.
169. Castillo, J., Gaspar, S., Leth, S., Niculescu, M., Gortari, A., Bontidean, I., Soukharev, V., Dorneanu, S.A., Ryabov, A.D., Csöregi E. (2004). Biosensors for life quality: Design, development and applications. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 102, 179–194.
170. Chouteau, C., Dzyadevych, S., Chovelon, J.M., Durrieu, C. (2004), Development of novel conductometric biosensors based on immobilized whole cell *Chlorella vulgaris* microalgae. *Biosens. Bioelectron.* 19, 1089–1096
171. Campás, M., Szydłowski, D., Trojanowicz, M. and Marty, J.L. (2007). Enzyme inhibitor ion-based biosensor for the electrochemical detection of microcystins in natural blooms of cyanobacteria. *Talanta*, 72, 179–186.
172. Kröger, S., Law, R.J. (2005). Biosensors for marine applications: We all need the sea, but does the sea need biosensors? Review article. *Biosens. Bioelectron.* 20, 1903-1913.

173. Berezhetsky, A.L., Sosovska, O.F., Durrieu C., Chovelon J.M., Dzyadevych, S.V. and Tran-Minh, C. (2008). Alkaline phosphatase conductometric biosensor for heavy-metal ions determination. *ITBM-RBM* 29, 136-140.
174. Dornelles Melo, L., Kubota, L.T. (2002). Review of the use of biosensors as analytical tools in food and drink industries. *Food Chem.* 77, 237-256.
175. Henao-Escobar, W.; Domínguez-Renedo, O.; Asunción Alonso-Lomillo, M.; Julia Arcos-Martínez, M. (2013). Simultaneous determination of cadaverine and putrescine using a disposable monoamine oxidase based biosensor. *Talanta*, 117, 405–411.
176. Mazzei, F., Botre, F., Montilla S., Pilloton R., Podesta, E. and Botre, C. (2004). Alkaline phosphatase inhibition based electrochemical sensors for the detection of pesticides. *J. Electroanal. Chem.* 574, 95–100.
177. Alonso-Lomillo, M. A.; Domínguez-Renedo, O.; Hernández-Martín, A.; Arcos-Martínez, M. J. (2009). Horseradish peroxidase covalent grafting onto screen-printed carbon electrodes for levetiracetam chronoamperometric determination. *Anal. Biochem.* 395, 86–90.
178. Asturias-Arribas, L.; Asunción Alonso-Lomillo, M.; Domínguez-Renedo, O.; Julia Arcos-Martínez, M. (2013). Screen-printed biosensor based on the inhibition of the acetylcholinesterase activity for the determination of codeine. *Talanta*, 111, 8–12.
179. Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars. Pharmaceutica*, 39, 23-39.
180. Alkire, R.C, Kolb, D.M. Lipkowski, J. (Eds.) (2011). Bioelectrochemistry, Fundamentals, Applications and Recent Developments. (Vol. 13). Weinheim, Germany: Wiley.
181. Domínguez-Renedo, O., Alonso-Lomillo, M.A., Arcos-Martínez, M.J (2007). Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta*, 73, 202-219.
182. Alonso-Lomillo, M.A., Domínguez-Renedo, O., Ferreira-Goncalves, L., Arcos-Martínez, J.M. (2010). Sensitive enzyme-biosensor based on screen-printed electrodes for Ochratoxin A. *Biosens. Bioelectron.* 25, 1333–1337.
183. Sanllorente-Méndez, S., Domínguez-Renedo, O., Arcos-Martínez, M.J. (2010). Immobilization of acetylcholinesterase on screen printed electrodes. Application to the determination of Arsenic (III). *Sensors*, 10, 2119-2128.

184. O'Brien, P. J., Herschlag, D. (2002). Alkaline Phosphatase Revisited: Hydrolysis of Alkyl Phosphates. *Biochemistry*, 41, 3207–3225.
185. Frenkel-Mullerad, H., Avnir, D. (2005). Sol-Gel Material as Efficient Enzyme protectors: Preserving the Activity of phosphatases under extreme pH conditions. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 8077-8081.
186. Szydłowska, D., Campàs, M., Marty, J.L., Trojanowicz, M. (2006). Catechol monophosphate as a new substrate for screen-printed amperometric biosensors with immobilized phosphatases. *Sensor. Actuat B-Chem.* 113, 787–796.
187. Singh, J., Nordlie, R.C. and Jorgenson, R.A. (1981) Vanadate: a potent inhibitor of multifunctional glucose 6 phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, 678, 477-482.
188. Lopez, V., Stevens, T., Lindquist R.N. (1976). Vanadium Ion Inhibition of Alkaline Phosphatase Catalyzed Ester Hydrolysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 175, 31-38.
189. Campàs, M., Szydłowskab, D., Trojanowicz, M. and Marty, J.L. (2005). Towards the protein phosphatase-based biosensor for microcystin detection. *Biosens. Bioelectron.* 20, 1520–1530.
190. Akyilmaz, E., Turemis, M. (2010). An inhibition type alkaline phosphatase biosensor for amperometric determination of caffeine. *Electrochim. Acta*, 55, 5195–5199.
191. Ho, W.O., Athey D., McNeil, C.J. (1995). Amperometric detection of alkaline phosphatase activity at a horseradish peroxidase enzyme electrode based on activated carbon: potential application to electrochemical immunoassay. *Biosens. Bioelectron.* 10, 683-691.
192. Frew, J.E., Foulds, N.C., Wilshere, J.M., Forrow, N.J., Green, M.J. (1989). Measurement of alkaline phosphatase activity by electrochemical detection of phosphatase esters: Application to amperometric enzyme immunoassay. *J. Electroanal. Chem. Interfac. Electrochem.* 266, 309-316.
193. Zapp, E., Brondani, D., Vieira, I. C., Scheeren, C. W., Dupont, J., Barbosa, A. M. J., Ferreira, V.S. (2011). Biomonitoring of methomyl pesticide by laccase inhibition on sensor containing platinum nanoparticles in ionic liquid phase supported in montmorillonite. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 155, 331–339.
194. Ribeiro, F.W.P., Barroso, M.F., Morais, S., Viswanathan, S., de Lima-Neto, P., Correia, A. N., Oliveira, M.B.P.P., Delerue-Matos, C. (2014). Simple laccase-based biosensor for formetanate hydrochloride quantification in fruits. *Bioelectrochem.* 95, 7–14.

195. Shleev, S., Tkac, J., Christenson, A., Ruzgas, T., Yaropolov, A.I., Whittaker, J.W., Gorton, L. (2005). Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes. *Biosens. Bioelectron.* 20, 2517–2554.
196. Vaz-Domínguez, C., Campuzano, S., Rüdiger, O., Pita, M., Gorbacheva, M., Shleev, S., Fernandez, V.M., De Lacey, A.L. (2008). Laccase electrode for direct electrocatalytic reduction of O₂ to H₂O with high-operational stability and resistance to chloride inhibition. *Biosens. Bioelectron.* 24, 531–537.
197. Brunel, L., Denele, J., Servant, K., Kokoh, K.B., Jolival, C., Innocent, C., Cretin, M., Rolland, M., Tingry, S. (2007). Oxygen transport through laccase biocathodes for a membrane-less glucose/O₂ biofuel cell. *Electrochem. Comm.* 9, 331-336.
198. Gutiérrez-Sánchez, C., Pita, M., Vaz-Domínguez, C., Shleev, S., De Lacey, A.L. (2012). Gold nanoparticles as electronic Bridges for Laccase-Based Biocathodes. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 17212-17220.
199. Qian, Q., Su, L., Yu, P., Cheng, H., Lin, Y., Jin, X., Mao, L., (2012). Ionic-assisted preparation of laccase-based biocathodes with improved biocompatibility. *J. Phys. Chem. B*, 116, 5185-5191.
200. Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140, 19–26.
201. Madhavi, V. Lele, S.S. (2009). Laccase properties and applications. *Bioresources*, 4, 1694-1717.
202. Xu, F. (1999). Recent progress in laccase study: properties, enzymology, production and applications. En Flickinger, M.C., Drew, S.W. (Eds). *The encyclopedia of bioprocessing technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation* (pp. 1545-1554). New York, NY: John Wiley and Sons.
203. Nitta, K., Kataoka, K., Sakurai, T. (2002). Primary structure of a Japanese lacquer tree laccase as a prototype enzyme of multicopper oxidases. *J. Inorg. Biochem.* 91, 125–131.
204. Yaropolov, A.I., Skorobogatko, O.V., Vartanov, S.S., Varfolomeyev, S.D. (1994). Laccase. Properties, catalytic mechanism, and applicability. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 49, 257–280.
205. Solomon, E.I., Sundaram, U.M., Machonkin, T.E., (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96, 2563–2605.
206. Xu, F., Shin, W., Brown, S.H., Wahleithner, J.A., Sundaram, U.M., Solomon, E.I. (1996). A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin

- oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochim. Biophys. Acta*, 1292, 303–311.
207. Shleev, S., Jarosz-Wilkolazka, A., Khalunina, A., Morozova, O., Yaropolov, A., Ruzgas, T., Gorton, L. (2005). Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes. *Bioelectrochem.* 67, 115 – 124.
208. Tarasevich, M.R., Yaropolov, I., Bogdanovskaya, A., Varfolomeev, D. (1979). Electrocatalysis of a Cathodic Oxygen Reduction by Laccase. *J. Electroanal. Chem.* 104, 393-40-39
209. Xu, F., Kulys, J.J., Duke, K., Li, K., Krikstopaitis, K., Deussen, H.J., Abbate, E., Galinyte, V., Schneider, P. (2000). Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2052 – 2056.
210. Balakshin, M., Chen, C.L., Gratzl, J.S., Kirkman, A.G., Jakob, H. (2001). Biobleaching of pulp with dioxygen in laccase-mediator system effect of variables on the reaction kinetics. *J. Mol. Catal, B-Enzym.* 16, 205 – 215.
211. Paice, M., Bourbonnais, R., Renaud, S., Labonte, S., Sacciadis, G., Berry R., Amann, M., Candussio, A., Mueller, R. (2002). Pilot plant bleaching trials with laccase and mediator. *Progr. Biotechnol.* 21, 203 – 211.
212. Wong, Y. Yu, J. (1999). Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Res.* 33, 3512 – 3520.
213. Mayer, A.M. Staples, R.C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 65, 551 – 565.
214. Shumakovich, G.P. Shleev S.V., Morozova, O.V. Khohlov, P.S. Gazaryan, I.G Yaropolov, A.I. (2006). Electrochemistry and kinetics of fungal laccase mediators. *Bioelectrochem.* 69, 16–24.
215. Perumal, V., Hashim, U. (2014). Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *J. Appl. Biomed.* 12, 1–15.
216. Davis, F., Higson, S. (2012). Practical applications and protocols for enzyme biosensors. En Higson, S. (Ed.) *Biosensors for medical applications*. (pp. 135-160). Cambridge, U.K. :Woodhead Publishing Ltd.
217. Durán, N., Rosa, M.A. D'Annibale, A. Gianfreda, L. (2002). Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 907–931.

218. Mousty, C., Vieille, L., Cosnier, S. (2007). Laccase immobilization in redox active layered double hydroxides: A reagent less amperometric biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 22, 1733–1738.
219. Liu, J.X., Zhou, W.J., Gong, J.L., Tang, L., Zhang, Y., Yu, H.Y., Wang, B., Xu, X.M., Zeng, G.M. (2008). An electrochemical sensor for detection of laccase activities from *Penicillium simplicissimum* in compost based on carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Bioresour. Technol.* 99, 8748–8751.
220. Gutiérrez-Sánchez, C., Jia, W., Beyl, Y., Pita, M., Schuhmann, W., De Lacey, A.L., Stoica, L. (2012). Enhanced direct electron transfer between laccase and hierarchical carbon microfibers/carbon nanotubes composite electrodes. Comparison of three enzyme immobilization methods. *Electrochim. Acta*, 82, 218–223.
221. Sassolas, L. Blum, A., Leca-Bouvier, L. J., B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol. Adv.* 30, 489–511.
222. Kuwahara, T., Asano, T., Kondo, M., Shimomura, M. (2013). Bioelectrocatalytic O₂ reduction with a laccase-bearing poly(3-methylthiophene) film based on direct electron transfer from the polymer to laccase. *Bioelectrochem.* 91, 28–31.
223. Jędrychowska, A., Malecha, K., Cabaj, J., Sołoducho, J. (2015). Laccase biosensor based on low temperature co-fired ceramics for the permanent monitoring of water solutions. *Electrochim. Acta*, 165, 372–382.
224. Chen, H.C., Tu, Y.M., Hou, C.C., Lin, Y.C., Chen, C.H., Yang, K.H. (2015). Direct electron transfer of glucose oxidase and dual hydrogen peroxide and glucose detection based on water-dispersible carbon nanotubes derivative. *Anal. Chim. Acta*, 867, 83–91.
225. Freire, R.S., Durán, N., Kubota, L.T. (2001). Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. *Talanta*, 54, 681–686.
226. Klis, M., Maicka, E., Michota, A., Bukowska, J., Sek, S., Rogalski, J., Bilewicz, R. (2007). Electroreduction of laccase covalently bound to organothiol monolayers on gold electrodes. *Electrochim. Acta*, 52, 5591–5598.
227. Quan, D., Kim, Y., Shin, W. (2004). Characterization of an amperometric laccase electrode covalently immobilized on platinum surface. *J. Electroanal. Chem.* 561, 181–189.

228. Liu, Y., Qu, X., Guo, H., Chen, H., Liu, B., Dong, S. (2006). Facile preparation of amperometric laccase biosensor with multifunction based on the matrix of carbon nanotubes–chitosan composite. *Biosens. Bioelectron.* 21, 2195–2201.
229. Fernandes, S.C, de Oliveira, I.W.Z., Fatibello-Filho, O., Spinelli, A., Vieira, I.C. (2008). Biosensor based on laccase immobilized on microspheres of chitosan crosslinked with tripolyphosphate. *Sensor Actuat. B-Chem.* 133, 202–207.
230. Pita, M., Shleev, S., Ruzgas, T., Fernandez, V.M., Yaropolov, A.I., Gorton, L., (2006). Direct heterogeneous electron transfer reactions of fungal laccases at bare and thiol modified gold electrodes. *Electrochem. Commun.* 8, 747–753.
231. Domínguez-Renedo, O., Arcos Martínez, M.J. (2007) Anodic stripping voltammetry of antimony using gold nanoparticle-modified carbon screen-printed electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 589, 255–260.
232. Starowicz, M., Stypuła, B., Banas, J. (2006) Electrochemical synthesis of silver nanoparticles. *Electrochem. Commun.* 8, 227-230.
233. Welch, C.M., Compton. R.G. (2006). The use of nanoparticles in electroanalysis: A review. *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 601-619.
234. Domínguez Renedo, O., Alonso Lomillo, M.A., Ferreira Goncalves, L., Arcos Martínez, M.J. (2009). Development of ureasa based amperometric biosensors for the inhibitive determination of Hg(II). *Talanta*, 79, 306-310.
235. Bhakta, S.A., Evans, E., Benavidez, T.E., García, C.D. (2015). Protein adsorption onto nanomaterial for the development of biosensors and analytical devices: A review. *Anal. Chim. Acta*, 872, 7-25.
236. Renedo, O.D., Arcos Martínez, M.J. (2007). A novel method for the anodic stripping voltammetry determination of Sb(III) using silver nanoparticle-modified screen-printed electrodes. *Electrochem. Commun.* 9, 820–82.
237. Sun, L., Zhang, Z., Dang, H. (2003) A novel method for preparation of silver nanoparticles. *Material Letters*, 57, 3874-3879.
238. Fukushima, M., Yanagi, H., Haayashi, S., Suganuma, N., Taniguchi, Y. (2003) Fabrication of gold nanoparticles and their influence on optical properties of dye-doped sol-gel films. *Thin Solid Films* 39, 438.
239. Dai, X., Nekrassova, O., Hyde, M.E., Compton, R.G. (2004). Anodic Stripping Voltammetry of Arsenic (III) Using Gold Nanoparticle-Modified Electrodes. *Anal. Chem.* 76, 5924.

240. Welch, C.M., Banks, C.E., Simm, A.O., Compton, R.G. (2005). Silver nanoparticle assemblies supported on glassy-carbon electrodes for the electro-analytical detection of hydrogen peroxide. *Anal. Bional. Chem.* 382, 12-21.
241. E. Majid, S. Hrapovic, Y. Liu, K.B. Male, J.H.T. Luong, Majid, E.; Hrapovic, S.; Liu, Y.; Male, K. B.; Luong, J. H. T. (2006). Electrochemical Determination of Arsenite Using a Gold Nanoparticle Modified Glassy Carbon Electrode and Flow Analysis. *Anal. Chem.* 78, 762-769.
242. Chikae, M., Idegani, K., Kernan, K., Nagatani, N., Ishikawa, M., Takamura, Y., Tamiya, E. (2006). Direct fabrication of catalytic metal nanoparticles onto the surface of a screen-printed carbon electrode. *Electrochem. Commun.* 8, 1375-1380.
243. Shumyantseva, V. V.; Carrara, S.; Bavastrello, V.; Riley, D. J.; Bulko, T. V.; Skryabin, K. G.; Archakov, A. I.; Nicolini, C. (2005). Direct electron transfer between cytochrome P450_{scc} and gold nanoparticles on screen-printed rhodium-graphite electrodes. *Biosens. Bioelectron.* 21, 217-222.
244. Song, Y.S., Muthuraman, G., Chen, Y.Z., Lin, C.C., Zen, J.M. (2006). Screen Printed Carbon Electrode Modified with Poly(L-Lactide) Stabilized Gold Nanoparticles for Sensitive As(III) Detection. *Electroanalysis*, 18, 1763-1770.
245. Rochelet-Dequaire, M., Limoges, B., Brossier, P. (2006). Subfemtomolar electrochemical detection of target DNA by catalytic enlargement of the hybridized gold nanoparticle labels. *Analyst*, 131, 923-929.
246. Alonso-Lomillo, M.A., Yardimci, C., Dominguez-Renedo O., Arcos-Martinez, M.J. (2009). CYP450 2B4 covalently attached to carbon and gold screen printed electrodes by diazonium salt and thiols monolayers. *Anal. Chim. Acta*, 633, 51-56.
247. Hutter, E., Maysinger, D. (2013). Gold nanoparticle based biosensors for detection of enzyme activity. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 497-507.
248. Chinnadayala, S.R., Santosh, M., Singh, N.K., Goswami, P. (2015). Alcohol oxidase protein mediated in situ synthesized and stabilized gold nanoparticles for developing amperometric alcohol biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 69, 155-161.
249. Joshi, A.Y., Sharma, S.C., Harsha, S.P. (2011). Zeptogram scale mass sensing using single walled carbon nanotube based biosensors. *Sensor Actuat. B-Chem.* 168, 275-280.
250. He, D., Peng, Y., Yang, H., Ma, D., Wang, Y., Chen, K., Chen, P., Shi, J. (2013). Single-wall carbon nanotubes covalently linked with zinc (II)

- phthalocyanine bearing poly (aryl benzyl ether) dendritic substituents: Synthesis, characterization and photoinduced electron transfer. *Dyes Pigments*, 99, 395–401.
251. Henry, P. A., Raut, A. S., Ubnoske, S. M., Parker, C. B., Glass, J. T. (2014). Enhanced electron transfer kinetics through hybrid graphene-carbon nanotube films. *Electrochem. Communic.* 48, 103–106.
252. Yang, N., Chen, X., Ren, T., Zhang, P., Yang, D. (2015). Carbon nanotube based biosensors. *Sensor Actuat. B-Chem.* 207, 690-710.
253. Yu, G., Wu, W., Zhao, Q., Wei, X., Lu, Q. (2015). Efficient immobilization of acetylcholinesterase onto amino functionalized carbon nanotubes for the fabrication of high sensitive organophosphorus pesticides biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 68, 288-294.
254. Tsai, Y.C., Chiu, C.C. (2007). Amperometric biosensors based on multiwalled carbon nanotube-Nafion-tyrosinase nanobiocomposites for the determination of phenolic compounds. *Sensor Actuat. B-Chem.* 125, 10–16
255. Tsai, Y.C., Chen, S.Y., Liaw, H.W. (2007). Immobilization of lactate dehydrogenase within multiwalled carbon nanotube-chitosan nanocomposite for application to lactate biosensors. *Sensor Actuat. B-Chem.* 125, 474–481.
256. Lee, C.A., Tsai, Y.C. (2009). Preparation of multiwalled carbon nanotube-chitosan-alcohol dehydrogenase nanobiocomposite for amperometric detection of ethanol. *Sensor Actuat. B-Chem.* 138, 518–523.
257. Rafiee, B., Fakhari, A.R., Ghaffarzadeh, M. (2015). Impedimetric and stripping voltammetric determination of methamphetamine at gold nanoparticles-multiwalled carbon nanotubes modified screen printed electrode. *Sensor Actuat. B-Chem.* 218, 271-279
258. He, Z., Zang, S., Liu, Y., He, Y., Lei, H. 2015, A multi-walled carbon nanotubes-poly(L-lysine) modified enantioselective immunosensor for ofloxacin by using multi-enzyme-labeled gold nanoflower as signal enhancer. *Biosens. Bioelectron.* 73, 85-92.
259. Sainsbury, T., Stolarczyk, J., Fitzmaurice, D. (2005). An experimental and theoretical study of the self-assembly of gold nanoparticles at the surface of functionalized multiwalled carbon nanotubes. *J. Phys. Chem. B*, 109, 16310–16325.
260. Qin, X., Wang, H., Wang, X., Miao, Z., Chen, L., Zhao, W., Shan, M. Chen, Q. (2010). Amperometric biosensors based on gold nanoparticles-decorated multiwalled carbon nanotube-poly (diallyldimethylammonium chloride)

- biocomposite for the determination of choline. *Sensor Actuat. B-Chem.* 147, 593–598.
261. Felgenhauer, T., Rong, H.T., Buck, M. (2003). Electrochemical and exchange studies of self-assembled monolayers of biphenyl based thiols on gold. *J. Electroanal. Chem.* 550-551, 309–319.
262. Silva, J. F., Pavez, J., Silva, C. P., Zagal, J. H. E (2013). Electrocatalytic activity of modified gold electrodes based on self-assembled monolayers of 4-mercaptopyridine and 4-aminothiophenol on Au(111) surfaces chemically functionalized with substituted and unsubstituted iron phthalocyanines. *Electrochim. Acta*, 114, 7–13.
263. Szwajca, A., Wei, J., Schukfeh, M. I., Tornow, M. (2015). Self-assembled monolayers of alkyl-thiols on InAs: A Kelvin probe force microscopy study. *Surf. Sci.* 633, 53–59.
264. Chailapakul, O., Crooks, R. M. (1993). Synthesis and characterization of simple self-assembling, nanoporous monolayer assemblies: a new strategy for molecular recognition. *Langmuir*, 9, 884–888.
265. Gooding, J.J., Hibbert, D.B. (1999). The application of alkanethiol self-assembled monolayers to enzyme electrodes. *Trends Anal. Chem.* 18, 525–531.
266. Li, F., Wang, Z., Shan, C., Song, J., Han, D., Niu, L. (2009) Preparation of gold nanoparticles functionalized multiwalled carbon nanotube nanocomposites and its glucose biosensing application. *Biosens. Bioelectron.* 24, 1765–1770.
267. Wang, J. (2006). *Analytical Electrochemistry* (3rd. ed.). New Jersey, USA: Wiley-VCH, John Wiley and Sons. Inc.
268. Asav, E., Akyilmaz, E. (2010). Preparation and optimization of a bienzymic biosensor based on self-assembled monolayer modified gold electrode for alcohol and glucose detection. *Biosens. Bioelectron.* 25, 1014–1018.
269. Jiang, L., Han, J., Li, F., Gao, J., Li, Y., Dong, Y., Wei, Q. (2015). A sandwich-type electrochemical immunosensor based on multiple signal amplification for α -fetoprotein labeled by platinum hybrid multiwalled carbon nanotubes adhered copper oxide. *Electrochim. Acta*, 160, 7–14.
270. Liu, S., Li, X., Li, Y., Li, Y., Li, J., Jiang, L. (2005). The influence of gold nanoparticle modified electrode on the structure of mercaptopropionic acid self-assembly monolayer. *Electrochim. Acta*, 51, 427–431.

271. Giz, M. J., Duong, B., Tao, N. J. (1999). In situ STM study of self-assembled mercaptopropionic acid monolayers for electrochemical detection of dopamine. *J. Electroanal. Chem.* 465, 72–79.
272. Campuzano, S., Loaiza, O.A., Pedrero, M., de Villena, F.J.M., Pingarrón, J.M. (2004). An integrated bienzyme glucose oxidase–fructose dehydrogenase–tetrathiafulvalene-3-mercaptopropionic acid–gold electrode for the simultaneous determination of glucose and fructose. *Bioelectrochem.* 63, 199–206.
273. Zhong, C.; Porter, M.D. (1995). Designing interfaces at the molecular level. *Anal. Chem.* 67, 709A-715A.
274. Mandler, D., Kraus-Ophir, S. (2011). Self-assembled monolayers for electrochemical sensing. *J. Solid State Electrochem.* 15, 1535-1558.
275. Aurand, L.W., Woods, A.E., Wells, M.R. (1987). *Food Composition and Analysis*. New York: Van Nostrand Reinhold Company. (pp. 283-348).
276. Nelson, D.L., Cox, M.M. (2007). Leningher: Principios de Bioquímica (5ta ed.) Barcelona, España: Editorial Omega.
277. Amine, A.; Mohammadi, H.; Bourais, I.; Palleschi, G. (2006). Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosens. Bioelectron.* 21, 1405–1423.
278. Amine, A., El Harrad, L., Arduini, F., Moscone, D., Palleschi, G. (2014). Analytical aspects of enzyme reversible inhibition. *Talanta*, 118, 368–374.
279. Price, N., Hames, B., Rickwood, D. (Eds.) (1996). *Proteins LabFax*, Academic Press.
280. Smith, H.J., Simons, C. (Eds.) (2005). *Enzymes and Their Inhibition, Drug Development*, CRC Enzyme Inhibitions Series, USA: CRC Press.
281. Lundblad, R.L. (2014). *Chemical Reagents for Protein Modification*. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor and Francis.
282. Cheng Y, Prusoff WH. (1973). Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099-3108.
283. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB), Symbolism and Terminology in Enzyme Kinetics. Enzyme Reactions and Kinetics, Recommendation 1981. www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/kinetics.

284. Bachan-Upadhyay, L. S.; Verma, N. (2013). Enzyme Inhibition Based Biosensors: A Review. *Anal. Lett.* 46, 225–241.
285. Lineweaver, H.; Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56, 658–666.
286. Dixon, M. (1953). The Determination of Enzyme Inhibitor Constants. *Biochem. J.* 55, 170-171.
287. Segel, I.H. (1993). *Enzyme kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems*. USA:Wiley-Interscience.
288. Holdgate., G.A. (2001). Making cool drugs hot: isothermal titration calorimetry as a tool to study binding energetics. *Biotechniques*, 31, 164-166.
289. Leatherbarrow, R.J. (1990). Using linear and non-linear regression to fit biochemical data. *Trends Biochem. Sci.* 15, 455-458.
290. Tsujii, E., Muroi, M., Shiragami, N., Takatsuki, A. (1996). Synergetic inhibition of metal ions and genistein on α -glucosidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220, 459–466.
291. Kazi, T.G., Afridi, H.I., Kazi, N., Jamali, M.K., Arain, M.B., Jalbani, N., Kandhro, G.A. (2008). Copper, chromium, manganese, iron, nickel, and zinc levels in biological samples of diabetes mellitus patients. *Biol. Trace Elem. Res.* 122, 1-18.
292. Meyer, J.A., Spence, D.M. (2009). A perspective on the role of metals in diabetes: past findings and possible future directions. *Metallomics*, 1, 32-41.
293. Chouteau, C., Sergei Dzyadevych, S., Claude Durrieu, C., Jean-Marc Chovelon, J.M. (2005). A bi-enzymatic whole cell conductometric biosensor for heavy metal ions and pesticides detection in water samples. *Biosens. Bioelectron.* 21, 273–281.
294. Louie, A.Y., Meade, T.J. (1999). Metal complexes as enzyme inhibitors. *Chem. Rev.* 99, 2711-2734.
295. McLauchlan, C.C.; Peters, B.J.; Willsky, G.R.; Crans, D.C. (2015). Vanadium-phosphatase complexes: Phosphatase inhibitors favor trigonal bipyramidal transition state geometries. *Coord. Chem. Rev.* (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2014.12.012>)
296. Boyd, D.W., Kustin, K., Niwa, M. (1985). Do vanadate polyanions inhibit phosphotransferase enzymes? *Biochim. Biophys. Acta*, 827, 472-475.

297. Bhattacharyya, S., Tracey, A.S. (2001). Vanadium(V) complexes in enzyme systems: aqueous chemistry, inhibition and molecular modeling in inhibitor design. *J. Inorgan. Biochem.* 85, 9–13.
298. Hill, R. (2002). Molybdenum and tungsten in biology. *Trends in Biochem. Sc.* 27, 360-367.
299. Notton, B.A.; Hewitt, E.J. (1974) Molybdenum and tungsten in nitrate reductase. *J. Less Common metals*, 36, 437-448.
300. Lee, K.Y.; Erickson, R.; Pan, S.S.; Jones, G.; May F. Nason, A. (1974). Effect of tungsten and vanadium on in vitro assembly of assimilatory nitrate reductase utilizing *Neurospora* Mutant nit-1. *J. Biol. Chem.* 249, 3953-3959.
301. Schröder, K., Vecchione, C.; Jung, O.; Schreiber, J.G.; Shiri-Sverdlov, van Gorp, P.J.; Busse, R.; Brandes, R.P. (2006). Xantine oxidase inhibitor tungsten prevents the development of atherosclerosis in ApoE knockout mice fed in Western-type diet. *Free. Radic. Biol. Med.* 41, 1353-1360.
302. Hagen, W.R. (2011). Cellular uptake of molybdenum and tungsten. *Coord. Chem. Rev.* 255, 1117-1128.
303. Lorenzo, M.; Moldes, D.; Rodríguez-Couto, S.; Sanromán, M.A. (2005). Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds. *Chemosphere*, 60, 1124-1128.

***4. Vanadium Determination In Water Using Alkaline
Phosphatase Based Screen-Printed Carbon Electrodes
Modified With Gold Nanoparticle***

Como se ha mencionado en el capítulo 3, es importante analizar el vanadio en diferentes tipos de aguas con el fin de determinar si se alcanzan niveles tóxicos para la salud o el medio ambiente.

En este capítulo 4 se describe la preparación y optimización de un dispositivo desechable, sencillo, confiable y rápido para determinar la concentración de V(V) presente en muestras de agua, aprovechando la característica que tiene el vanadio de inhibir la actividad de la enzima fosfatasa alcalina. (Secciones 4.2. y 4.3) Se utilizaron como base electrodos serigrafiados SPCEs que se modificaron con nanopartículas de oro AuNPs, y la enzima fosfatasa alcalina, ALP, inmovilizada utilizando BSA y alcohol polivinílico para fijar la enzima por encapsulamiento-polimerización, además de la 5-monofosfato de riboflavina como sustrato. Este dispositivo presenta muy buena sensibilidad y bajo límite de detección y cuantificación, lo que permite cuantificar este metal a bajas concentraciones. Se trabajó con un potencial aplicado alto que daba la mejor señal para este metal y el procedimiento de inmovilización de la enzima le permite al biosensor detectar el metal en muestras de agua. No se describe en la literatura a la fecha ningún dispositivo que permita dicha determinación utilizando la enzima ALP, ni la 5-monofosfato de riboflavina como sustrato.

Este trabajo se presentó en forma de poster en el XIX Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica, SIBAE en Alcalá de Henares entre el 28 de junio y 2 de julio de 2010. Además ha sido publicado en *J. Electroanal. Chem.* 693, (2013), 51-55.

4.1 Introduction

Vanadium is a trace element that can be found in natural environments, such as waters, soils, rocks and fossil fuels, since it is the 22nd most abundant element in the earth's crust [1]. This element is frequently used in many industrial processes, including steel industry and electrical engineering [2–4]. Food is the main source of vanadium exposure for general population, with an estimated daily intake of a few tens of 1.0 g. Drinking water contributes to a lesser extent, even though it has been found relatively high concentrations of vanadium in some water supply sources [3, 4]. Although vanadium has been considered essential for different organisms [5, 6], its function is not clear; however, it is well known the adverse effects of vanadium compounds in mammals, observed *in vitro*, which can induce DNA breakdown and chromosomal aberrations among others [7–9]. On the contrary, vanadium supplements provide various insulin-like effects *in vitro* and *in vivo* systems, and have shown its potential to improve insulin resistance in diabetes [10–13]. Therefore, a narrow threshold between essential and toxic levels in living organisms has been established, which points out the need of sensitive and field portable methods of analysis of vanadium [10]. Spectrometric and chromatographic methods have been used to analyze vanadium in several matrices [14–16]. Electrochemical techniques applied to the determination of vanadium provide an interesting alternative to them. Together with the recognized advantage of the relatively low cost of electrochemical instrumentation, it should be taken into account the high sensitivity of methods such as adsorptive stripping voltammetry in combination with complexing ligands such as chloroanilic acid [17–20], catechol [21] or cupferron [22].

A very interesting alternative to conventional electrodes has been introduced in the determination of different analytes with the use of screen-printed carbon electrodes (SPCEs) [23–25]. Moreover, the fabrication of biosensors based on the modification of SPCEs by enzymes has given rise to a wide range of applications in environmental, food, pharmaceutical and biomedical analysis [26–34]. Electrochemical enzymatic biosensors have been also applied to the determination of numerous metal ions [35–39], taking into account their inhibitory effect over the

activity of enzymes. Among the different enzymes used with this aim [38], alkaline phosphatase (ALP) is a metallo-enzyme sensitive simultaneously to pesticides and metals, such as vanadium [40–43]. Though, to the best of author's knowledge, the determination of vanadium using biosensors based on the inhibitory effect of this metal over ALP have not been described up to now. Thus, chronoamperometric biosensors, based on ALP linked to SPCEs, have been developed in this work for the quantification of vanadium, using riboflavin-5-monophosphate sodium salt as substrate [44]. Immobilization and operational conditions that affect the chronoamperometric response of vanadium have been optimized.

The performance of the developed biosensors has been checked in terms of precision, limit of detection (LOD) and application to water samples.

4.2. Experimental section

4.2.1 Chemical Reagents

Several inks were used in the preparation of SPCEs, 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). Analytical grade chemicals with no further purification were used. All solutions were prepared in ultrapure water, conductivity of 0.05 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Gen-Pure TKA, Niederelbert, Germany).

Hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate (HAuCl_4) from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) was used for the synthesis of gold nanoparticles (AuNPs). Polyvinyl alcohol (PVA) obtained from Mallinckrodt Baker (New Jersey, USA) and maleic acid, bovine serum albumine (BSA) and glutaraldehyde (GA) obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) were used in the immobilization of ALP (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Riboflavin 5-monophosphate sodium salt was obtained from Fluka Analytical (Buchs, Switzerland).

Vanadium standard solutions 10 mg L^{-1} were prepared daily from a stock solution 100 mg L^{-1} , and stored at 4 ° C when not in use, by using ammonium

vanadate CertiPUR traceable to NIST (Merck, Darmstadt, Germany) SRM, certified value $1000 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$ (High-Purity Standards, CRM traceable to NIST SRM against 3165, lot 992706, USA) was used to enrich samples for a recovery study.

Tris(hydroxymethyl)aminomethane 28 mM buffer (Aldrich Chemical Co., Buchs, Switzerland) was used together with 19 mM of MgCl_2 (Merck, Darmstadt, Germany) and 0.1 M of KCl (Merck, Darmstadt, Germany) as supporting electrolyte. HCl (Merck, Darmstadt, Germany) was used to adjust the pH value.

4.2.2 Apparatus

SPCEs 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 128N electrochemical system with GPES software (Echo Chemie, Utrecht, Netherlands). pH measurements were performed using a Daigger (Vernon Hills, Illinois, USA) pHmeter 5000.

4.2.3 Manufacturing of SCPEs

A DEK 248 screen-printer (DEK, Weymouth, UK), screen polyester mesh and polyurethane squeegees were used to fabricate the electrodes. Sequential layer deposition has been performed on a polyester film (0.5 mm thickness) obtaining 44 screen-printed configurations of three electrodes each one (working, reference and counter electrode) per film, 4 mm^2 carbon working electrodes were designed (Figure 4.1) [30-33,39]. Before modifying the SPCEs an electrochemical cleaning was carried out. The working electrode surface is activated by recording 30 cycle voltammograms between -1.8 V and +1.8 V vs. screen printed Ag/AgCl reference electrode, scan rate 100 mV s^{-1} , in a 0.1 M KCl solution [33,45].

4.2.4 Modification of SCPEs with AuNPs (AuNPs–SPCEs)

AuNPs 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 (vs. screen-printed Ag/AgCl electrode) during 15 s under stirring conditions [33,46].

4.2.5 Functionalization of AuNPs–SCPEs by ALP

The enzyme was immobilized by entrapment with PVA on the surface of AuNPs–SPCEs. The optimum immobilization process was adapted from the earlier work reported by Szydłowska et al. [47]: 30 μL of a 3% of enzyme solution were carefully mixed with 10 μL of a 0.25% (w/v) BSA, 10 μL of a pH 8.5 tris buffer and 10 μL of a 5% (w/v) PVA solution to complete homogenization. Then, 10 μL of this mixture was dropped onto the surface of a screen-printed working electrode. Next, the electrode was exposed to a fluorescent light for 2 h to allow photopolymerization and enzyme entrapment [47,48]. Finally, the electrode was stored for 24 h at 4 °C before first use. Under these storage conditions the developed biosensor showed a good stability for at least three weeks. Figure 4.1 represents the type of SPCE used in this research.

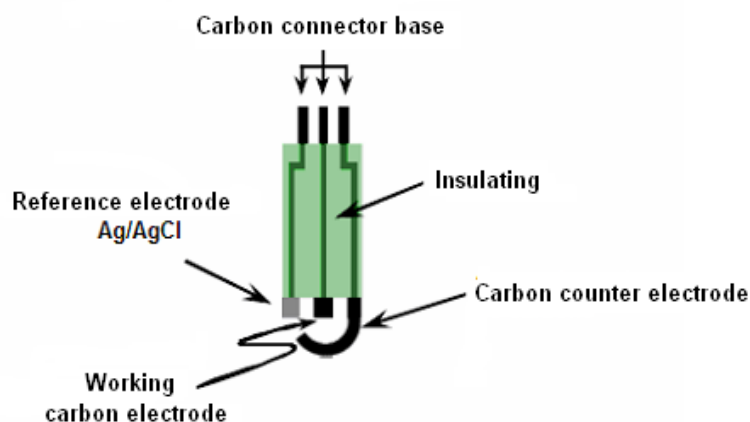


Figure 4.1. Scheme of a SPCE used for the construction of ALP based biosensors for vanadium determination.

4.2.6 Amperometric procedure for the determination of vanadium

An ALP based biosensor was placed in the electrochemical cell containing 5 mL of supporting electrolyte solution. An adequate potential was applied and, once a steady-state current was set, a defined amount of riboflavin stock solution was added to the measuring cell. A large oxidation current was observed due to the addition of this substrate. Then, once a plateau corresponding to the steady-state response was reached again, fixed portions of the vanadium stock solution were added consecutively. Enzyme electrodes were conditioned in a buffer solution for 5 min between each calibration setting.

4.3 Results and discussion

As it has been above-mentioned, riboflavin-5-monophosphate has been used as substrate for determination of the activity of ALP by using amperometric biosensors. In this way, in the presence of the immobilized ALP, riboflavin 5-monophosphate is hydrolyzed to riboflavin [44], which originates a well-defined oxidation current. Since vanadium inhibits the activity of ALP, the addition of a solution of this metal to the electrochemical cell results in a current decrease

proportional to the amount of metal added (Figure 4.2). Thus, vanadium concentration can be quantitatively related to the enzymatic inhibition current, that is to say, to the difference between the steady-state current in the absence of vanadium (I_0) and the steady-state current in the presence of vanadium (I), ($\Delta I = (I_0 - I)$).

A key step in the fabrication of these biosensors is the enzyme immobilization. Different immobilization procedures were attempted to link the enzyme to the working electrode surface. In order to obtain a biosensor with improved conductivity and performance for vanadium detection, AuNPs were deposited on the working electrode previous to the enzyme immobilization [33, 46].

First, a cross-linking immobilization procedure for ALP, using GA and BSA, was followed according to method developed by Blankert et al. [49]. Preliminary results were not satisfactory, since the biosensor showed a poor stability and a brief lifetime. Then, a new immobilization procedure based on the use of PVA and maleic acid as crosslinker was attempted [50]. Maleic acid is able to react with the hydroxyl groups of PVA, binding also the enzyme. Therefore, a 3% of enzyme solution was mixed with a solution containing 5% (w/v) PVA and different concentrations of maleic acid (0%, 20%, 40% or 60%). Then, the mixture was dropped onto the surface of a screen-printed working electrode and finally, the electrode was exposed to a fluorescent light for 2 h. In the case of electrodes in which the enzyme was also crosslinked by maleic acid, no amperometric response was obtained. This fact can be attributed to the well-known disadvantages of the cross-linking method, which can cause damage to the enzyme and limit diffusion of the substrate [51]. Hence, ALP entrapment using exclusively PVA was used as procedure for the enzyme immobilization (Section 4.2.5). The response of a measuring system in most analytical techniques depends on many experimental factors. In this case, three parameters were studied in order to maximize the current registered, $\Delta I = (I_0 - I)$, for a 1.8 μM vanadium solution: applied potential (from 1.1 V to 1.5 V, vs. Ag/AgCl), pH of supporting electrolyte between 7.0 and 9.0 and substrate concentration (from 0.1 mM to 0.5 mM). The different experiments carried out under several experimental conditions led to establish the following optimum values:

pH = 8.5 Substrate = 0.25 mM Eap = + 1.45 V

The figure 4.2 shows the chronoamperogram and the calibration plot recorded under these conditions for V(V) and under which the amperometric current was improved giving easily quantifiable signals.

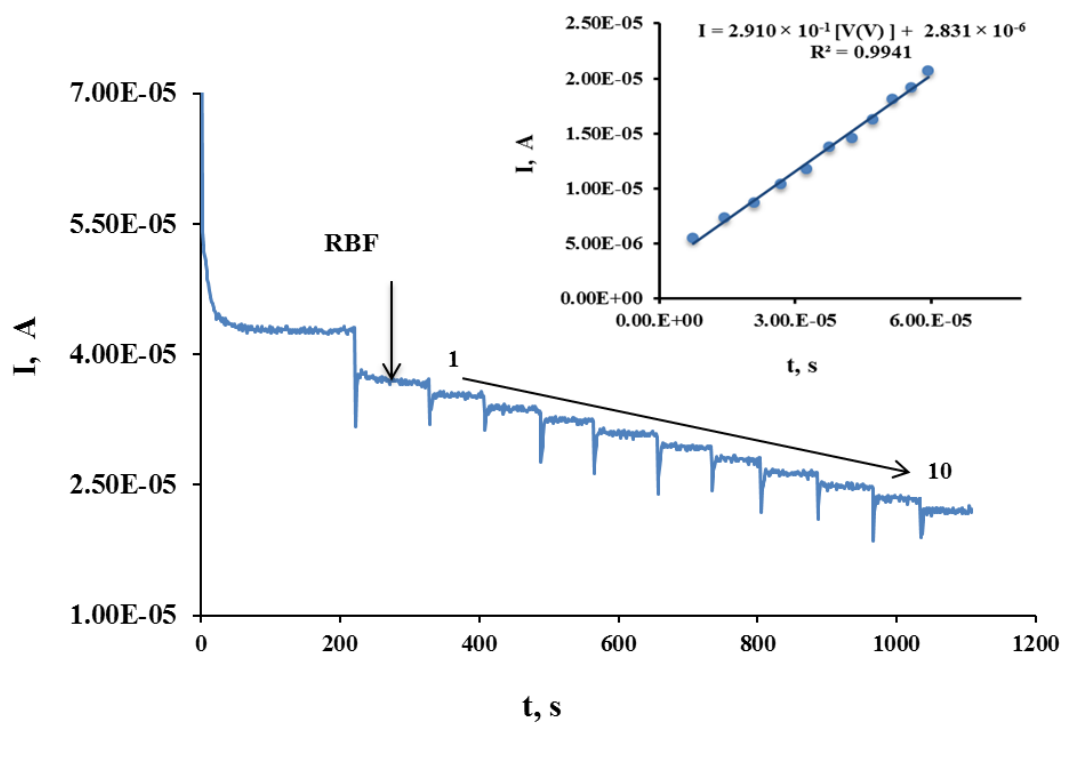


Figure 4.2. Chronoamperogram registered using an ALP based biosensor under the optimum conditions: Eap. + 1.45 V vs. Ag/AgCl; supporting electrolyte Tris-HCl buffer pH 8.5 and [RFP] = 0.25 mM, in the V(V) concentration range from 1.8 μ M to 15.0 μ M. Inset figure: calibration curve for V(V) under the optimum conditions above.

4.3.1 Characterization of the developed biosensor for vanadium determination

In order to guarantee that the inhibition response registered after the addition of the substrate was related to vanadium concentration, control experiments were carried out. Amperograms were recorded under the optimum conditions using SPCEs, AuNPs / SPCEs and AuNPs / SPCEs modified as has been reported in Section 4.2.5 but without enzyme. According to the amperometric procedure

described for vanadium determination in Section 4.2.6 volumes of 100 μL of a 1.96×10^{-4} M of a V(V) solution were added. No analytical signal was obtained, thus, it can be concluded that vanadium can be determined by its inhibitory effect on the response of ALP to riboflavin-5-monophosphate. In addition, the inhibitory effect of vanadium in the ALP / RFP reaction was studied by the kinetic parameters (V_{max} and K_m) of the Lineweaver–Burk plot (Figure 4.3). It was observed a V_{max} decrease and a K_m increase, which suggest a mixed inhibition [52]. Thus, it could be said that the enzyme has higher affinity for its substrate in the absence of vanadium, which confirms the inhibitory effect of this metal and as a consequence, the possibility of vanadium quantification using these electrochemical biosensors.

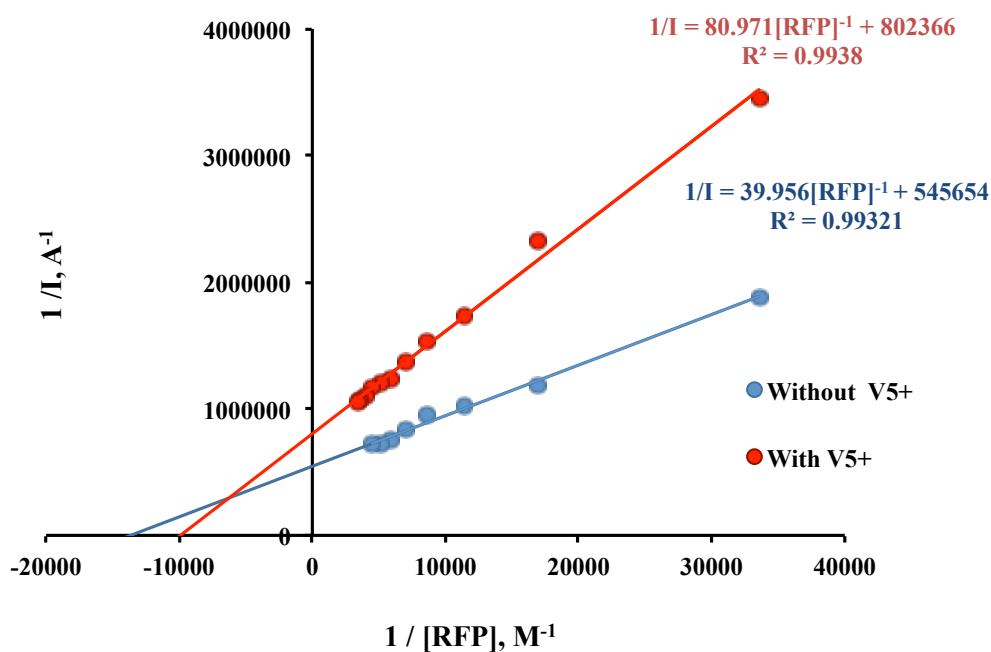


Figure 4.3. Inhibitory effect of vanadium in the ALP/5-RFP reaction: Lineweaver–Burk plot in absence (●) and presence of (●) V(V), $E_{ap} + 1.45$ V, supporting electrolyte Tris-HCl buffer pH 8.5.

4.3.2. Limit of detection

Once experimental conditions were established for the analysis of V(V) using riboflavin-5-monophosphate RFP as substrate, a series of calibration curves were performed using ordinary least squares regressions to determine the dynamic range of the biosensor (from 1.8 μM to 15.0 μM). LOD was calculated by the method based on standard deviation (S_y/x) of the responses for the blank injection in triplicate and the slope of the calibration curve. This figure of merit, calculated under the optimum conditions, was $3.9 \pm 0.4 \mu\text{M}$.

4.3.3. Precision

Precision was studied to find out intra-biosensor (repeatability) and inter-biosensors (reproducibility) variations (Table 4.1).

Repeatability was determined as the relative standard deviation (RSD) of the slopes of four calibration curves using the same electrode under the optimum conditions of the experimental variables. A value of 7.6% ($n = 3$) was yielded (Table 4.2). Likewise, reproducibility was evaluated as the RSD of the slope of different calibration curves using different biosensors, with a value 5.9 % ($n = 3$), Table 4.3. Both values are acceptable for this type of devices.

Table 4.1. Repeatability of the ALP/AuNPs/SPCE evaluated by means of calibration curves slopes with the same electrode, under optimum conditions as in figure 4.2.

Calibration	Slope A / M	Intercept A	Error Sy/x	R²
I	0.04237	9.8×10^{-7}	3.8×10^{-8}	0.980
II	0.04676	3.8×10^{-7}	3.8×10^{-8}	0.986
III	0.04039	1.4×10^{-7}	3.3×10^{-8}	0.990
Media	0.04317			
Std. Desv.	0.0033			
RSD %	7.6			

Table 4.2. Reproducibility of the ALP/AuNPs/SPCE evaluated by means of calibration curves slopes with different electrodes, under optimum conditions as in figure 4.2.

Calibration	Slope A / M	Intercept A	Error Sy/x	R²
I	0.06412	1.7×10^{-7}	1.0×10^{-7}	0.990
II	0.06991	-4.2×10^{-7}	1.5×10^{-7}	0.991
III	0.07186	-8.1×10^{-7}	8.1×10^{-8}	0.995
Media	0.06863			
Std. Dev.	0.0040			
RSD %	5.9			

4.3.4 Accuracy and trueness determination

Accuracy and trueness were calculated in order to check the performance of the developed biosensor. The accuracy of the proposed method was evaluated by means of the analysis of V(V) CRM (High Purity Standards Vanadium Standard solution with a Certificate of Analysis of $1000 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$). The vanadium mean concentration quantified by the developed procedure, $995 \pm 52 \text{ mg L}^{-1}$ ($n = 5$; $\alpha = 0.05$), matches the certified value of the sample considering the associated

uncertainty, also applying a student's t test there is not a significance difference between the certified value and the media of the concentration found.

Trueness was evaluated by recovery studies. The method showed a satisfactory value for this parameter since the added vanadium concentration values (20.6 mM) were in good agreement with the found concentration value 20.5 ± 1.1 mM ($n = 4$, $\alpha = 0.05$). The average recovery for this analysis was 99.5 % with a RSD of 5.2%. Therefore, the proposed method is both accurate and suitable for the analysis of vanadium.

Table 4.3. Accuracy study to spiked water samples, at optimized conditions with vanadium standard solution (High Purity Standards, V(V) with a Certificate of Analysis, 1000 ± 5 mg L⁻¹), under optimum conditions as in figure 4.2.

[V]Added M	[V] Found M	[V] Found mg/L in cell	mg/L 600uL	Standard	SRM
				100 mg/L D.F. 100/10	1000 mg/L D.F. 100/10
	2.05×10^{-5}	1.043	9.948	99.48	994.8
	2.02×10^{-5}	1.027	9.798	97.98	979.8
2.06×10^{-5}	1.98×10^{-5}	1.010	9.633	96.33	963.3
	1.96×10^{-5}	0.999	9.534	95.34	953.4
	2.23×10^{-5}	1.135	10.84	108.28	1082.8
Media	2.05×10^{-5}			99.5	995
Std. Dev.	1.1×10^{-6}			5.2	52
RSD %	5.2 %			5.2%	5.2

4.3.5 Study of possible interferences in the vanadium determination

The presence of metals, such as Mo (VI), Al (III), Fe (III), Cr (VI), Sn (II), and W (VI), may interfere on the vanadium amperometric response. Their effect was then analyzed by measuring the current after consecutive additions of 3.5 μM solutions of each metal. It can be seen in Figure 4.4 that only Mo (VI) presents a significant signal, so this metal must be taken into account in the analysis of vanadium.

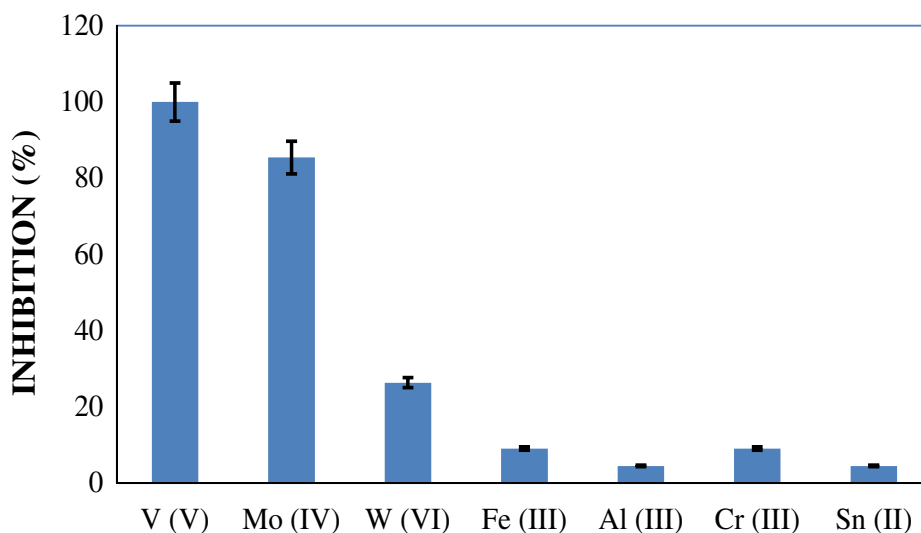


Figure 4.4. Inhibition current of ALP based AuNPs/SPCE in presence of 3.5 μM of different metals.

4.3.6 Analysis of vanadium in tap water samples

Finally, the developed procedure was applied to the determination of vanadium in spiked tap water samples (3.70 μM), by standard addition methodology in seven replicates. The vanadium concentration found was $[3.66 \pm 0.21] \mu\text{M}$ ($n = 7$, $a = 0.05$, $\text{RSD} = 5.7 \%$), with an average recovery of 98.9 %.

Table 4.4. Recovery study for spiked water samples, at optimized conditions, as figure 4.2, enriched with SRM V(V) certified value $1000 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$.

[V] Added M	[V]Found M	Recovery %	Slope A / M	intercept A	Error Sy/x	R ²
	3.84×10^{-6}	103.8	3.32×10^{-2}	2.41×10^{-7}	3.03×10^{-8}	0.984
	3.53×10^{-6}	95.3	2.85×10^{-2}	1.97×10^{-7}	3.79×10^{-9}	1.000
3.70×10^{-6}	4.00×10^{-6}	108,0	3.60×10^{-2}	2.67×10^{-7}	3.36×10^{-8}	0.988
	3.39×10^{-6}	91.7	4.74×10^{-2}	3.23×10^{-7}	3.05×10^{-8}	0.992
	3.60×10^{-6}	97.4	5.70×10^{-2}	4.00×10^{-7}	2.45×10^{-8}	0.997
	3.53×10^{-6}	95.4	7.21×10^{-2}	5.01×10^{-7}	7.48×10^{-8}	0.986
	3.72×10^{-6}	100.5	3.05×10^{-2}	3.90×10^{-7}	1.10×10^{-8}	0.998
Media	3.66×10^{-6}	98.9				
Std. Dev.	2.07×10^{-7}	5.6				
RSD %	5.7	5.7				

4.4 Conclusions

The method developed in this work presents for the first time the use of this enzyme and riboflavin-5-monophosphate sodium salt for the analysis of this metal. The use of ALP based biosensors using AuNPs/SPCEs allows the selective chronoamperometric determination of vanadium.

The effect of vanadium in the ALP/5-RFP reaction results a mixed inhibition, which allows the quantification of vanadium in tap water.

The developed procedure has showed a limit of detection of $3.9 \pm 0.4 \mu\text{M}$, as well as reproducibility and repeatability values of RSD for the slopes of several calibrations lower than 12%.

The evaluation accuracy, applied to spiked water samples with SRM, for V(V) certified value $1000 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$) showed a vanadium mean concentration of 995

$\pm 52 \text{ mg L}^{-1}$ ($n = 5$; $\alpha = 0.05$), value considered between the confidence limit, and determined by student's t test.

A recovery study of spiked samples with vanadium concentration $3.70 \text{ }\mu\text{M}$, gave a concentration media of $3.66 \pm 0.21 \text{ }\mu\text{M}$ ($n = 7$, $\alpha = 0.05$, $\text{RSD} = 5.7\%$), with an average recovery of 98.9% .

4.5 References

1. Mukherjee, B., Patra, B., Mahapatra, S., Banerjee, P., Tiwari, A., Chatterjee, M. (2004). Vanadium—an element of atypical biological significance. *Toxicol. Lett.* *150*, 135–143.
2. Mochizuki, M., Ueda, F., Sasaki, S., Hondo, R. (1999). Vanadium contamination and the relation between vanadium and other elements in wild birds. *Environ. Pollut.* *106*, 249–251.
3. Villani, P., Cordelli, E., Leopardi, P., Siniscalchi, E., Veschetti, E., Fresegna, A.M., Crebelli, R. (2007). Evaluation of genotoxicity of oral exposure to tetravalent vanadium in vivo. *Toxicol. Lett.* *170*, 11–18.
4. World Health Organization, International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 81. *Vanadium*. (1988). WHO. Geneva, Switzerland.
5. Almeida, M., Filipe, S., Humanes, M., Maia, M.F., Melo, R., Severino, N., da Silva, J.A.L., Frausto da Silva, J.J.R., Wever, R. (2001). Vanadium haloperoxidases from brown algae of the Laminariaceae family. *Phytochemistry*, *57*, 633–642.
6. Sakurai, H., Katoh, A., Yoshikawa, Y. (2006). Chemistry and Biochemistry of Insulin-Mimetic Vanadium and Zinc Complexes. Trial for Treatment of Diabetes Mellitus. *B. Chem. Soc. Jpn.* *79*, 1645–1664.
7. Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, F., Lo Jacono, C. F. (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mutat. Res. Genet. Tox.* *319*, 205–213.
8. Owusu-Yaw, J., Cohen, M.D., Fernando, S.Y., Wei, C.I. (1990). An

- Assessment of the Genotoxicity of Vanadium. *Toxicol. Lett.* 50, 327–336.
9. Rodríguez-Mercado, J.J., Roldán-Reyes, E., Altamirano-Lozano, M. (2003). Genotoxic effects of vanadium (IV) pentoxide evaluated by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes. *Toxicol. Lett.* 144, 359–369.
 10. Dansby-Sparks, R., Chambers, J.Q., Xue, Z.-L. (2009). Trace vanadium analysis by catalytic adsorptive stripping voltammetry using mercury-coated micro-wire and polystyrene-coated bismuth film electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 643, 19–25.
 11. Parra-Díaz, D., Wei, Q., Lee, E.Y.C., Echegoyen, L., Puett, D. (1995). Binding of vanadium (IV) to the phosphatase calcineurin. *FEBS Lett.* 376, 58–60.
 12. Willsky, G.R., Chi, L.H., Godzala, M., Kostyniak, P.J., Smee, J.J., Trujillo, A.M., Alfano, J.A., Ding, W., Hu, Z., Crans, D.C. (2011). Anti-diabetic effects of a series of vanadium dipicolinate complexes in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Coord. Chem. Rev.* 255, 2258–2269.
 13. Willsky, G.R., Goldfine, A.B., Kostyniak, P.J., McNeill, J.H., Yang, L.Q., Khan, H.R., Crans, D.C. (2001). Effect of vanadium (IV) compounds in the treatment of diabetes: in vivo and in vitro studies with vanadyl sulfate and bis(maltolato)oxovanadium(IV). *J. Inorg. Biochem.* 85, 33–42.
 14. Amorim, F.A.C., Welz, B., Costa, A.C.S., Lepri, F.G., Vale, M.G., Ferreira, S.L.C. (2007). Determination of vanadium in petroleum and petroleum products using atomic spectrometric techniques. *Talanta*, 72, 349–359.
 15. Chen, Z.L., Owens, G. (2008). Trends in speciation analysis of vanadium in environmental samples and biological fluids. *Anal. Chim. Acta*, 607, 1–14.
 16. Sugiyama, M., Tamada, T., Hori, T. (2001). Liquid chromatography catalytic analysis detection for highly sensitive and automated fractional determination of vanadium (IV) and (V). *Anal. Chim. Acta*, 431, 141–148.
 17. Bobrowski, K., Nowak, J. Zarebski. (2005). Novel voltammetric methods for vanadium determination by exploitation of catalytic adsorptive vanadium–chloranilic acid–bromate system. *Anal. Chim. Acta*, 543, 150–155.
 18. Wang, J., Lu, D.L., Thongngamdee, S., Lin, Y.H. Sadik, O.A. (2006). Catalytic Adsorptive Stripping Voltammetric Measurements of Trace Vanadium at Bismuth Film Electrodes. *Talanta*, 69, 914–917.

19. Piech, B., Bas, B., Paczosa-Bator, B., Kubiak, W. (2009). Adsorptive stripping voltammetric determination of vanadium (V) with chloranilic acid using cyclic renewable mercury film silver based electrode. *J. Electroanal. Chem.* 633, 333–338.
20. Sander, S., Henze, G. (1996). Adsorptive stripping voltammetric determination of vanadium as chloranilic acid complex. *Fresen. J. Anal. Chem.* 356, 259–262.
21. Vega, M. Van Den Berg, C.M.G. (1994) Determination of vanadium in sea water by catalytic adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Anal. Chim. Acta*, 293, 19–28.
22. Wang, J. Tian, B. Lu, J.M. (1992). Adsorptive-catalytic stripping measurements of ultratrace vanadium in the presence of cupferron and bromate. *Talanta*, 39, 1273–1276.
23. Alonso-Lomillo, M.A. Domínguez-Renedo, O. Arcos-Martínez, M.J. (2009). Enzyme modified screen printed electrodes, in: R. Comeaux, P. Novotny (Eds.), *Biosensors: Properties, Materials and Applications*. Hauppauge, NY. Nova Publishers, pp. 1–52.
24. Cooper, J.M., Cass, A.E.G. (2004). (2nd ed.). *Biosensors: A Practical Approach*. Vol. XVI, Oxford, U.K.: Oxford University Press.
25. Domínguez-Renedo, O., Arcos-Martínez, M.J. (2006). Electrochemical Biosensors, in *Encyclopedia of Sensors*. USA. American Scientific Publishers.
26. Alonso-Lomillo, M.A. Domínguez-Renedo, O. Arcos-Martínez, M.J. (2010). Biosensors in microbiology: A review. *Talanta* 82, 1629–1636.
27. Alonso Lomillo, M.A., Domínguez Renedo, O., Arcos Martínez, M.J. (2010). Electrochemical sensors in the development of selective methods for antiepileptic drugs determination. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 13, 650–657.
28. Alonso-Lomillo, M. A.; Domínguez-Renedo, O.; Román, L. del T.; Arcos-Martínez, M. J. (2011). Horseradish peroxidase-screen printed biosensors for determination of Ochratoxin A. *Anal. Chim. Acta*, 688, 49–53.
29. Alonso-Lomillo, M. A.; Domínguez-Renedo, O.; Ferreira-Gonçalves, L.; Arcos-Martínez, M. J. (2010). Sensitive enzyme-biosensor based on screen-printed electrodes for Ochratoxin A. *Biosens. Bioelectron.* 25, 1333–1337.

30. Alonso-Lomillo, M. A.; Domínguez-Renedo, O.; Hernández-Martín, A.; Arcos-Martínez, M. J. (2009). Horseradish peroxidase covalent grafting onto screen-printed carbon electrodes for levetiracetam chronoamperometric determination. *Anal. Biochem.* 395, 86–90.
31. Alonso-Lomillo, M. A., Domínguez-Renedo, O., Matos, P., Arcos-Martínez, M. J. (2009). Electrochemical determination of levetiracetam by screen-printed based biosensors. *Bioelectrochemistry*, 74, 306–309.
32. Alonso-Lomillo, M. A., Domínguez-Renedo, O., Matos, P., Arcos-Martínez, M. J. (2010). Disposable biosensors for determination of biogenic amines. *Anal. Chim. Acta*, 665, 26–31.
33. Alonso-Lomillo, M. A., Yardimci, C., Domínguez-Renedo, O., Arcos-Martínez, M. J. (2009). CYP450 2B4 covalently attached to carbon and gold screen printed electrodes by diazonium salt and thiols monolayers. *Anal. Chim. Acta*, 633, 51–56.
34. Domínguez-Renedo, O., Alonso-Lomillo, M.A., Arcos-Martínez M.J. (2007) Recent developments in the field of screen printed electrodes and their related applications. *Talanta*, 73, 202–219.
35. Gooding, J.J., Chow, E., Finlayson R. (2003). Biosensors for detecting metal ions; new trends. *Aust. J. Chem.* 56, 159–162.
36. Palchetti, I., Marrazza, G. Mascini, M. (2001). New procedures to obtain electrochemical sensors for heavy metal detection. *Anal. Lett.* 34, 813–824.
37. Verma, N. Singh, M. (2005). Biosensors for heavy metals. *Biometals*, 18, 121–129.
38. Domínguez-Renedo, O. Alonso-Lomillo, M.A. Arcos-Martínez, M.J. (2013). Determination of metals based on electrochemical biosensors. *Critical Rev. Environ. Science Tech.* 43, 1042-1073.
39. Domínguez-Renedo, O., Alonso-Lomillo, M.A., Ferreira-Gonçalves, L., Arcos-Martínez, M.J (2009). Development of urease based amperometric biosensors for the inhibitive determination of Hg(II). *Talanta*, 79, 1306–1310.
40. Danzer, T. Schwedt, G. Multivariate evaluation of inhibition studies on an enzyme electrodes system with pesticides and mixtures of mercury and pesticides. *Anal. Chim. Acta*, 325, 1–10.
41. Danzer, T. Schwedt, G. (1996). Chemometric methods of the development of

- a biosensor system and the evaluation of inhibition studies with solutions and mixture of pesticides and heavy metals, Part 1. Development of an enzyme electrodes system for pesticides and heavy metal screening using selected chemometric methods. *Anal. Chim. Acta*, 318, 275–286.
42. García Sánchez, F. Navas Díaz, A. Ramos Peinado, M.C. Belledone, C. (2003). Free and sol-gel immobilized alkaline phosphatase-based biosensor for the determination of pesticides and inorganic compounds. *Anal. Chim. Acta*, 484, 45–51.
43. Koncki, R. Rudnicka, K.. Tymecki, L. (2006). Flow injection system for potentiometric determination of alkaline phosphatase inhibitors. *Anal. Chim. Acta* 577, 134–139.
44. Harbron, S. Eggelte, H.J. Benson, S.M. Rabin, B. R. (1991). Amplified luminometric assays of alkaline phosphatase using riboflavin phosphates. *J. Biolumin. Chemilumin.* 6, 251–258.
45. Pchelintsev, N.A. Millner, P.A. (2007). Development of surface activated screen printed carbon transducers for biosensors application. *Anal. Lett.* 40, 1317–1332.
46. Domínguez Renedo, O.; Arcos Martínez, M. J. (2007). Anodic stripping voltammetry of antimony using gold nanoparticle-modified carbon screen-printed electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 589, 255–260.
47. Szydłowska, D.; Campàs, M.; Marty, J.-L.; Trojanowicz, M. (2006). Catechol monophosphate as a new substrate for screen-printed amperometric biosensors with immobilized phosphatases. *Sensor Actuat. B: Chem.* 113, 787–796.
48. Andreescu, S., Barthelmebs, L., Marty, J.L. (2002). 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, 171–180.
49. Blankert, B., Domínguez, O., El Ayyas, W., Arcos, J., Kauffmann, J.M. (2004) Horseradish peroxidase electrode for the analysis of clozapine. *Anal. Lett.* 37, 903–913.
50. Gohil, J., Bhattacharya, A., Ray, P. J. (2006) Studies on the crosslinking of Poly(Vinyl Alcohol). *Polym. Res.* 13, 161–169
51. Serra, P.A. (Ed). (2010). Design and Construction of a Distributed Sensor

NET for Biotelemetric Monitoring of Brain Energetic Metabolism using
Microsensors and Biosensors, in *Biosensors*. Vokovar, Croatia: Intech

52. Turdean, G.L. (2011). Design and Development of Biosensors for the
Detection of Heavy Metal Toxicity. *Int. J. Electrochem*
.doi.org/10.4061/2011/343125.

***5. A Disposal Alkaline Phosphatase Based-Biosensor
For Vanadium Chronoamperometric Determination
Using p-Nitrophenylphosphate As A Substrate.***

Como se ha mencionado en secciones anteriores, la determinación de vanadio en aguas tiene gran importancia en el control de contaminación de fuentes de agua debido al posible efecto perjudicial que pueden causar en la salud de las personas.

En este apartado se describe la preparación y optimización de otro dispositivo desechable sencillo, confiable y más sensible para determinar la concentración de V(V) presente en muestras de agua (Secciones 5.2. y 5.3) Con base en los SPCEs modificados con AuNPs, y la enzima ALP, se utilizó el *p*-NPP como sustrato, y se logró bajar el potencial de trabajo, lo que favorece la inhibición y reduce las interferencias de cationes metálicos. Tiene mejor sensibilidad, y un límite de detección, diez veces menor al descrito en la sección 4, lo que permite cuantificar este metal a más bajas concentraciones. Se aplicó a muestras de agua de grifo a la fecha tampoco se describe en la literatura ningún dispositivo que permita dicha determinación utilizando la enzima ALP.

Este trabajo ha sido presentado como potencia oral en el XXI Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica, SIBAE en La Serena, Chile entre el 7 y el 11 de abril de 2014 y ha sido publicado en *Sensors (2014) 14, 3756-3767*.

5.1 Introduction

Being considered as one of the important transition elements in biological systems, vanadium is an ultra-trace metal that can be found in some marine organisms, in the prosthetic group of bromoperoxidases in certain marine algae [1–3], as part of the nitrogenase system of some bacteria and plants [4,5], as well as in plasma and inside cells of mammals [6]. It participates in the synthesis of chlorophyll in photosynthetic organisms and is a micronutrient of marine and terrestrial species [7].

In the past, vanadium compounds were used as a therapeutic agent for diabetes, anemia, chlorosis, and even for tuberculosis. It is also a tonic, antiseptic and a spirocheticide. Nevertheless vanadium, especially as vanadium pentoxide, has a broad spectrum of known toxic effects on the respiranervous systems, digestive organs, kidneys and skin in humans. However confirmative mutagenicity and carcinogenicity studies are not consistent, though they should be given priority in long exposure studies [8,9].

In recent years, vanadium has been used in the development of novel materials in biochemistry and industrial processes [10–12]. Its metallic form is used as a carbide stabilizer in making steels. Vanadium pentoxide is used in ceramics, as a catalyst, in superconductive magnets production, and vanadyl sulfate and sodium metavanadate have been used in dietary supplements [8].

Industries using fossil fuels like petroleum, coal and oil, cause most of the discharges of vanadium into the environment. Mining areas are other sources of this contamination, while distillation and purification of crude oils contribute less vanadium into the atmosphere [13].

Vanadate in aqueous solution influences numerous enzyme-catalyzed reactions. Its effects on living systems and the different responses to the influence of vanadium are well documented [14]. As it can assume many stable anionic forms in aqueous solution, depending on acidity and concentration [15], it has been described as an inhibitor of different enzymes. Lindquist in 1973 [16] described the inhibition of ribonuclease by vanadate in the presence of uridine, explaining in some way the origin of the biological influences of vanadium compounds. A year later, in 1974, Van Etten and coworkers [17], demonstrated the influence of vanadate, molybdate and tungstate on phosphohydrolases such as acid phosphatases which are relatively nonspecific enzymes that catalyze the hydrolysis of several alkyl and aryl phosphate esters at a pH between 4 and 6. Lopez *et al.* showed that alkaline phosphatase, which is a metalloproteinase, catalyzes the hydrolysis of a number of phosphate esters, and there are a few competitive inhibitors of alkaline phosphatase aside from inorganic phosphate and arsenate, such as oxovanadium (IV), VO^{2+} . It is also possible that vanadium (V) might adopt a trigonal bipyramidal structure since crystalline hydrated metavanadates ($\text{VO}_3^- \cdot \text{H}_2\text{O}$) are five-coordinate with oxygen atoms, and the geometry is approximately trigonal bipyramidal like phosphate, which is one of the reasons why vanadate is a known inhibitor (and sometimes stimulator) of many phosphate-metabolizing enzymes [18]. This includes the inhibition of a regulatory protein phosphatase, which is likely to lead to activation of a protein kinase, the activity of which is key to the insulin-mimetic action of vanadate [17, 18]. It also can inhibit hexokinase, adenylate kinase and phosphofructokinase [15]. Vanadate-dependent haloperoxidases have been shown to attain phosphatase activity, and this finding may have some impact on medical applications. Another important impetus to vanadium coordination chemistry has arisen from the observation that vanadate, peroxovanadate, vanadyl and several vanadium complexes exert an insulin-mimetic effect [6].

Electrochemical biosensors based on the principle of enzyme inhibition have been applied for a wide range of toxic analytes such as pesticides, derivatives of insecticides, heavy metals and glycoalkaloids [19]. Because of their excellent performance capabilities, such as rapid response, high specificity and sensitivity,

relatively compact size, low cost and easy operation, these biosensors can be a good alternative for the detection of vanadium [20].

Alkaline phosphatases (ALPs), which catalyze the hydrolysis of phosphate esters, are widely distributed in mammalian tissues, and are present in high concentrations in bones, intestines, kidneys, placenta, and liver [21]. ALP is probably the most commonly used conjugated enzyme for immunoassays due to its high turnover number, broad substrate specificity and possibility of application. The determination of its activity has been carried out using various spectrophotometric and electrochemical methods [21–25].

Reversible inhibition of ALP by vanadium has been previously reported [18, 20, 25], although this interaction has been scarcely used for vanadium determination [20]. The presence of vanadium produces a decrease of the chronoamperometric reduction signal registered that can be related to the concentration of this species. Thus, the aim of this work has been the development of a screen-printed based chronoamperometric biosensor, easily usable in any analytical laboratory, for the detection of vanadium. ALP has been cross-linked to the working electrode of screen-printed carbon electrodes (SPCEs) previously modified by gold nanoparticles (ALP/AuNPs/SPCEs).

In order to obtain a biosensor with improved conductivity and performance for vanadium detection, AuNPs were deposited onto the working electrode previous to the enzyme immobilization [32]. The use of AuNPs have been reported to enhance the chronoamperometric current response, yielding a sensor with an excellent electrocatalytic response, fast response time, long term stability and reproducibility [32–38]. The ALP-based biosensor has been characterized for the detection of vanadium in water samples. Figures of merit, such as precision, accuracy and limit of detection, have been evaluated.

5.2 Experimental Section

5.2.1 Chemical Reagent

Several inks were used in the fabrication of screen printed electrodes (SPEs), namely Electrodag PF-407 A (carbon ink), Electrodag 6037 SS (silver/silver chloride ink) and Electrodag 452 SS (dielectric ink) all supplied by Acheson Colloiden (Scheemda, The Netherlands). Analytical grade chemicals with no additional purification were used. All solutions were prepared in ultrapure water, conductivity of $0.05 \mu\text{Scm}^{-1}$ (Gen-Pure TKA, Niederelbert, Germany).

Hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate (HAuCl_4), ALP, bovine serum albumine (BSA) and glutaraldehyde (GA) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). *p*-nitrophenyl phosphate sodium salt was acquired from Fluka Analytical (Buchs, Switzerland). Ammonium metavanadate (Merck, Darmstadt, Germany) was used as stock solution of vanadium.

Tris(hydroxymethyl)aminomethane 28 mM buffer (Aldrich Chemical Co., Buchs, Switzerland) was used together with 19 mM of MgCl_2 (Merck) and 0.36 M total Cl^- , (Merck) as supporting electrolyte. HCl (Merck) was used to adjust the pH value.

Vanadium standard solutions 10 mg L^{-1} were prepared daily from a stock solution 100 mg L^{-1} , and stored at 4°C when not in use, by using ammonium vanadate CertiPUR traceable to NIST (Merck, Darmstadt, Germany) SRM, certified value $1000 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$ (High-Purity Standards, CRM traceable to NIST SRM against 3165, lot 992706, USA) was used to enrich samples for a recovery study.

5.2.2 Apparatus

SPCEs were produced on a DEK 248 printing machine (DEK, Weymouth, UK) using polyester screens with appropriate stencil designs. Electrochemical measurements were made with an Autolab 128N electrochemical system with GPES

software (Echo Utrecht, The Netherlands). The pH measurements were performed using a Mettler-Toledo pHmeter S47-K (Columbus, OH, USA).

5.2.3 Manufacturing of ALP/AuNPs/SPCEs

SPCEs were produced by sequential layer deposition of each component, that is, conductive silver tracks, Ag/AgCl reference electrode (Ag/AgCl SPE), carbon counter and working electrodes and finally, dielectric ink, according to the procedure described anywhere else [39]. The different inks were cured according to the manufacturer's specifications. Screen-printed configurations of three electrodes (working, reference and counter electrode) were thus obtained (Figure 5.1).

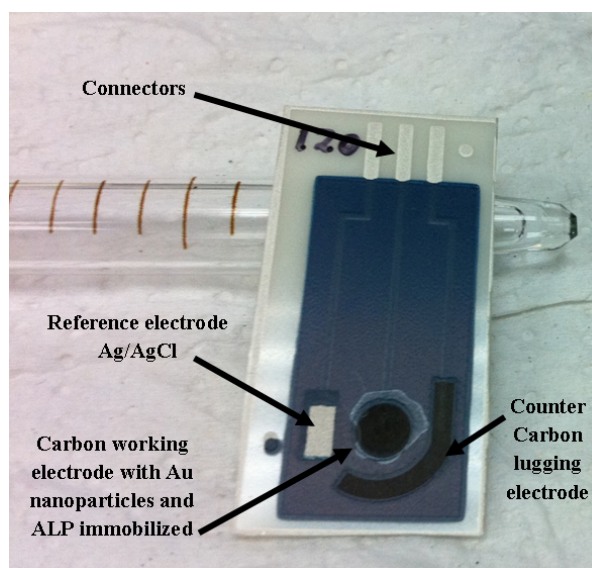


Figure 5.1. ALP/AuNPs/SPCE used for vanadium determination. Carbon working electrode area, 12.6 mm².

The working electrode of these devices was electrochemically modified by AuNPs, 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 vs. Ag/AgCl during 15 s under stirring conditions [20,40]. The enzyme was then immobilized by cross-linking on the surface of AuNPs modified SPCEs. To optimize an appropriate mixture of ALP enzyme, BSA and GA, several electrodes with different quantities of the enzyme from 20 μL to 80 μL, 10 μL–20 μL BSA and 20 μL–40 μL GA, were prepared and

the best results were obtained with a mixture made up of 40 μL of ALP 0.6%, 20 μL of BSA 1.75% (w/v) and 40 μL of GA, 2.5% (w/v) which gave the best current response (Figure 5.2) by dropping 10 μL of a 2:1:2 mixture of a 0.6% of enzyme solution, 1.75% (w/v) of BSA solution and 2.5% (w/v) of GA solution onto the surface of a screen-printed working electrode [20]. Finally, the mixture was left to react at 4 $^{\circ}\text{C}$ during 1 h. ALP/AuNPs/SPCEs were stored at 4 $^{\circ}\text{C}$. Under these storage conditions the developed biosensor showed a good stability for at least one week. Figure 5.3 shows calibration curves for vanadium prepared the same day but measured at different times from electrode preparation, and table 5.1 shows the slope variation of the calibration curves in figure 5.3.

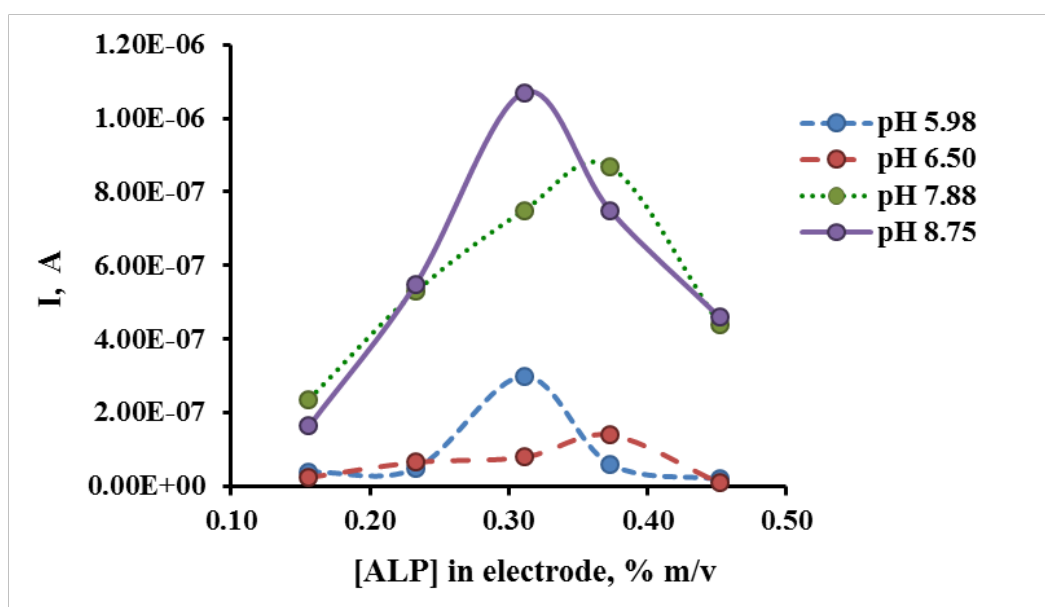


Figure 5.2. Currents obtained by *p*-NPP additions using ALP/SPCE electrodes with different enzyme concentrations, at pH = 8.7, $E_{ap.} = + 0.80$ V, 0.36 M Cl⁻.

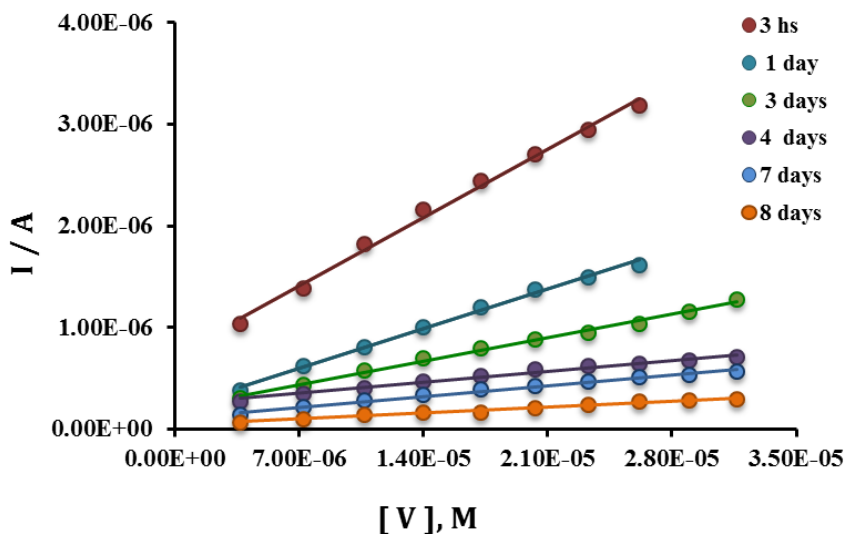


Figure 5.3. Stability of calibration curves for vanadium with the same electrode modified with AuNPs and ALP enzyme, at pH = 8.7, $E_{ap.} = + 0.80$ V, 0.032 mM substrate and 0.36 M Cl^- , at different days.

Table 5.1. Slopes variation according to time of electrode preparation under conditions of figure 5.3.

Days	Slope A/M	R^2
3 (hs)	0.0961	0.995
1	0.0557	0.995
3	0.0330	0.995
4	0.0155	0.983
7	0.0150	0.987
8	0.00841	0.989

5.2.4 Measurement Procedure

Chronoamperometric measurements were performed at room temperature in a cell containing 5 mL of supporting electrolyte solution, of the desired pH, under constant mechanical stirring. An ALP-based biosensor was placed in the

electrochemical cell containing 5 mL of supporting electrolyte solution. An adequate potential was applied and, once a steady-state current was set, a defined amount of *p*-nitrophenyl phosphate stock solution was added to the measuring cell. A large anodic current was observed due to the oxidation of the enzymatically produced *p*-nitrophenol. Then, once a plateau corresponding to the steady-state response was reached again, fixed portions of the vanadium stock solution were added consecutively. Enzyme electrodes were conditioned in a buffer solution for 5 min between each calibration setting.

5.3 Results and Discussion

In the previous section 5-riboflavin monophosphate was used as a substrate for an alkaline phosphatase biosensor because there was no report of such a substrate being used for a biosensor. Preechaworapun [28] presented a list of the substrates for this type of enzymes, and Fanjul [31] studied the detection of *p*-nitrophenol in alkaline phosphatase assays. In our case we proved several substrates recommended by Preechaworapun such as 3-indoxyphenyl phosphate, 1-naftyl phosphate and *p*-nitrophenyl phosphate, but the last one presented higher currents, and also ALP inhibition currents decreased significantly with vanadium additions.

As mentioned above, *p*-nitrophenyl phosphate is hydrolyzed by ALPs, under alkaline conditions, to 4-nitrophenol, which is electrochemically oxidized, originating a well-defined oxidation current, as it is showed in figure 4. [31]. Taking into account that enzymatic activity of ALPs is inhibited by vanadium [18, 20, 25], the presence of this metal into the electrochemical cell results in a current decrease. In this way, the difference between the steady-state current in the absence of vanadium (I_0) and the steady-state current in the presence of vanadium (I) ($\Delta I = (I_0 - I)$) can be quantitatively related to concentration of vanadium added.

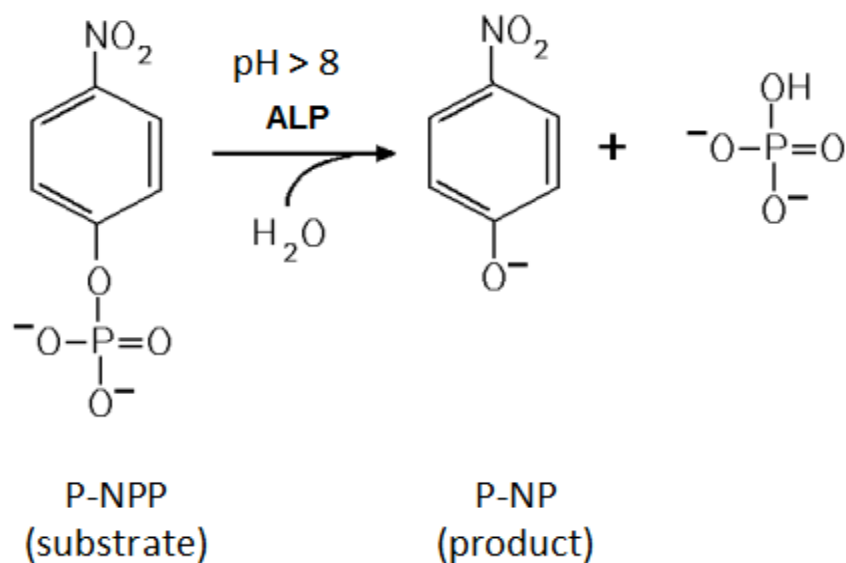


Figure 5.4. Enzymatic hydrolysis reaction of *p*-nitrophenylphosphate *p*-NPP by Alkaline Phosphatase (ALP).

5.3.1 Optimization of experimental parameters

In order to quantify this kind of electrochemical current, an ALP-based biosensor was built according to the procedure described in Section 5.2.3. This chronoamperometric current depends on experimental factors, such as pH of supporting electrolyte, substrate concentration, working potential or ionic strength of the medium (concentration of Cl^- ions into the electrochemical cell). In order to maximize the registered inhibition current, the effect of these variables and their interactions in the chronoamperometric response was at first evaluated by the experimental design methodology [41-43]. The experimental domain was defined by the values shown in Table 5.2, corresponding to the high (+) and low (-) levels for each factor. Then, the 17 experiments corresponding to all those possible combinations, bearing in mind the three replicates in the central point necessary to estimate the residual value, were carried out. Once the oxidation current registered due to the enzymatically produced *p*-nitrophenol was stable, vanadium was added, quantifying the chronoamperometric current of a 1.8 μM solution as response variable for the analysis.

Table 5.2. Values corresponding to the high (+) and low (–) levels for each factor used in the optimization of the experimental conditions for vanadium detection. Supporting electrolyte, pH, working potential, substrate concentration and ionic strength.

Conditions	Low Level	High Level	Optimum
pH Tris-HCl supporting electrolyte	6.3	9.7	8.7
Substrate [<i>p</i> -NPP]	0.036 m M	0.38 m M	0.32 m M
Ionic strength	0.10 M	0.50 M	0.36 M
Working potential	0.1 V vs. Ag/AgCl	1.0 V vs. Ag/AgCl	+ 0.80 V

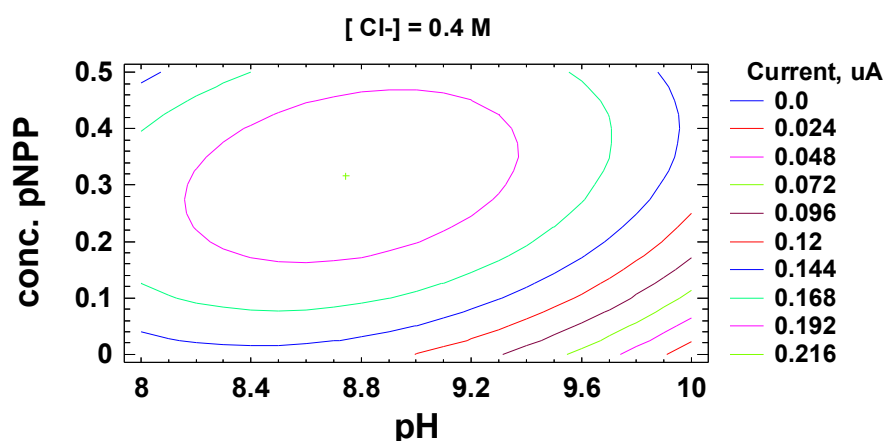


Figure 5.5. Contours of estimated response surface for ALP and *p*-NPP at [Cl⁻] = 0.40 M. The central green point in the center of the circle is considered the optimum values for experimental variables mentioned above.

From this optimization process, the optimum values for the experimental variables in the vanadium determination were used. Easily quantifiable chronoamperometric signals are registered under these optimized conditions for V(V).

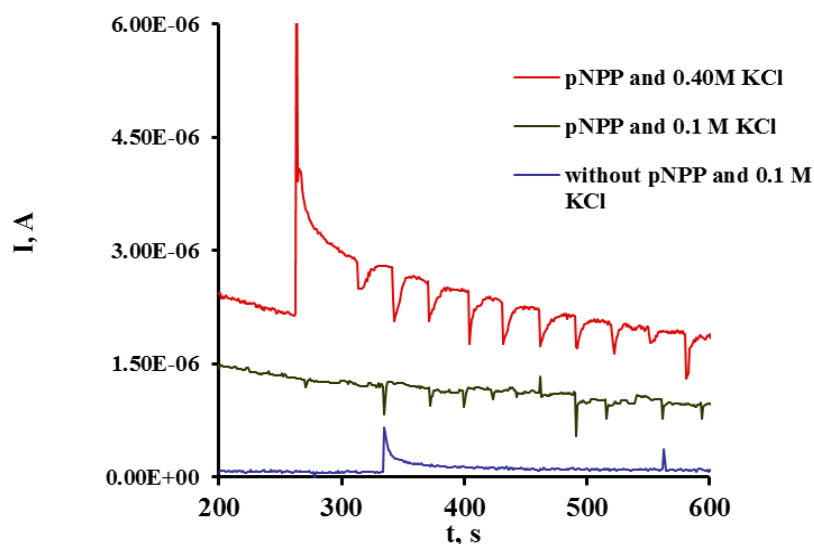


Figure 5.6. Chronoamperogram registered using an ALP-based biosensor under the optimum conditions (applied potential, + 0.80 V vs. Ag/AgCl-SPCE, supporting electrolyte pH 8.7 (Tris buffer, different KCl and *p*-NPP concentration in a vanadium range from 3.0 μ M to 30.0 μ M).

It is important to say that the presence of Cl^- is determinat in the good appeareace of vanadium signal, also to improve the sensitivity, because as it can be seen in figure 5.6, the amperogram has better resolution in the presence on KCl, as ionic strength, higher its concentration, higher the current and better defined the chronoamperogram.

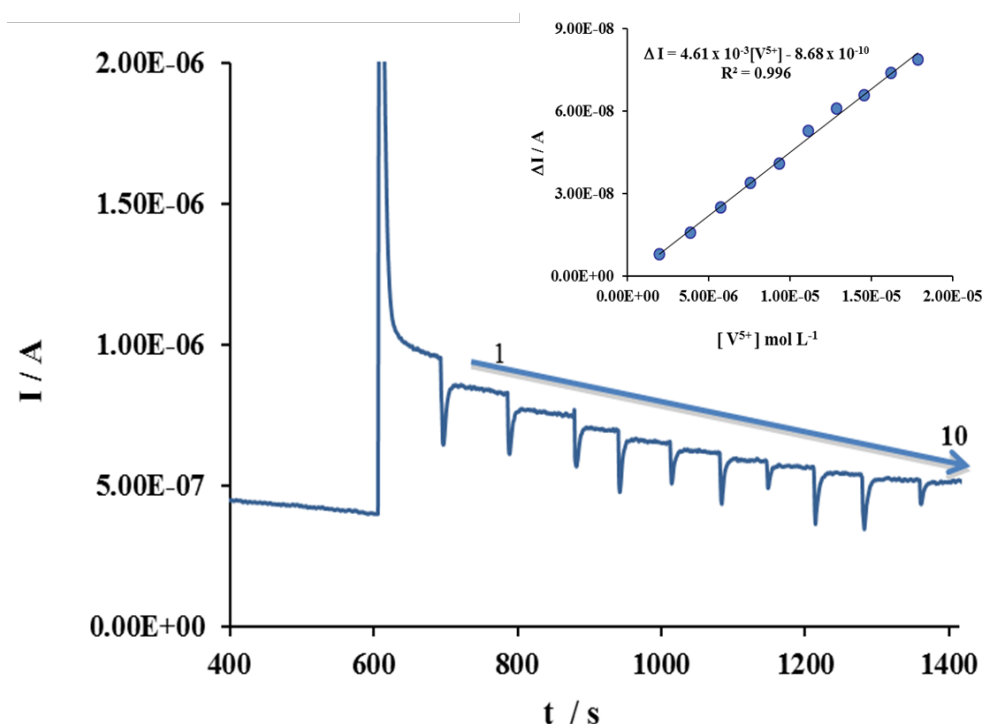


Figure 5.7. Chronoamperogram registered using an ALP-based biosensor under the optimum conditions (applied potential, + 0.80 V vs. Ag/AgCl SPCE; supporting electrolyte pH 8.7 (Tris buffer, 0.36 M total Cl⁻) and *p*-NPP, 0.32 mM) in the vanadium concentration range from 3.0 μ M to 30.0 μ M. Inset: Calibration curve for vanadium additions at concentration range from 3.0 μ M to 30.0 μ M under the optimum conditions above.

Control experiments were carried out under the optimum conditions using bare SPCEs and AuNPs-SPCEs but without enzyme as reported in Section 5.2.3. No analytical signal was obtained, that is to say, the inhibition response registered after the addition of the substrate is only related to vanadium concentration. Therefore, vanadium can be determined by its inhibitory effect on the response of ALP to *p*-nitrophenyl phosphate. Figure 5.7 inset figure show the amperometric signals of the substrate addition and vanadium additions 1 to 10 under optimal conditions, and a calibration curve for V(V).

5.3.2 Study of vanadium inhibitory effect on alkaline phosphatase

The inhibitory effect of this metal in the enzymatic activity, when using *p*-nitrophenyl phosphate as substrate, was also studied by the kinetic parameters of the Lineweaver-Burk plot (V_{max} and K_m), in absence and presence of vanadium. In absence of the metal, V_{max} and K_m *apparent* were 1.1×10^{-6} and 2.8×10^{-4} , respectively. In presence of vanadium, it was observed that V_{max} and K_m *apparent* increased: with 3.8 μM of vanadium, $V_{max} = 2.1 \times 10^{-6}$, $K_m = 6.5 \times 10^{-4}$, and with 11 μM of vanadium $V_{max} = 2.5 \times 10^{-6}$ M and $K_m = 9.9 \times 10^{-4}$ which suggest a mixed inhibition [44]. Thus, the inhibitory effect of vanadium on the ALP/*p*-NPP reaction has been confirmed for the higher affinity of ALP for *p*-NPP in the absence of this metal.

Table 5.3. Michaelis-Menten apparent constant K_m *app.* under the same conditions as in figure 5.7, with and without V(V) at two different concentrations in cell.

[V(V)]	Slope	Intercept		K_m <i>app.</i>
	K_m/V_m	$1/V_m$	V_m	
Without V(V)	251.2	903271	1.1×10^{-6}	2.8×10^{-6}
3.8×10^{-6} M	309.8	477675	2.1×10^{-6}	6.5×10^{-6}
1.11×10^{-5} M	392.7	396862	2.5×10^{-6}	9.9×10^{-6}

According to table 5.3 results, K_m increases with the presence of the inhibitor metal, and V_m increases a little bit; based on this and figure 5.8 it may resemble a mixed inhibition.

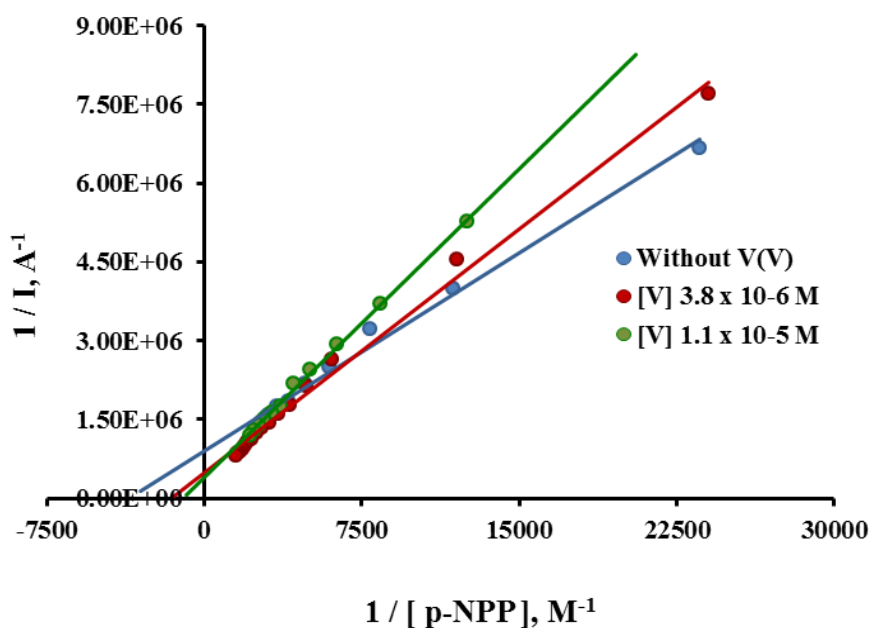


Figure 5.8. Lineweaver-Burk graphic to determine inhibition by vanadium over ALP enzyme with *p*-NPP as a substrate under optimum conditions as in figure 5.7.

Also it was study the inhibition effect of ALP under different ionic strength, as it can be seen in figure 5.9, and the K_m apparent were calculated. As ionic strength increases, the slope also increases. It has the same behavior than figure 5.8, where K_m *app* is higher for higher ionic strength.

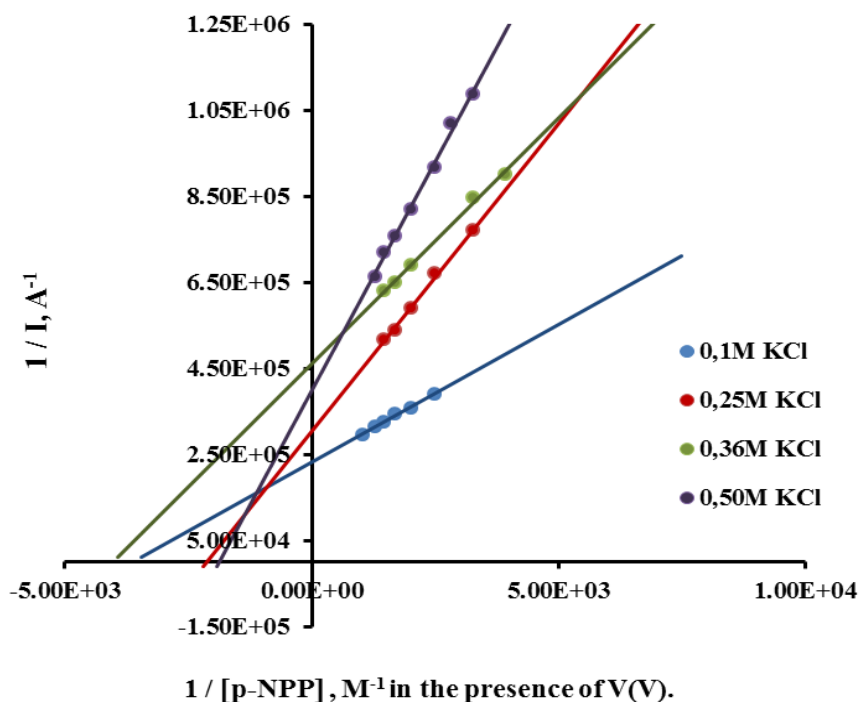


Figure 5.9. Lineweaver-Burk graphics at different ionic strength to determine inhibition over alkaline phosphatase enzyme with *p*-NPP as a substrate, and $[V] = 3,8 \times 10^{-6} M$ under optimum conditions as in figure 5.7.

5.3.3 Validation parameters

5.3.3.1 Limit of detection

The detection of vanadium through the inhibition of ALP/*p*-NPP reaction (calibration range from $0.8 \mu M$ to $30.0 \mu M$) has resulted more sensitive than the reported one, based on the inhibition of ALP/5-RFP (calibration range from $1.8 \mu M$ to $15.0 \mu M$) [15]. In this way, the limit of detection based on the standard deviation (S_y/x) of the responses for the blank injection in triplicate and the slope of the calibration curve was $0.39 \pm 0.07 \mu M$, one order lower than the previously one reported [20].

Table 5.4. Limits of detection and quantification for alkaline phosphatase biosensor for vanadium calculated at optimum conditions as in figure 5.7.

Replicates	Slope	Intercept	Error	R ²	LOD	LOQ
	A / M	A	Sy/x		M, 3 σ	M, 10 σ
1	1.390×10^{-1}	5.5×10^{-8}	1.8×10^{-8}	0.988	3.9×10^{-7}	1.3×10^{-6}
2	1.593×10^{-1}	8.5×10^{-8}	2.5×10^{-8}	0.990	4.7×10^{-7}	1.6×10^{-6}
3	1.390×10^{-1}	3.6×10^{-8}	1.6×10^{-8}	0.992	3.4×10^{-7}	1.2×10^{-6}
Media	1.458×10^{-1}				3.9×10^{-7}	1.3×10^{-6}
Std. Dev	0.0017					
RSD %	8.0 %					

5.3.3.2 Precision, replicability and reproducibility

Precision of the developed procedure was studied in terms of repeatability (intra-biosensor) and reproducibility (inter-biosensors). Both figures of merit have been determined as the relative standard deviation (RSD) of the slopes of four calibration curves built under the optimum conditions of the experimental variables. Values of 7.6 % and 8.1 % (n = 3) were obtained for repeatability and reproducibility, respectively.

Table 5.5. Repeatability study using three calibration curves using the same electrodes of ALP biosensor with *p*-NPP as a substrate.

Replicate	Slope A / M	Intercept A	Error Sy/x	R²
1	1.066×10^{-2}	3.1×10^{-8}	4.0×10^{-9}	0.983
2	1.074×10^{-2}	2.9×10^{-8}	5.5×10^{-9}	0.993
3	1.217×10^{-2}	5.2×10^{-9}	4.8×10^{-10}	0.994
Media	1.119×10^{-2}			
Std. Dev.	8.5×10^{-4}			
RSD	7.6 %			

Table 5. 6. Parameters of three calibrations with different electrodes to study the reproducibility of the ALP biosensor with *p*-NPP as a substrate.

Replicates	Slope A / M	Intercept A	Error Sy/x	R²
1	1.772×10^{-2}	5.7×10^{-8}	7.9×10^{-9}	0.994
2	2.074×10^{-2}	4.9×10^{-8}	8.0×10^{-9}	0.996
3	2.000×10^{-2}	1.7×10^{-7}	1.2×10^{-8}	0.987
Media	1.949×10^{-2}			
Std. Dev.	0.0016			
RSD	8.1 %			

5.3.3.3 Accuracy and trueness

The performance of the developed procedure was checked by its accuracy and trueness. The accuracy of the proposed method was evaluated by means of the analysis of a vanadium certified sample (High Purity Standards(R) Vanadium Standard solution with a Certificate of Analysis confirmed against SRM 3165, lot 992706, certified value $(1000 \pm 5) \text{ mg L}^{-1}$). The vanadium mean concentration quantified, $1025 \pm 37 \text{ mg L}^{-1}$ ($n = 45$; $\alpha = 0.05$) matches the certified value of the sample, also recovery of this standard in tap water gives a result of $(984 \pm 36) \text{ mg L}^{-1}$ ($n = 5$, $\alpha = 0.05$ and RSD 3.6 %). The method also showed a satisfactory value for trueness, evaluated by recovery studies, since the added vanadium concentration values ($7.33 \text{ }\mu\text{M}$) were in good agreement with the found concentration value of $7.53 \pm 0.23 \text{ }\mu\text{M}$ ($n = 4$, $\alpha = 0.05$). The average recovery for this analysis was $102.7 \pm 3.2 \%$ with a RSD of 3.1 %. Therefore, the proposed method is both accurate and suitable for the analysis of vanadium.

Table 5. 7. Recovery study for blanks spiked with V(V) standard reference material SRM 3165, lot 992706, certified value $(1000 \pm 5) \text{ mg L}^{-1}$ under optimun conditions as figure 5.7.

Replicate	[V] added M	[V] found M	Recovery %	Slope A / M	Intercept A	Error Sy/x	R ²
1	7.33×10^{-6}	7.59×10^{-6}	103.5	0.02922	7.8×10^{-8}	1.2×10^{-8}	0.992
2	7.33×10^{-6}	7.23×10^{-6}	98.6	0.02000	9.5×10^{-8}	7.6×10^{-9}	0.996
3	7.33×10^{-6}	7.52×10^{-6}	102.5	0.01772	5.7×10^{-8}	7.9×10^{-9}	0.994
4	7.33×10^{-6}	7.79×10^{-6}	106.3	0.02859	6.5×10^{-8}	1.3×10^{-8}	0.987
Media		7.53×10^{-6}	102.7				
Std. Dev.		2.3×10^{-7}	3.2				
RSD %		3.1	3.1				

Table 5.8. Recovery study for water spiked with V(V) SRM standard reference material SRM 3165, lot 992706, certified value (1000 ± 5) mg L⁻¹ under optimum conditions as figure 5.7, (D.F. dilution factor).

Tap water spiked, M	Added [V], M	Found [V], M	Recovery [V], mg/L	In cell [V],mg/L	D.F. 1/0.6	D.F. 100/10	D.F. 100/10
4.94×10^{-6}	2.68×10^{-6}	2.26×10^{-6}	1.15×10^{-1}	6.04	10.068	100.68	1006.8
5.00×10^{-6}	2.68×10^{-6}	2.31×10^{-6}	1.18×10^{-1}	6,19	10.324	103.24	1032.4
4.74×10^{-6}	2.37×10^{-6}	2.37×10^{-6}	1.21×10^{-1}	6,34	10.567	105.67	1056.7
4.37×10^{-6}	2.20×10^{-6}	2.17×10^{-6}	1.11×10^{-1}	5.82	9.695	96.95	969.5
4.20×10^{-6}	1.82×10^{-6}	2.37×10^{-6}	1.21×10^{-1}	6.34	10.575	105.75	1057.5
Media							1025
Std. Dev.							37
RSD %							3.6

5.3.3.4 Vanadium determination in water samples

Finally, the developed procedure was applied to the determination of vanadium in spiked tap water samples (1.96 μ M), by standard addition methodology in quadruplicate. The concentration of vanadium found was 1.99 ± 0.23 μ M ($n = 4$, $\alpha = 0.05$, RSD = 6.8%), with an average recovery of 101%.

5.4. Study of interference cations

The possible interference from other metals, such as Ca(II), Sn(II), Al(III), Fe(III), Cr(III), As(V), Mo(VI) and W(VI), has been studied. Their effect was analyzed by measuring the inhibition current after consecutive additions of several solutions of each metal. It was observed that Al(III), As(V), Fe(III) and Sn(II) have a null influence on the vanadium chronoamperometric response. However, Cr(III), Mo(VI) and W(VI) present a higher inhibition current, so these metals must be taken into account in the analysis of vanadium.

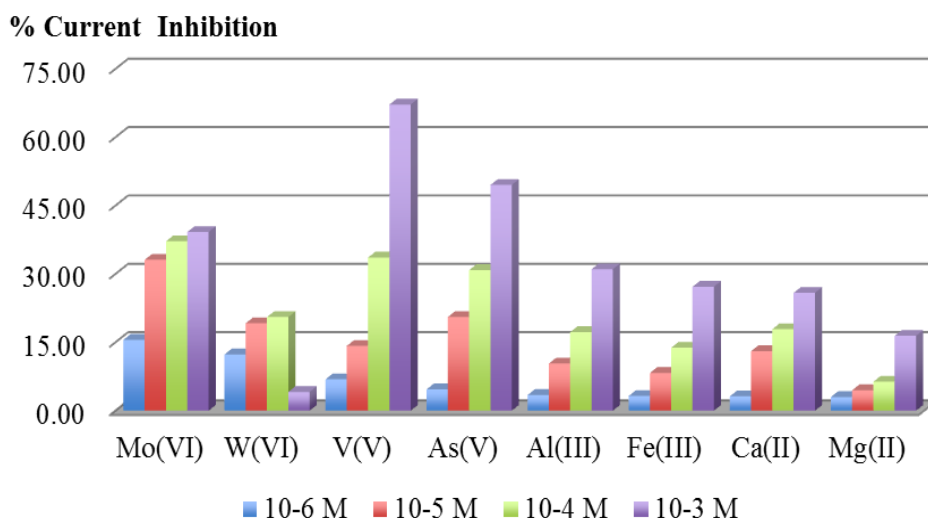


Figure 5.10. Inhibition current % of several elements compared with inhibition of vanadium(V).

5.5 Conclusions

The use of ALP based biosensors using AuNPs/SPCEs allows the selective chronoamperometric determination of vanadium, and offer better figures of merit compared with the described in section 4, [20] using riboflavin 5-monophosphate, lower limit of detection, wider linear range, but the same interferences, W(VI) and Mo(VI), which are the most significant at μM levels.

The effect of vanadium in the ALP/p-NPP reaction results in a mixed inhibition, which allows the quantification of vanadium in tap water.

The developed procedure has shown a LOD of $0.39 \pm 0.06 \mu\text{M}$, ten times lower than previously reported in section 4.3.2. The repeatability has a RSD = 7.6% (n=3) and reproducibility of 8.1% (n=3).

Accuracy and trueness values obtained with spiked water samples with CRM V(V) standard certified value ($1000 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$) recovery $1025 \pm 37 \text{ mg L}^{-1}$; blanks spiked with the same standard recovery 102.7 % with a RSD = 3.1 %.

The interferences study showed that Cr(III), Mo(VI) and W(VI) are major interferences if they are present in the water samples at 10^{-6} M to 10^{-4} M.

5.6 References

1. Michibata, H.; Yamaguchi, N.; Uyama, T.; Ueki, T. (2003). Molecular biological approaches to the accumulation and reduction of vanadium by ascidians. *Coord. Chem. Rev.*, 237, 41–51.
2. Mukherjee, B., Patra, B.; Mahapatra, S.; Banerjee, P.; Tiwari, A.; Chatterjee, M. (2004). Vanadium—An element of atypical biological significance. *Toxicol. Lett.* 150, 135–143.
3. Ueki, T.; Michibata, H. (2011). Molecular mechanism of the transport and reduction pathway of vanadium in ascidians. *Coord. Chem. Rev.* 255, 2249–2257.
4. Rehder, D. (2000). Vanadium nitrogenase. *J. Inorg. Biochem.*, 80, 133–136.
5. Janas, Z., Sobota, P. (2005). Aryloxo and thiolato vanadium complexes as chemical models of the active site of vanadium nitrogenase. *Coord. Chem. Rev.* 249, 2144–2155.
6. Rehder, D. (1999). The coordination chemistry of vanadium as related to its biological functions. *Coord. Chem. Rev.* 182, 297–322.
7. Rodríguez-Mercado, J.J., Altamirano-Lozano, M.A. (2010). Vanadio: Contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 22, 173–189.
8. U.S. Department of Health and Human Services. (2012). *Toxicological Profile for Vanadium*. Atlanta, GA.
9. World Health Organization, Regional Office for Europe. (2000). Air Quality Guidelines for Europe: Vanadium. Chapter 6.12. Copenhagen, Denmark.
10. Guidelli, E.J., Guerra, E.M., Mulato, M. (2011). Ion sensing properties of vanadium/tungsten mixed oxides. *Mater. Chem. Phys.* 125, 833–837.

11. Tsiafoulis, C.G., Florou, A.B., Trikalitis, P.N., Bakas, T., Prodromidis, M.I. (2005). Electrochemical study of ferrocene intercalated vanadium pentoxide xerogel/polyvinyl alcohol composite films: Application in the development of amperometric biosensors. *Electrochem. Commun.* 7, 781–788.
12. Zhu, Z., Sun, X., Wang, Y., Zeng, Y., Sun, W., Huang, X. (2010). Electrochemical horseradish peroxidase biosensor based on dextran–ionic liquid–V₂O₅ nanobelt composite material modified carbon ionic liquid electrode. *Mater. Chem. Phys.* 124, 488–492.
13. Venkataraman, B.V., Sudha, S. (2005). Vanadium toxicity. *Asian J. Exp. Sci.* 19, 127–134.
14. Bhattacharyya, S., Tracey, A.S. (2001). Vanadium (V) complexes in enzyme systems: aqueous chemistry, inhibition and molecular modeling in inhibitor design. *J. Inorg. Biochem.* 85, 9–13.
15. Boyd, D.W., Kustin, K., Niwa, M. (1985). Do vanadate polyanions inhibit phosphotransferase enzymes? *Biochim. Biophys. Acta*, 827, 472–475.
16. Lindquist, R.N., Lynn, J.L., Lienhard, G.E. (1973). Possible transition-state analogs for ribonuclease. Complexes of uridine with oxovanadium (IV) ion and vanadium (V) ion. *J. Am. Chem. Soc.* 95, 8762–8768.
17. Van Etten, R.L., Waymack, P.P., Rehkop, D.M. (1974). Transition metal ion inhibition of enzyme-catalyzed phosphate ester displacement reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 96, 6782–6785.
18. Lopez, V., Stevens, T., Lindquist, R.N. (1976). Vanadium ion inhibition of alkaline phosphatase-catalyzed phosphate ester hydrolysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 175, 31–38.
19. Amine, A., Mohammadi, H., Bourais, I., Palleschi, G. (2006). Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosens. Bioelectron.* 21, 1405–1423.
20. Alvarado-Gómez, A.L., Alonso-Lomillo, M.A., Domínguez-Renedo, O., Arcos-Martínez, M.J. (2013). Vanadium determination in water using alkaline phosphatase based screen-printed carbon electrodes modified with gold nanoparticles. *J. Electroanal. Chem.* 693, 51–55.
21. Park, J., Kim, Y. (2013). An improved fluorogenic substrate for the detection of alkaline phosphatase activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 2332–2335.

22. Berezhetsky, A.L., Sosovska, O.F., Durrieu, C., Chovelon, J.M., Dzyadevych, S.V., Tran-Minh, C. (2008). Alkaline phosphatase conductometric biosensor for heavy metal ions determination. *ITBM-RBM*, 29, 136–140.
23. Szydłowska, D., Campás, M., Marty, J.L., Trojanowicz, M. (2006). Catechol monophosphate as a new substrate for screen-printed amperometric biosensors with immobilized phosphatases. *Sensor Actuat. B-Chem.* 113, 787–796.
24. Zhang, J., Cass, A.E. (2000). Electrochemical analysis of immobilized chemical and genetic biotinylated alkaline phosphatase. *Anal. Chim. Acta*, 408, 241–247.
25. Koncki, R., Rudnicka, K., Tymecki, L. (2006). Flow injection system for potentiometric determination of alkaline phosphatase inhibitors. *Anal. Chim. Acta*, 577, 134–139.
26. Ito, S., Yamazaki, S., Kano, K., Ikeda, T. (2000). Highly sensitive electrochemical detection of alkaline phosphatase. *Anal. Chim. Acta*, 424, 57–63.
27. Serra, B., Morales, M.D., Reviejo, A.J., Hall, E.H., Pingarrón, J.M. (2005). Rapid and highly sensitive electrochemical determination of alkaline phosphatase using a composite tyrosinase biosensor. *Anal. Biochem.* 336, 289–294.
28. Preechaworapun, A., Dai, Z., Xiang, Y., Chailapakul, O., Wang, J. (2008). Investigation of the enzyme hydrolysis products of the substrates of alkaline phosphatase in electrochemical immunosensing. *Talanta*, 76, 424–431.
29. Abad-Villar, E.M., Fernández-Abedul, M.T., Costa Garca, A. (2002). Gold bands as a suitable surface for enzyme immunoassays. *Biosens. Bioelectron.* 17, 797–802.
30. Kokado, A., Arakawa, H., Maeda, M. (2000). New electrochemical assay of alkaline phosphatase using ascorbic acid 2-phosphate and its application to enzyme immunoassay. *Anal. Chim. Acta*, 407, 119–125.
31. Fanjul-Bolado, P., González-García, M.B., Costa-García, A. (2006). Flow screen-printed amperometric detection of *p*-nitrophenol in alkaline phosphatase-based assays. *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 1202–1208.

32. González-Garca, M., Costa-Garca, A. (2000). Silver electrodeposition catalyzed by colloidal gold on carbon paste electrode: Application to biotin-streptavidin interaction monitoring. *Biosens. Bioelectron.* 15, 663–670.
33. Siangproh, W., Dungchai, W., Rattanarat, P., Chailapakul, O. (2011). Nanoparticle-based electrochemical detection in conventional and miniaturized systems and their bioanalytical applications: A review. *Anal. Chim. Acta*, 690, 10–25.
34. Liu, T., Zhong, J., Gan, X., Fan, C.H., Li, G.X., Matsuda, N. (2003). Wiring electrons of cytochrome c with silver nanoparticles in layered films. *Chem. Phys. Chem.* 4, 1364–1366.
35. Xiao, Y. (2003). Plugging into enzymes: Nanowiring of redox enzymes by a gold nanoparticle. *Science*, 299, 1877–1881.
36. Xu, J.Z., Zhu, J.J., Wang, H., Chen, H.Y. (2003). Nano-sized copper oxide modified carbon paste electrodes as an amperometric sensor for amikacin. *Anal. Lett.* 36, 2723–2733.
37. Zen, J.M., Hsu, C.T., Kumar, A.S., Lyuu, H.J., Lin, K.Y. (2004). Amino acid analysis using disposable copper nanoparticle plated electrodes. *Analyst*, 129, 841–845.
38. Kim, G.Y., Shim, J., Kang, M.S., Moon, S.H. (2008). Preparation of a highly sensitive enzyme electrode using gold nanoparticles for measurement of pesticides at the ppt level. *J. Environ. Monitor.* 10, 632–637.
39. Del Torno-de Román, L., Alonso-Lomillo, M.A., Domínguez-Renedo, O., Arcos-Martínez, M.J. (2013). Gluconic acid determination in wine by electrochemical biosensing. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 176, 858–862.
40. Domínguez-Renedo, O., Arcos-Martínez, M.J. (2007). Anodic stripping voltammetry of antimony using gold nanoparticle-modified carbon screen-printed electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 589, 255–260.
41. Box, G.E.P. (2008). *Estadística para Investigadores: Diseño, Innovación y Descubrimiento.* (2nd ed.). Barcelona, Spain: Editorial Reverte S.A.
42. Lewis, G.A., Mathieu, D., Phan, R.T.L. (1999). *Pharmaceutical Experimental Design.* New York, NY: Marcel Dekker Inc.

43. Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Deming, S.M., Michotte, Y., Kaufman, L. (2003). *Chemometrics: A Textbook*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
44. Turdean, G.L. (2011). Design and development of biosensors for the detection of heavy metal toxicity. *Inter. J. Electrochem.* 2011, 1–15.

***6. Chronoamperometric Screen Printed Biosensor
Based On Alkaline Phosphatase Inhibition For W(VI)
Determination In Water, Using 2-Phospho-
L-Ascorbic Acid Trisodium Salt As A Substrate***

El tungsteno aunque se ha considerado como no tóxico, en el capítulo 3 se han descrito las posibles efectos sobre la salud de los humanos y su posible efecto tóxico en plantas y animales. Por eso la importancia de determinar su contenido en aguas de consumo humano.

En esta sección se presenta un dispositivo para determinar la concentración de W(VI) presente en muestras de agua, con la ventaja de trabajar a muy bajo potencial, utilizando la misma enzima ALP como en las secciones anteriores pero con un sustrato que le permite cuantificar el metal debido a la inhibición de la actividad enzimática por la presencia del tungsteno. (Secciones 6.2. y 6.3) Se utilizaron al igual que en casos anteriores como base SPCEs modificados con AuNPs, y ALP, y utilizando el 2-fosfo-L-ascorbato de sodio como sustrato. Este biosensor presenta buena sensibilidad, los parámetros de mérito demuestran un buen desempeño del dispositivo en muestras de agua de grifo. agua purificada y agua embotellada.

No se ha encontrado ninguna publicación relacionada con dispositivos que permitan la determinación del tungsteno utilizando la enzima ALP.

Este trabajo ha sido presentado como poster en el XXI Congreso de la Sociedad Iberoamericana de electroquímica, SIBAE en La Serena, Chile entre el 7 y el 11 de abril de 2014 y publicado en *Sensors (Basel)* 15(2), 2232-2243.

6.1 Introduction

Tungsten is a metal, which occurs naturally in soils and sediments, usually in small concentrations ranging between 0.2 and 2.4 mg·kg⁻¹ in the lithosphere [1–3]. This metal is also present in oceanic waters in trace amounts, for instance its contents for the Northern Atlantic and Pacific Oceans reported in the literature are 100 ng·L⁻¹ and 8 ng·L⁻¹ respectively [1]. In aqueous media, WO₄²⁻ is the dominant species, occurring as monomer in a pH range of 6.9 to 9.3, while polytungstate species form at lower pH and higher W concentration. Ions such as NH₄⁺ shift the pH at which polycondensation occurs, thus polytungstate species in ammoniacal solution are stable at pH values where normally only monotungstate ions would exist. On the other hand, W has been found with a concentration between 0.27 μM and 742 μM in groundwater in Carson Desert (Nevada, USA) [4].

Natural processes for tungsten isolation include weathering of W-rich rocks and soils, dissolutions, hydrothermal and volcanic activity, atmospheric precipitation (wet and dry) and excretion of metabolites. Tungsten occurs in the oxidation states +3, +4, +5 and +6, however, oxidation state +6 represents the most stable of tungsten species. It has tensile strength at high temperature, a density of 19.1 g·cm⁻³ and the highest melting/boiling points among elements. These properties make tungsten suitable for a wide variety of uses. Tungsten-based products have been in use in a wide range of applications, stretching from daily household supplies to highly specialized components of modern science and technology [1].

For a long time, tungsten was considered an insoluble metal that did not exhibit serious toxicological or environmental effects, and it was placed among less toxic elements. Nevertheless tungsten effects on environmental systems have not been investigated extensively in regards to its ecotoxicological effects, so published data are fragmentary. In fact, anthropogenic sources include a variety of industrial, commercial and military activities along with non-sustainable disposal practices of municipal, agricultural and industrial wastes. However, in spite of its extensive uses,

biological and biochemical effects of tungsten and tungsten compounds are not well known [1, 5].

For instance, it has been reported recently that tungsten as a trace element is toxic to people and animals, such as $5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of tungsten led to the death of animal embryos [2, 6, 7]. Other studies have shown that dissolution of metallic tungsten particles may cause adverse environmental effects such as soil acidification as well as direct and indirect toxic effects in plants, soil microorganisms and invertebrates. Therefore, it has been found necessary to re-evaluate the environmental regulations of tungsten, to confirm the “nontoxic” and “environmentally inert” of the metal [6, 8].

There are many techniques to analyse tungsten in environmental samples; mostly spectrophotometric methods such as Atomic Absorption and ICP-AES, as well as voltammetric and polarographic methods have been used [2, 3, 9–11]. The application of enzyme biosensors for determining toxic compounds is a dynamic promising research trend, because the associated analytical systems are simple, rapid and selective for amperometric, potentiometric or conductimetric techniques. They function by combining an electrochemical process with the activity of an immobilized enzyme. The selected enzyme must provide selectivity through its biological affinity for a particular substrate, usually of biological origin. These type of biosensors constitute one of the most widespread, numerous and successfully commercialized devices in biomolecular electronics since their inception, which implied the development of a novel field in analytical biotechnology [12, 13].

The enzyme immobilization on the electrode surface is a critical step that defines an enzyme electrode’s effectiveness. Different chemical, biochemical and physical factors such as the chemical cross-linking with glutaraldehyde, other functional antigen–antibody agent interactions, as well as the magnetic interactions, entrapment or encapsulation within polymers and the formation of paste materials, are generally used to immobilize the enzyme on the electrode surface [9, 13].

Alkaline phosphatase has been used to analyse some heavy metals, such as vanadium and molybdenum through these techniques. Metals such as vanadium and tungsten exert inhibitory effects on the enzyme alkaline phosphatase (ALP). For instance, in 1974, Van Etten, [14] demonstrated the influence of vanadate, molybdate and tungstate on phosphohydrolases such as acid phosphatases which are relatively nonspecific enzymes that catalyze the hydrolysis of several alkyl and aryl phosphate esters at pH values between 4 and 6. Our research group recently reported promising results using two different biosensors with this enzyme for vanadium detection at trace levels in water [15, 16], studying modification of electrode surfaces with gold nanoparticles in order to provide a micro-environment similar to native systems of redox proteins and allowing these molecules more freedom in orientation, thereby reducing the insulating effect of the protein shell towards direct electron transfer through gold nanocrystal conducting tunnels [17–19].

Thereby, we report in this paper the development of a new methodology to determine tungsten in water at low μM concentrations using a biosensor with a disposable screen printed carbon electrode (SPCE) modified with gold nanoparticles, using the enzyme alkaline phosphatase immobilized over the working electrode and 2-phospho-L-ascorbic acid trisodium salt as substrate.

6.2 Experimental Section

6.2.1. Chemical Reagents

Several inks were used in the fabrication of the screen printed carbon electrodes (SPCEs), namely Electrodag PF-407 A (carbon ink), Electrodag 6037 SS (silver/silver chloride ink) and Electrodag 452 SS (dielectric ink), all supplied by Acheson Colloiden (Scheemda, The Netherlands). Analytical grade chemicals with no further purification were used. All solutions were prepared in ultrapure water, conductivity of 0.05 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Gen-Pure TKA, Niederelbert, Germany).

Hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate (HAuCl_4), alkaline phosphatase (ALP), bovine serum albumine (BSA) and glutaraldehyde (GA) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

As a substrate 2-phospho-L-ascorbic acid trisodium salt was acquired from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Ammonium tungstate CertiPUR traceable to SRM from NIST (Merck, Darmstadt, Germany) was used as stock solution of tungsten.

Tungsten standard solutions 10 mg L^{-1} were prepared daily from a stock solution 100 mg L^{-1} , and stored at 4 ° C when not in use, by using ammonium tungstate CertiPUR traceable to NIST (Merck, Darmstadt, Germany) SRM. Tungsten metal purity 99.99%, (in 2% v/v HNO_3) certified value 1000 \pm 4 mg L^{-1} (High-Purity Standards, CRM traceable to NIST SRM against 3163, lot 080331, U.S.) was used to spike water samples for a recovery study.

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Aldrich Chemical Co., Buchs, Switzerland) 28 mM buffer was used together with 19 mM of MgCl_2 (Merck) and 0.36 M total Cl^- (Merck) as supporting electrolyte. HCl 0.1 mM (Merck) was used to adjust the pH value.

6.2.2 Apparatus

Screen Printed Carbon Electrodes (SPCEs) were produced on a DEK 248 printing machine (DEK, Weymouth, UK) using polyester screens with appropriate stencil designs. Electrochemical measurements were made with an Autolab 128N electrochemical system with GPES software (Echo Chemie, Utrecht, The Netherlands). The pH measurements were performed using a Mettler-Toledo pHmeter S47-K (Columbus, OH, USA)

Home-made SPCEs were used in the determination of tungsten. For the construction of the SPCEs, successive layers of different inks were printed onto a polyester strip substrate following the printing procedure described in previous works [19].

6.2.3 Preparation of Modified SCPEs Biosensor

The working electrode was electrochemically modified by gold nanoparticles (AuNPs), using a 0.1 mM solution of HAuCl_4 in 0.5 mM H_2SO_4 . The deposition was performed by applying a potential of + 0.18 V vs. Ag/AgCl during 15 s under stirring conditions [17,19–21]. The biologically sensitive layer of the biosensor was formed by cross-linking the enzyme alkaline phosphatase on the surface of the AuNPs-modified SPCEs, by dropping 10 μL of a 2:1:2 mixture of 0.6% of enzyme solution, 1.75% (w/v) of BSA solution and 2.5% (w/v) of GA solution onto the surface of a screen-printed working electrode. Volume and concentration of ALP, GA and BSA were optimized to obtain the maximum analytical response for the inhibition of the enzyme with W(VI) [15, 22]. Finally, the mixture was left to react at 4 °C during one hour and the ALP-AuNPs-SPCEs were stored at 4 °C. Under these storage conditions the developed biosensor showed good stability for at least one week.

6.2.4 Optimization of Experimental Conditions

In order to obtain a sensitive analytical signal, a 2^3 central composite design was carried out considering three important factors: pH, Cl^- and substrate

concentrations [23]. A group of 17 experiments were performed at different pH, Cl^- and substrate concentrations according to the design, and the best conditions obtained from an estimated surface. Another experiment was carried out to optimize the working potential. Considering that high potentials are not selective and lead to more oxidized species, it was applied a potential as low as possible, varying it from + 1.0 V to + 0.1 V and comparing their calibration slopes.

6.2.5 Tungsten Chronoamperometric Determination Procedure

The ALP/SPCEs biosensors were placed in the electrochemical cell containing 5 mL of Tris-HCl buffer solution, pH 8. An adequate potential was applied and, once a steady-state current was set, a defined amount of 2-phospho-L-ascorbic acid trisodium salt 10 mM stock solutions was added to the measuring cell. A large anodic current was observed due to the addition of 2-phospho-L-ascorbic acid trisodium salt. Then, once a plateau corresponding to the steady-state response was reached again, 50 μL aliquots of the tungsten stock solution were added consecutively. The addition of each aliquot resulted in a current decrease proportional to the amount of the metal added. Enzyme electrodes were conditioned in a buffer solution for 5 min between each calibration setting.

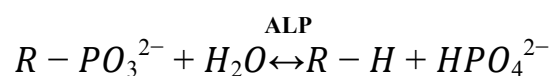
6.2.6 Validation

Several calibration curves with the same and different electrodes were used to evaluate the figures of merit. To establish the accuracy, reliability, and reproducibility of the collected data, all tests were recorded in triplicate and only average values are reported. Blank tests were run in parallel. All the lab ware used in the study was previously soaked in Alconox, rinsed with distilled water, and finally with ultrapure water from TKA and allowed to dry at room temperature.

6.3 Results and Discussion

To develop the alkaline phosphatase biosensor, initially two substrates were used, *p*-nitrophenyl phosphate, and 2-phospho-L-ascorbic acid trisodium salt,

because in previous papers we reported its use to determine V(V) and As(V) [15, 24]. Based on different experimental results, we decided to work with 2-phospho-L-ascorbic acid trisodium salt, which had been tested only with acid phosphatase, but not with the alkaline enzyme. To the best of authors' knowledge, the determination of tungsten using biosensors based on the inhibitory effect of this metal over ALP have not been described up to now. The alkaline phosphatase ALP biosensor is based on the following reaction:



where $R-PO_3^{2-}$ is the organic phosphate substrate and HPO_4^{2-} the monohydrophosphate. When *p*-nitrophenyl phosphate is used as substrate, the product RH is *p*-nitrophenol and when 2-phospho-L-ascorbic acid is used as substrate, the product R-H is L-ascorbic acid. Therefore, in the presence of alkaline phosphatase, the reaction induces to a change in the pH and in conductivity [25].

It is well-known that chronoamperometric measurements are influenced by different factors such as pH of the medium, the applied potential, the substrate concentration, and also ionic strength among others, depending on the studied system.

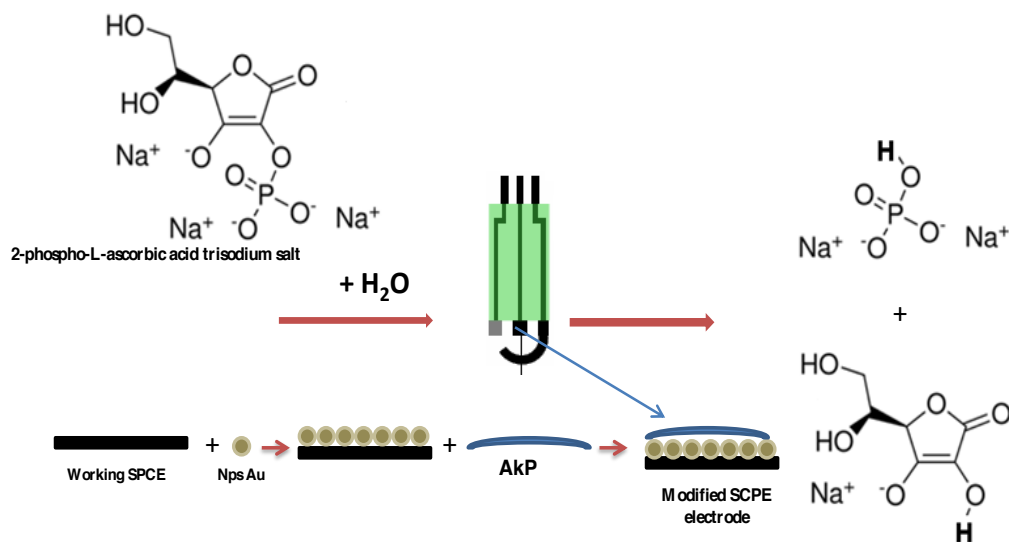


Figure 6.1. 2-phospho-L-ascorbic acid trisodium salt reaction with ALP biosensor, giving as products disodium phosphate and 2-phospho-L-ascorbic acid monosodium salt.

6.3.1 Optimizing conditions

Based on the optimization process to obtain the best current signals, described in section 6.2.6, the optimized parameters are summarized in figure 6.2 and Table 6.1, which were used in tungsten determination: supporting electrolyte pH 8.0, working potential of + 0.20 V vs. Ag/AgCl, a substrate concentration of 0.32 mM and Cl⁻ concentration of 0.36 M. Easily quantifiable chronoamperometric signals are registered under these optimized conditions for tungsten.

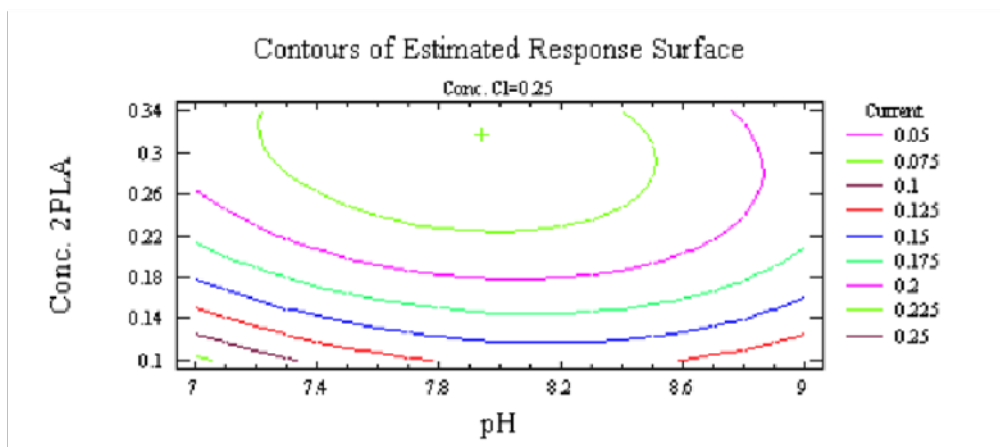


Figure 6. 2. Contours of estimated response surface for ALP and 2-PLAs at $[Cl^-] = 0.25$ M. The central green point in the center of the circle is considered the optimum values for experimental variables: pH 8.0 Tris HCl buffer, 2-PLAs trisodium salt 0.32 mM, $[Cl^-] = 0.36$ M.

Table 6. 1 Values corresponding to high (+) and low (-) levels for each factor, used to optimize experimental conditions for tungsten detection.

Conditions	Low Level	High Level	Optimum
pH supporting electrolyte	6.3	9.7	8.0
Substrate concentration	0.036 m M	0.38 m M	0.32 m M
Ionic strength	0.10 M	0.50 M	0.36 M
Working potential	+ 0.1 V vs. Ag/AgCl	+ 1.0 V vs. Ag/AgCl	0.20 V

Once the conditions were set up, we compared calibration curve slopes at various applied potentials and as it can be seen in figure 6.3, as lower the applied potential, higher the slopes, so the sensitivity of the biosensor. Thus, + 0.20 V was the best potential choose for the experiments.

To analyse the signals with the immobilized enzyme, control experiments were carried out under the optimum conditions using bare SPCEs and AuNPs-SPCEs but without the enzyme. No analytical signal was obtained; hence the inhibition response registered after the addition of the substrate is only related to tungsten concentration.

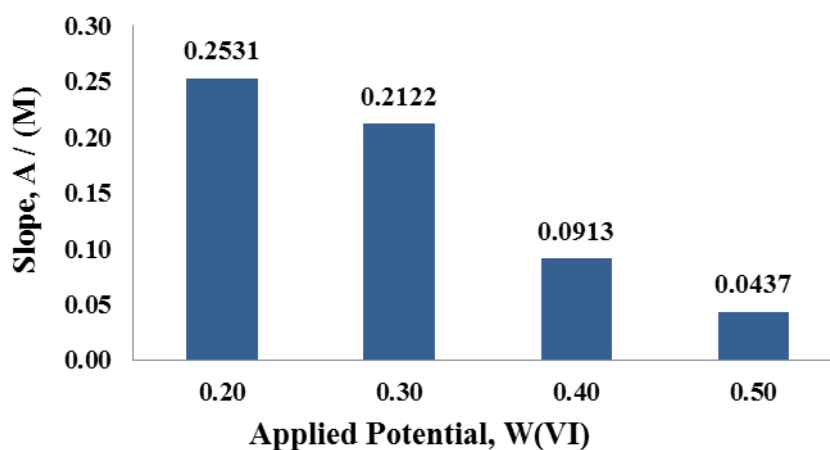


Figure 6.3. Slope variation with applied potential, from different calibration curves for W(VI), at pH = 8.0, [Cl⁻] = 0.36 M and [substrate] = 0.32 mM.

Consequently, tungsten can be determined by its inhibitory effect on the response of ALP to 2-PLAs, by calibration curves using different substrate concentration in cell as it is shown in Figure 6.4.

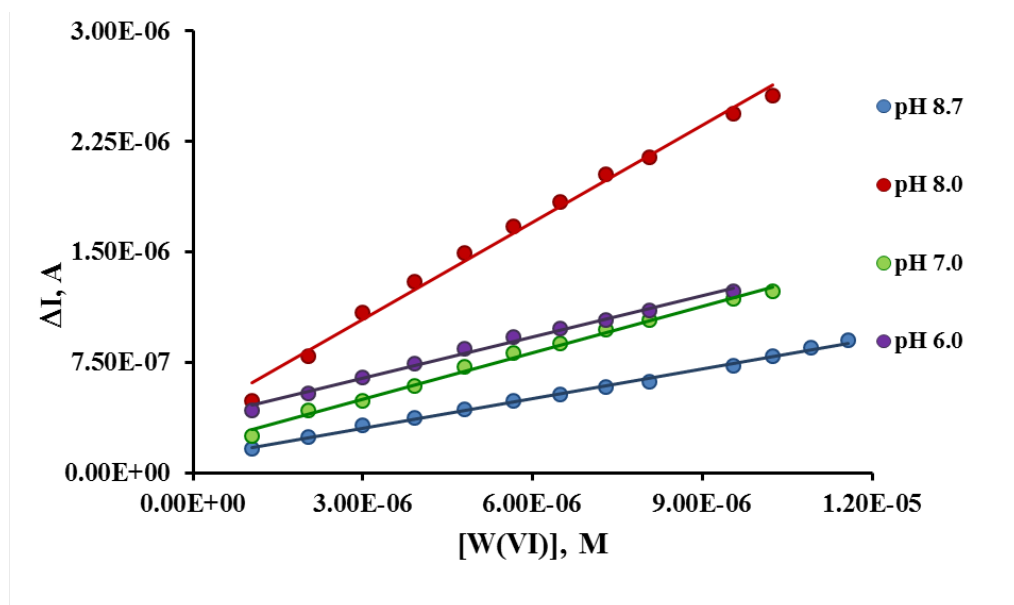


Figure 6.4. Calibration for W(VI) at different supporting electrolyte pH, it was chosen the highest slope at pH = 8.0 and $E_{ap} = + 0.20$ V vs. Ag/AgCl and [substrate] = 0.32 mM.

To evaluate the optimized pH, as it can be seen in figure 6.4, they were run several calibrations at different pH values, the highest slope was obtained at pH 8.0, so this was chosen as working pH.

To prove the best conditions, different substrate additions were added to compare the sensitivity of the biosensor. Figure 6.5 shows slopes of calibration curves, being the best at lower concentration, addition of 100 uL of 2-PLAs 10 mM, the quantity chosen.

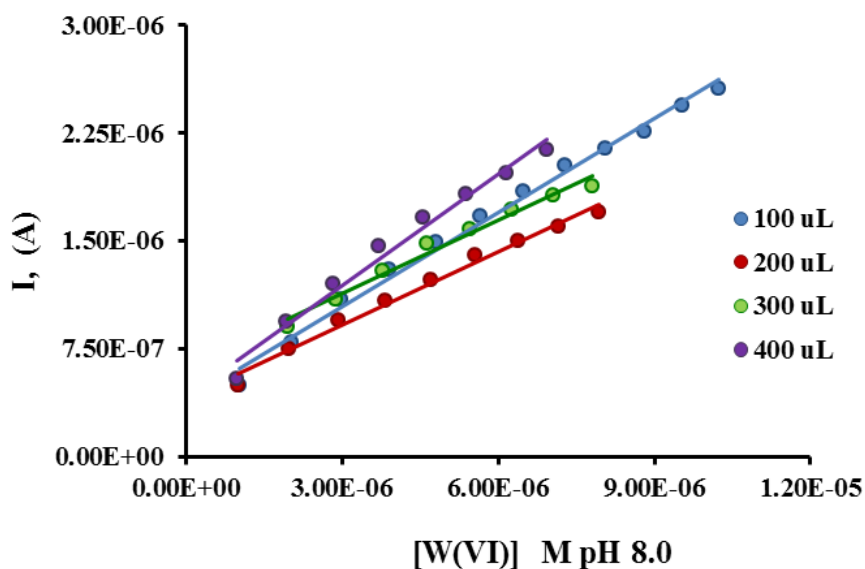


Figure 6.5. Calibrations for W(VI) with different volumes added of 2-PLAs 10,0 mM as a substrate, pH= 8.0 and $E_{ap} = +0.20$ V and $[Cl^-] = 0.36$ M.

Once all the experimental conditions were proved, a chronoamperogram was obtained for ALP biosensor, as it is shown in figure 6.6. A base line represents the current of the Tris HCl buffer signal, the first current step is due to substrate addition, and the rest, 1 to 12, resembles consecutive additions of aliquots of W(VI) standard. The inset figure is the calibration curve of this chronoamperogram, experimental conditions are indicated in the graph.

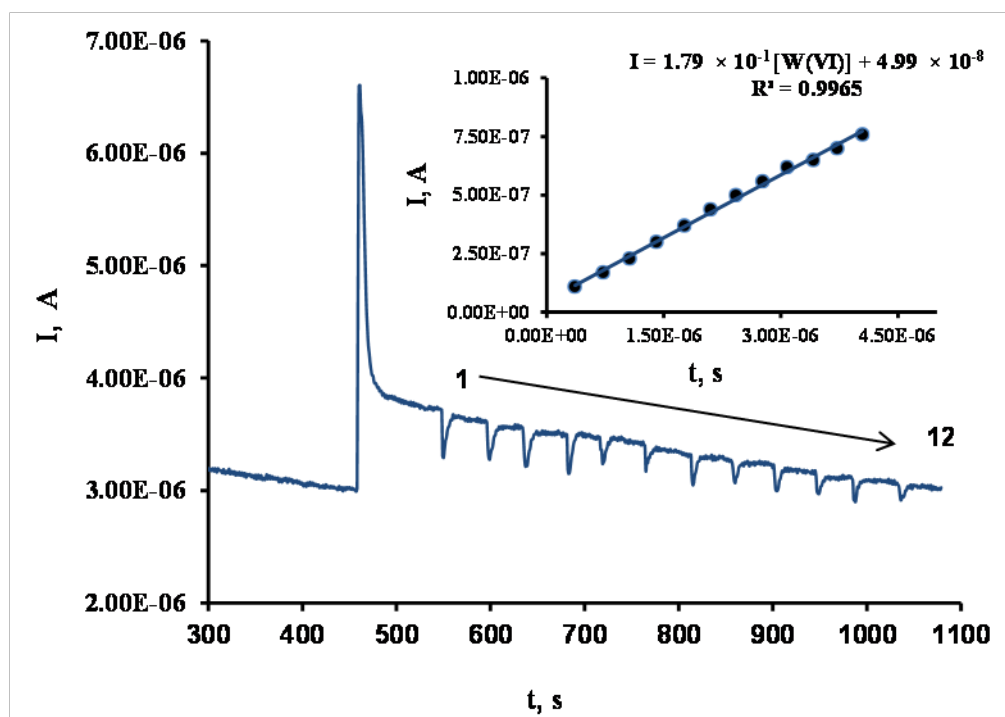


Figure 6.6. Chronoamperogram registered using an ALP-based biosensor under the optimum conditions (applied potential, + 0.20 V vs. Ag/AgCl SPCE; supporting electrolyte pH 8.0 (Tris HCl buffer, 0.36 M total Cl⁻) and 2-PLAs 0.32 mM, in the W(VI) concentration range from 3.0 μ M to 30.0 μ M. Inset figure, a calibration curve for twelve aliquot W(VI) additions under optimum conditions.

6.3.2 Inhibitory Effect of W(VI) Over the ALP Enzyme

The inhibitory effect of W in the enzymatic activity, when using 2-PLAs as a substrate, was studied by means of kinetic parameters of the Lineweaver-Burk plot. The y -intercept of this graph is equivalent to the inverse of V_{max} , the x -intercept of the plot represents $-1/K_m$ (K_m is the Michaelis-Menten constant and V_{max} is the maximum reaction velocity). It also gives a quick, visual impression of the different forms of enzyme inhibition, both in absence and presence of tungsten. This study was performed under different ionic strength, according to values of K_m and slopes, suggesting a mixed inhibition [26, 27]. In fact, the inhibitory effect of tungsten on the ALP/2-PLAs reaction was confirmed through the higher affinity of ALP for the

substrate in the absence of this metal.

As it can be seen from Table 6.2 and Figure 6.7, slopes and K_m apparent increases directly with the concentration of W(VI) as inhibitor. In addition, Figure 6.8 and Table 6.3 show that K_m apparent increases directly with ionic strength, so it was decided to use ionic strength of 0.36 M KCl, because the change in current when adding the substrate was higher at this concentration.

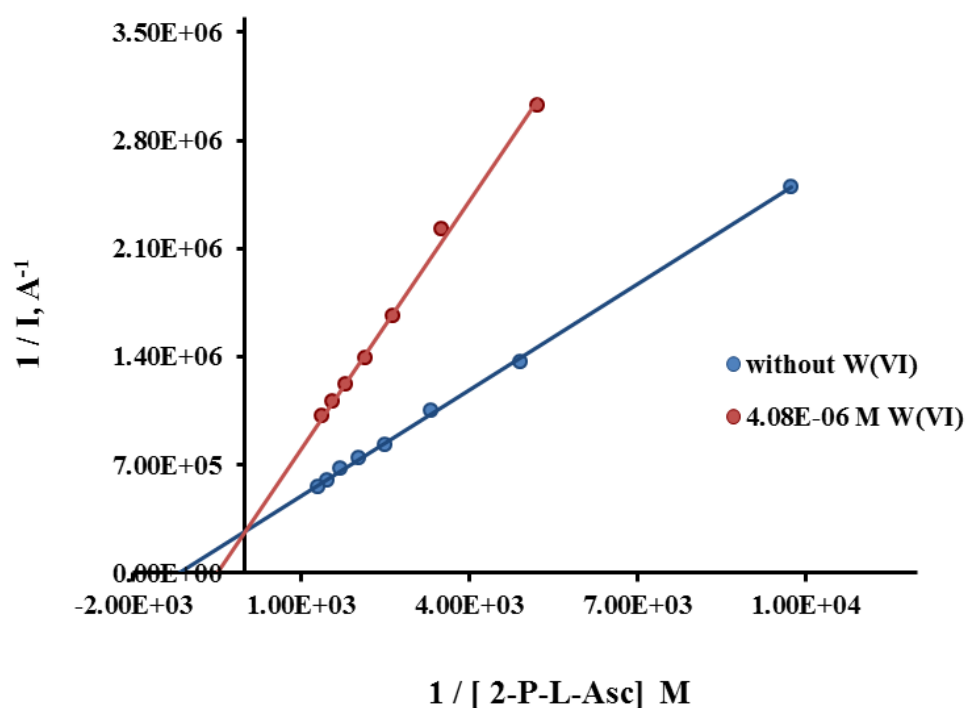


Figure 6.7. Lineweaver-Burk double reciprocal plot in presence and absence of W(VI) as inhibitor.

Table 6. 2. Michaelis-Menten apparent constant values at different W(VI) concentration.

Conditions	Slope	
W(VI) M	Km/Vm	Km
0	228.37	8.4×10^{-4}
3.08×10^{-6}	281.96	1.8×10^{-3}
4.08×10^{-6}	534.52	2.0×10^{-3}

Table 6. 3 Michaelis-Menten apparent constant values at different KCl concentration

Conditions	[W(VI)] M	Slope Km/Vm	Km
0.10 M KCl	0	387.47	4.3×10^{-4}
0.10 M KCl	$1,1 \times 10^{-6}$	278.19	7.5×10^{-4}
0.25 M KCl	$1,1 \times 10^{-6}$	412.65	1.7×10^{-3}
0.50 M KCl	$1,1 \times 10^{-6}$	607.95	3.5×10^{-3}

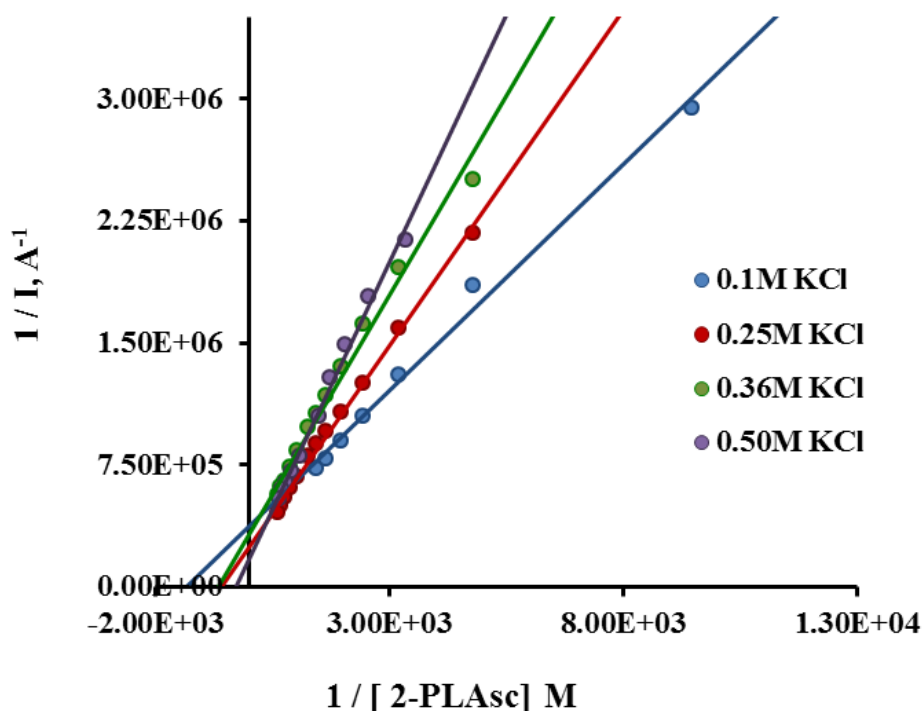


Figure 6. 8. Lineweaver-Burk double reciprocal plot in presence of W(VI) as inhibitor and at different ionic strength, pH = 8.0, $E_{ap} = + 0.20$ V vs Ag/AgCl,

6.3.3 Characterization of ALP Biosensor Performance

To characterize an analytical method, it is important to establish its figures of merit, such as precision in terms of reproducibility and repeatability. The first one was calculated taking into account calibration curves registered using different biosensors (inter-biosensors), and the second one with one single biosensor (intra-biosensor). In this way, several calibration curves were performed in the range of concentration from $0.6 \mu\text{M}$ to $10 \mu\text{M}$ at optimum conditions of the experimental variables. Both figures of merit were calculated by the relative standard deviation (RSD) of the slopes from different calibration curves. The reproducibility associated to slopes of these calibration curves in terms of RSD was 5.2 % ($n = 3$). Determination of the repeatability was performed similarly using a single ALP based SPCE, which kept 83% of its initial sensibility after the third calibration curve, obtaining a value of 6.4 % ($n = 3$) in terms of RSD.

The table 6.4 shows the validated parameters of the calibration curves registered using different biosensors and one biosensor respectively.

Table 6.4. Precision parameters obtained through ordinary least square (OLS) regression for W(VI) using one or different ALP modified SPCEs under optimum conditions.

Repeatability			Reproducibility		
Electrode	Slope, A/M	R ²	Electrode	Slope, A/M	R ²
1	0.1009	0.992	2	0.07499	0.997
1	0.1144	0.992	3	0.08516	0.995
1	0.1058	0.992	4	0.08148	0.997
Media	0.1070			0.08054	
Std. Dev.	0.0068			0.0042	
RSD %	6.4			5.2	

The detection of tungsten through the inhibition of ALP/2-PLAs reaction was determined (calibration range from 0.60 μM to 10.0 μM). In this way, the limit of detection based on the standard deviation ($3S_{y/x}/m$) in triplicate of the calibration curve was $0.29 \pm 0.01 \mu\text{M}$, and the limit of quantification was $0.96 \pm 0.03 \mu\text{M}$. The performance of the developed procedure was checked by its accuracy and reliability.

Table 6.5. Limits of detection and quantification of W(VI) with ALP biosensor under optimum conditions.

Slope A*M⁻¹	Intercept A	Error S_{y/x}	R²	LOD 3σ, M	LOQ 10σ, M
0.0949	8.50×10^{-8}	9.4×10^{-9}	0.9917	3.0×10^{-7}	9.9×10^{-7}
0.2122	6.18×10^{-8}	2.0×10^{-8}	0.9937	2.9×10^{-7}	9.5×10^{-7}
0.1340	2.34×10^{-8}	1.3×10^{-8}	0.9985	2.8×10^{-7}	9.4×10^{-7}
			Media	2.9×10^{-7}	9.6×10^{-7}
			Std. Dev.	8.1×10^{-9}	2.7×10^{-8}
			RSD %	2.8	2.8

The accuracy of the proposed method was evaluated by means of the analysis of a tungsten certified sample (High Purity Standards SRM, $1000 \pm 4 \text{ mg L}^{-1}$ of W(VI)), and then the biosensor was used to analyse enriched blanks with the same SRM, recovering $991 \pm 68\%$ with RSD = 7%. (Table 6.6).

Finally, the developed procedure was applied to the determination of tungsten spiked tap water enriched with High-Purity Standards traceable to NIST-SRM 3163, with an average recovery of (101.3 %, RSD = 8.6 %). Other samples such as purified laboratory water from a TKA System and bottled drinking water, were also enriched with the SRM standard, and the obtained recoveries were $99.1 \% \pm 2.9 \%$ and $99.1\% \pm 5.2\%$ respectively ($n = 4$).

Table 6.6. Evaluation of accuracy by analyzing a SRM High Purity Standard traceable to NIST- SRM 3163 ($1000 \pm 4 \text{ mg L}^{-1}$ of W(VI)) in spiked blanks under optimum conditions.

[W(VI)] M Added	[W(VI)] M Founded	[W(VI)] mg/L	[W(VI)] mg/L D.F. 25/1	[W(VI)] mg/L D.F. 100/10	[W(VI)] mg/L D.F. 100/10
	2.16×10^{-6}	0.398	10.2	102.4	1024
2.11×10^{-6}	2.15×10^{-6}	0.396	10.2	102.0	1020
	2.18×10^{-6}	0.401	10.3	103.2	1032
	1.88×10^{-6}	0.346	8.90	890	890
				Media	991
				Std.Dev.	68
				RSD %	7

Table 6.7 Recovery of spiked tap water samples with ALP biosensor optimum conditions.

Found in				
Spiked water [W] M	Water blank [W] M	[W] in water M	[W] added M	Recovery %
1.52×10^{-6}	5.38×10^{-7}	9.85×10^{-7}	1.03×10^{-6}	95.3
1.61×10^{-6}	6.22×10^{-7}	9.90×10^{-7}	1.03×10^{-6}	95.7
1.60×10^{-6}	5.58×10^{-7}	1.04×10^{-6}	1.03×10^{-6}	100.3
1.93×10^{-6}	7.50×10^{-7}	1.18×10^{-6}	1.03×10^{-6}	113.8
			Media	101.3
			Std. Dev	8.6
			RSD %	8.5

6.4 Interferences

We also studied the effect of different cations at four different concentrations (1.0 μM , 10 μM , 0.1 mM and 1 mM) on the inhibition current of ALP under biosensor-optimized conditions. Their effect was analysed by measuring the inhibition current after consecutive additions of standard solutions of each metal. Figure 6.9 shows that at μM level, W(VI) produces the highest inhibition current compared to other cations at the same concentration. Nevertheless, Figure 6.10 represents the inhibition of possible interferences, could be present in natural waters such as Ca(II), Al(III), Mg(II) and Fe(III), but also other metals as Se(IV), As(V) and Sn(II). These elements and Fe(III) are major interferences at concentrations higher than 1.0 μM , however if they are presenting water at higher concentrations than W(VI), they must be considered in the analysis of tungsten. That is a limiting aspect of this method but we can say that in some cases, many potential interfering cations tend not to exist in many real samples, only Fe(III) should be a problem. In cases where there could be treated with a sample previously precipitant, for example in a basic medium, while other cations are as hydroxides, the W would be as a tungstate. That is to use chemical means of precipitation and complexation to eliminate or decrease the concentration of such interferences. We can say that in view of the good results obtained in spiked real water samples, these interferences does not seem to be a problem.

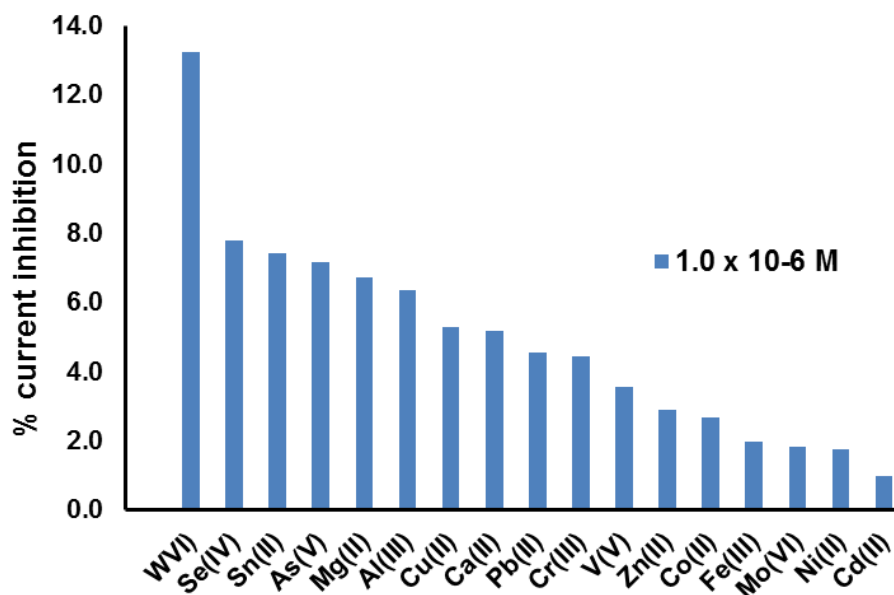


Figure 6.9. Current inhibition % from several cations at 10^{-6} M, for ALP biosensor Tris HCl buffer pH 8.0, 0.36 M KCl; 0.20 V; 0.32 mM; 2-P-L-Asc as a substrate.

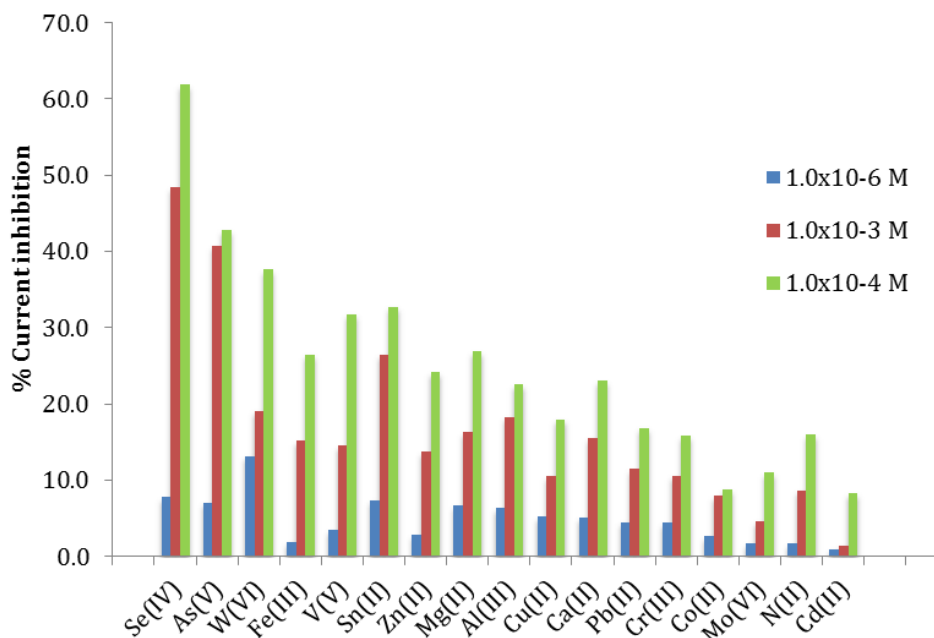


Figure 6. 10. Current inhibition % from several cations at different concentrations, for ALP biosensor, Tris HCl buffer pH 8.0, 0.36 M KCl, $E_{ap} = + 0.20$ V vs. Ag/AgCl, 0.32 mM 2-PLAs as a substrate.

6.5 Conclusions

The use of ALP based biosensors using AuNPs/SPCEs with 2-PLAsc allows the selective chronoamperometric determination of tungsten. This developed biosensor offers feasibility of use and rapid preparation, low cost and good performance. The figures of merit of the biosensor are adequate to determine tungsten, with a low limit of detection, linear range between 0.6 μM and 10 μM , and repeatability and reproducibility lower than 10%. There are few interferences at a low concentration of 1.0 μM , nevertheless metals such as Se(IV), As(V), Sn(II), Al(III), and Fe(III) at other concentrations must be taken into consideration in the analysis of tungsten. The effect of tungsten in the ALP/2-PLAs reaction results in a mixed inhibition, which allows the quantitation of tungsten in tap water. The developed procedure shows a limit of detection of $(0.29 \pm 0.01) \mu\text{M}$, and quantitation limit of $(0.96 \pm 0.03) \mu\text{M}$. The reproducibility and repeatability values of RSD for the slopes of several calibrations are lower than 10%. The proposed method can be applicable to different water samples.

6.6 References

1. Koutsospyros, A., Braida, W., Christodoulatos, C., Dermatas, D., Strigul, N. (2006). A review of tungsten: From environmental obscurity to scrutiny. *J. Hazard. Mater.* 136, 1–19.
2. El-Shahawi, M.S., Al Khateeb, L.A. (2012). Spectrofluorometric determination and chemical speciation of trace concentrations of tungsten species in water using the ion pairing reagent procaine hydrochloride. *Talanta*, 88, 587–592.
3. Piech, R., Bugajna, A.; Baś, S., Kubiak, W.W. (2010). Ultrasensitive determination of tungsten (VI) on picomolar level in voltammetric catalytic adsorptive catechol-chlorate(V) system. *J. Electroanal. Chem.* 644, 74–79.
4. Seiler, R.L., Stollenwerk, K.G., Garbarino, R. (2005). Factors controlling tungsten concentrations in ground water, Carson Desert, Nevada. *Appl. Geochem.* 20, 423–441.

5. Tajima, Y. (2003). The effects of tungstophosphate and tungstosilicate on various stress promoters transformants of *Escherichia Coli*. *J. Inorg. Biochem.* *94*, 155–160.
6. Strigul, N. (2010). Does speciation matter for tungsten ecotoxicology? *Ecotox. Environ. Safe.* *73*, 1099–1113.
7. Zarei, K., Atabati, M., Shoari, R. (2010). Catalytic adsorptive stripping voltammetry determination of ultra trace amount of tungsten using factorial design for optimization. *J. Anal. Chem.* *65*, 518–524.
8. Strigul, N., Koutsospyros, A., Christodoulatos, C. (2010). Tungsten speciation and toxicity: Acute toxicity of mono- and poly-tungstates to fish. *Ecotox. Environ. Safe.* *73*, 164–171.
9. Ünal, Ü., Somer, G. (2012). A new and very simple procedure for the differential pulse polarographic determination of ultra-trace quantities of tungsten using catalytic hydrogen wave and application to tobacco sample. *J. Electroanal. Chem.* *687*, 64–70.
10. Johannesson, K., Dave, H.B., Mohajerin, T.J., Datta, S. (2013). Controls on tungsten concentrations in groundwater flow systems: the role of adsorption, aquifer sediment Fe(III) oxide/oxyhydroxide content, and thio-tungstate formation. *Chem. Geol.* *351*, 76–94.
11. Lubal, P., Koprivova, H., Sedo, O., Havel, J., Lis, S., But, S. (2006). Simultaneous determination of molybdenum(VI) and tungsten(VI) and its application in elemental analysis of polyoxometalates. *Talanta*, *69*, 800–806.
12. Sarma, A.K., Vatsyayan, P., Goswami, P., Minter, S.D. (2009). Recent advances in material science for developing enzyme electrodes. *Biosens. Bioelectron.* *24*, 2313–2322.
13. Dzyadevych, S.V.; Arkhypova, V.N.; Soldatkin, A.P.; El'skaya, A.V.; Martelet, C.; Jaffrezic-Renault, N. (2008). Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. *IRBM*, *29*, 171–180.
14. Van Etten, R.L.; Waymack, P.P.; Rehkop, D.M. (1974). Transition metal ion inhibition of enzyme-catalyzed phosphate ester displacement reactions. *J. Am. Chem. Soc.* *96*, 6782–6785.
15. Alvarado-Gómez, A.L. Alonso-Lomillo, M.A., Domínguez-Renedo, O.,

- Arcos-Martínez, M.J. (2014). A disposable alkaline phosphatase-based biosensor for vanadium chronoamperometric determination. *Sensors*, *14*, 3756–3767.
16. Alvarado-Gómez, A.L., Alonso-Lomillo, M.A., Domínguez-Renedo, O., Arcos-Martínez, M.J. (2013). Vanadium determination in water using alkaline phosphatase based screen-printed carbon electrodes modified with gold nanoparticles. *J. Electroanal. Chem.* *693*, 51–55.
17. Domínguez-Renedo, O., Alonso-Lomillo, M.A., Arcos-Martínez, M.J. (2007). Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta*, *73*, 202–219.
18. Ravalli A., dos Santos Pilon, G., Ferroni, M., Faglia, G., Yamanaka, H., Marrazza, G. (2013). New label free CA125 detection based on gold nanostructured screen-printed electrode. *Sensor. Actuator. B-Chem.* *179*, 194–200.
19. Mena, M.L., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M. (2005). A comparison of different strategies for the construction of amperometric biosensors using gold nanoparticle-modified electrodes. *Anal. Biochem.* *336*, 20–27.
20. Domínguez Renedo, O., Arcos Martínez, M.J. (2007). Anodic stripping voltammetry of antimony using gold nanoparticle-modified carbon screen-printed electrodes. *Anal. Chim. Acta*, *589*, 255–260.
21. Gonzalo-Ruiz, J., Alonso-Lomillo, M.A., Muñoz, F.J. (2007). Screen-printed biosensors for glucose determination in grape juice. *Biosens. Bioelectron.* *22*, 1517–1521.
22. Del Torno-de Román, L.; Alonso-Lomillo, M.A.; Domínguez-Renedo, O.; Arcos-Martínez, M.J. (2013). Gluconic acid determination in wine by electrochemical biosensing. *Sensor. Actuator. B-Chem.* *176*, 858–862.
23. Box, G.P.E., Hunter, J.S., Hunter, W.G. (2005). *Statistics for Investigators: Design, Innovation and Discovery*, (2nd ed., pp. 173–186). Hoboken, NJ: John Wiley and Sons Inc.
24. Sanllorenzo-Méndez, S., Domínguez-Renedo, O., Arcos-Martínez, M.J. (2012). Development of acid phosphatase based amperometric biosensors for the inhibitive determination of As(V). *Talanta*, *93*, 301–306.

25. Berezhetsky, A.L., Sosovska, O.F., Durrieu, C., Chovelon, J.M., Dzyadevych, S.V., Tran-Minh, C. (2008). Alkaline phosphatase conductometric biosensor for heavy-metal ions determination. *IRBM* 29, 136–140.
26. Walsh, R., Martin, E., Darvesh, S. (2007). A versatile equation to describe reversible enzyme inhibition and activation kinetics: Modeling β -galactosidase and butyrylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1770, 733–746.
27. Stoytcheva, M., Sharkova, V. (2002). Kinetics of the inhibition of immobilized acetylcholinesterase with Hg(II). *Electroanalysis*, 14, 1007–1010.

***7. Modified Laccase-Gold Nanoparticles
Tetrathiafulvalene SPCES Based Biosensor to
Determine W(VI) in Water***

Como se indica en la sección anterior se hace necesario determinar el contenido de metales poco comunes en diferentes tipos de aguas, naturales, potables, embotelladas etc. con el fin de determinar si se alcanzan niveles tóxicos para la salud o el medio ambiente.

Este apartado describe la preparación y optimización de otro dispositivo desechable, basado en los SPCEs con la diferencia de que tiene un mediador electroquímico que permite detectar y cuantificar tungsteno en aguas. (Secciones 7.2. y 7.3). Se utilizaron como base los SPCEs con un mediador redox incorporado en el electrodo de trabajo, el tetratiofulvaleno TTF, además se modificaron dichos SPCEs con AuNPs, MWCNT y SAMs. Se inmovilizó la enzima lacasa con BSA y GA, sobre el electrodo modificado y se determinó amperométricamente su actividad e inhibición, utilizando el catecol como sustrato. Se compararon los resultados de repetibilidad, reproducibilidad y límite de detección y cuantificación entre los tipos de electrodos modificados y se escogió el mejor dispositivo, LAC/AuNPs/SPC_{TTF}Es para evaluar su desempeño en muestras de agua.

En la literatura no se encuentra descrito hasta el momento ningún dispositivo de estas características que permita dicha determinación utilizando la enzima lacasa.

Este trabajo está en proceso de publicación, y se presentó como poster en la 4th. Conference of Bio-Sensing and Technology, en Lisboa entre el 10 y el 13 de mayo de 2015.

7.1 Introduction

Tungsten is a transition metal, found along with chromium, molybdenum and seaborgium, in Group VIB of the periodic system [1]. It is a valuable metal because of its great strength at high temperatures and its high electric and heat conductivity. Tungsten and its alloys have been used for many years in a wide range of applications from daily household necessities to highly specialized components of modern science and technology, such as heating elements for furnaces, filaments for electric lamps, spacecraft shielding, drill tips, edging of cutting tools, medical equipment and small bore ammunition [1].

Tungsten in its metal form is not present in nature; rather, the tungstate anion persists and is thermodynamically stable under most environmental conditions. Polymerization of tungstate with itself and other common oxyanions (e.g. molybdate, phosphate, and silicate) can create a variety of polymer species [2].

Tungsten's release into environmental systems may occur as a result of natural or anthropogenic activities [3]. Natural deposits of tungsten ore can release soluble and mobile tungstate into groundwater. Additionally, there is increasing interest in some anthropogenic uses of tungsten, which could become sources in the environment, including industrial, civilian recreational, and military applications [1, 3-6].

Although there have been several studies of the behavior and effects of tungsten in laboratory animals, little attention has been given to the problem of developing a biologically realistic model of the kinetics of tungsten in the human body [7]. Some tungsten compounds, which exert adverse biological effects on humans and animals, had been reported, nevertheless effects of tungsten on environmental systems have not been investigated extensively and published data are fragmentary [3, 8].

In Fallon, Nevada, the childhood leukemia cluster which affected this zone, supposed an investigation by the United States Centers for Disease Control and Prevention (CDC), that revealed through urine analysis that residents were exposed to elevated levels of W(VI) [9]. While it is inherently difficult to directly link these childhood leukemia clusters to environmental exposure to elevated tungsten concentrations, either via inhalation or through consumption of tungsten contaminated drinking waters, many studies have shown that this metal can be toxic and may indeed be carcinogenic [7, 10]. This investigation led to a study by the U.S. Geological Survey of tungsten in ground waters of the Carson Desert region of northwest Nevada, which showed concentrations of this metal ranging from $0.27 \mu\text{g kg}^{-1}$ – $742 \mu\text{g kg}^{-1}$ [4, 9, 10].

Several methods to determine tungsten in water and other environmental samples have been published; among them are spectrophotometry [11], flame atomic absorption spectrometry (AAS) [12], inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) [13], inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) [14], X-ray fluorescence (XRF) [15], spectrofluorometry [16], polarography [17], voltammetry [8] and amperometry [18]. The sensitivity for tungsten by some of these techniques was lower than the necessary to analyze the low tungsten concentration present in water.

Among electroanalytical techniques, the chronoamperometry is getting more significance in the development of amperometric biosensors, based on enzyme immobilization onto electrode that can retain their bioactivity and is one of the main issues in several fields ranging from environmental analysis to clinical diagnosis [19]. In the specific case of laccase-based biosensors, an extensive research effort has been addressed to incorporate laccase on electrode surfaces by different immobilization strategies in order to design biosensors with a wide range of applications. Many references show that its retained bioactivity majorly depends on the chosen immobilization method [20-24].

Chemically modified electrodes (CMEs) represent a modern approach to electrodic systems. Thus a proper alteration of electrode surfaces, can acquire

characteristics to solve many electroanalytical problems, and may be the basis for a new device with better electrochemical characteristics. Since the early 2000s, the use of nanomaterials has improved electroanalytical properties of enzyme biosensors. The advantages of using these nanoscale materials such as metallic nanoparticles, self assembled monolayers (SAMs) or single SWCNTs and multiple wall carbon nanotubes MWCNTs are a better electrocatalytic capacity, increasing conductivity, biocompatibility and easy electron transfer between the protein and the electrode surface. Furthermore, the electronic properties of these materials have been used as a means of promoting electron transfer reactions for a wide range of biological molecules and species. Also they improve the immobilization of biomolecules retaining its bioactivity and impart resistance against surface fouling [24-32].

The use of tetrathiafulvalene (TTF) as a mediator and the fact to be screen-printed, is based in its non-solubility in water, so it can avoid risks of dissolution when working in aqueous solutions. Besides, it is oxidized losing one electron at + 0.34 V, and a second electron at + 0.78 V vs. Ag / AgCl in acetonitrile solution [33]. Thus, TTF based SPCEs have been built by screen-printed of a mixture of mediator and carbon ink. Then gold nanoparticles have been deposited and laccase enzyme have been cross-linked to TTF modified SPCEs (SPC_{TTF} Es) with glutaraldehyde (GA) and bovine serum albumin (BSA) to obtain a biosensor for tungsten detection [34-36]. Figure 7.1 represents the redox reaction of tetrathiafulvalene losing the first electron, and then the second electron.

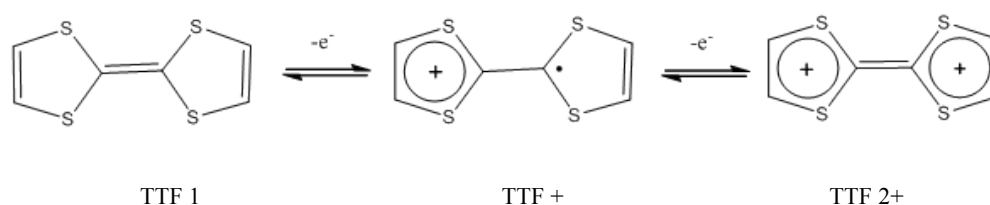


Figure 7.1 TTF redox reaction scheme [33].

The purpose of this work is to obtain a sensitive biosensor for the quantitative determination of W(VI), based in the inhibitor effect of this metal over the enzymatic

oxidation of catechol by laccase enzyme. So far it has not published anything like in the literature.

To achieve this, several laccase SPC_{TTF}Es based biosensors are presented; the effects of gold nanoparticles (AuNPs), multiwalled carbon nanotubes (MWCNT), as well as, the formation of self-assembly monolayers (SAMs) with two different mercaptans such as 1,2-ethanedithiol and 3-mercaptopropionic acid, are also described.

7.2 Experimental

7.2.1 Reagents

Home-made screen-printed electrodes were made-up using different commercial inks: carbon ink (C10903P14, Gwent Electronic Materials, Torfaen, UK), dielectric ink (D2071120D1, Gwent Electronic Materials, Torfaen, UK), Ag/AgCl ink (SS Electrodag 6037, Acheson Colloiden, Scheemda, Netherlands) and Ag ink (Electrodag 418, Acheson Colloiden, Scheemda, Netherlands).

Tetrathiafulvalen TTF was acquired from Acros Organics (Geel, Belgium). Glutaraldehyde GA, bovine serum albumin, BSA, *Rhus vernicifera* laccase enzyme LAC, multiwall carbon nanotubes MWCNT and Nafion solution (resin perfluorinated 5% m/m on aliphatic alcohols of low molecular weight), were obtained from Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO, USA). 1,2-ethanedithiol, 3-mercaptopropionic acid and pyrocatechol from Fluka Analytical, (St. Louis, MO, USA).

Phosphate salts for buffer preparation, Na₂HPO₄ and KH₂PO₄ used as supporting electrolyte were from Merck, (Darmstadt, Alemania), NaOH and H₃PO₄ to adjust pH from J.T. Baker, (Deventer, Netherlands).

Tungsten stock solutions 2 mg L⁻¹ were prepared daily from a 100 mg L⁻¹ ammonium tungstate CertiPUR, traceable to NIST (Merck, Darmstadt, Germany) SRM, and stored at 4 °C when not in use. Tungsten metal purity 99.99 %, 2% v/v

HNO₃ certified value 1000 ± 4 mgL⁻¹ (High-Purity Standards, CRM traceable to NIST SRM against 3163, lot 080331, USA) was used to spike water samples for a recovery study.

All chemical reagents used were analytical grade, without any further purification. All solutions were prepared with ultrapure water from a TKA System, 0.05 µS / cm (Gen-Pure TKA, Niederelbert, Germany).

7.2.2. Apparatus and software

A DEK 248 screen-printing machine (DEK, Weymouth, UK) was used for the preparation of the screen-printed transducers.

Cyclic voltammetric and chronoamperometric measurements were performed with an electrochemical potentiostat Autolab 128N with GPES software (Eco Chemie, Utrecht, Netherlands).

Buffer pH was adjusted with a Mettler-Toledo pHmeter S47-K (Columbus, Ohio, USA).

7.3 Methods

7.3.1 Home-made SPC_{TTF}Es preparation

Depending of the nature and characteristics of the electrodes, they can be easily built by using diverse kinds of inks. In this way, the screen printed electrodic system based on three electrode configuration (working, reference and counter electrode) has been manufactured by sequential layer deposition according to previously described procedures [37-39]. Carbon ink and a well-mixed and immediately printed, carbon ink with TTF (5% w/w) were used to prepare the working electrodes [34-35].

7.3.2 Functionalization of SPC_{TTF}Es with gold nanoparticles (AuNPs)

SPC_{TTF}Es were first modified with gold nanoparticles (AuNPs/SPC_{TTF}Es) using a 0.1 mM HAuCl₄ solution in 0.5 M H₂SO₄. The deposit was made by applying a potential of + 0.18 V vs. Ag / AgCl for 15 s under mechanical agitation [40].

7.3.3 Functionalization of AuNPs/SPC_{TTF}Es) with MWCNT

To modify SPC_{TTF}Es with MWCNT, the nanotubes were dispersed in a nafion 0.5% solution in phosphate buffer pH 6.9 and homogenized in an ultrasonic bath for one hour. Then, 6 μ L of the MWCNT dispersion were drop over AuNPs/SPC_{TTF}Es and let to dry at room temperature at least during three hours. They were ready to immobilize the LAC enzyme.

7.3.4 Functionalization of AuNPs/SPCTTFEs with self-assembled monolayers (SAMs)

SAMs were formed over AuNPs/SPC_{TTF}Es using two different 20 mM mercaptans solutions: 1,2-ethanedithiol and 3-mercaptopropionic acid. AuNPs/SPC_{TTF}Es were immersed into these solutions during different periods of time: 3 h, 6 h, 12 h and 18 h. After that, they were washed with phosphate buffer solution pH 8 and ready to immobilize LAC enzyme as it is described in section 7.3.5.

7.3.5 Immobilization of laccase enzyme on AuNPs/SPC_{TTF}Es

Immobilization was performed by mixing proper amounts of cross-linking GA and BSA with LAC enzyme, to join it to carbon surface of the working electrode, already prepared with TTF mediator and functionalized with gold nanoparticles. The optimum results were achieved by dropping over different functionalized electrodes 10 μ L of a mixture prepared by 5 μ L of LAC (0.11 % w/v), 2.5 μ L BSA (1.75 % w/v) and 2.5 μ L GA (2.5 % w/v) onto modified electrodes and let to dry 120 min at 4°C.

Other way to prepare the biosensors LAC/MWCNT/AuNPs/SPC_{TTF}Es was dropping over the electrode a mixture of 1:1 nafion-MWCNT dispersion and LAC, BSA and GA, and let to dry 120 min at 4°C or until dry. Then LAC/AuNPs/SPC_{TTF}Es, LAC/MWCNT/AuNPs/SPC_{TTF}Es, and LAC/SAMs/AuNPs/SPC_{TTF}Es were storage at 4°C until use. Figure 7.2 represents the three methods of enzyme immobilization.

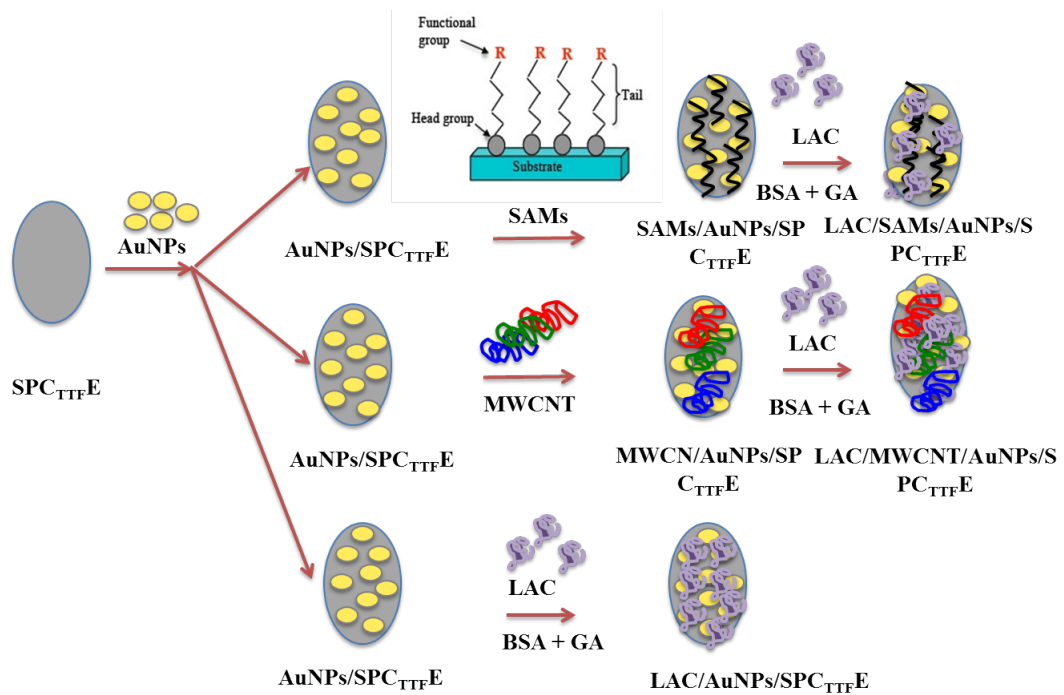


Figure 7. 2. Scheme of the preparation of different biosensors.

7.3.6 Measuring amperometric procedure

Amperometric measurements were carried out at room temperature, placing the modified electrode in a cell containing 5 mL of supporting electrolyte, pH = 6.5 with constant stirring, at an applied potential of + 0.35 V *vs.* Ag/AgCl. Once a stable current was obtained after the addition of substrate or corresponding samples, sequential additions of tungsten standard solutions, were added.

For different prepared biosensors, their performances were evaluated by determining precision, limits of detection and quantitation, accuracy, recovery of spiked samples and possible interferences. Also a kinetic study was carried out.

7.4 Results and Discussion

As it is well known from literature, LAC is a good oxidoreductase enzyme that oxidizes *ortho* and *para* phenol groups to *ortho* and *para* quinones, and reduces oxygen to water [41]. Laccase has not been reported for tungsten determination, but to analyze polyphenols. Nevertheless, previous experiments had shown that tungsten presents inhibition of this enzyme activity to catechol as a substrate; this fact is the base of the biosensor proposed in this work.

Also it was important to prove different biosensors to obtain the best signals, so they were prepared based on LAC/AuNPs/SPCE and LAC/AuNPs/SPC_{TTF}Es. Figure 7.3 presents two chronoamperograms; the blue plot belongs to a biosensor prepared by using SPCEs without TTF and the red one, using SPC_{TTF}Es with TTF as a mediator. It can be noticed that currents using SPCEs are higher than the biosensor based on SPC_{TTF}Es, but it has much less noise. Figure 7.3 is merely illustrative because both electrodes have different characteristics, so they are not comparable.

Since redox potential of electrochemical enzymatic process was high, TTF mediator was incorporated to electrode SPCE, so as to decrease the working potential.

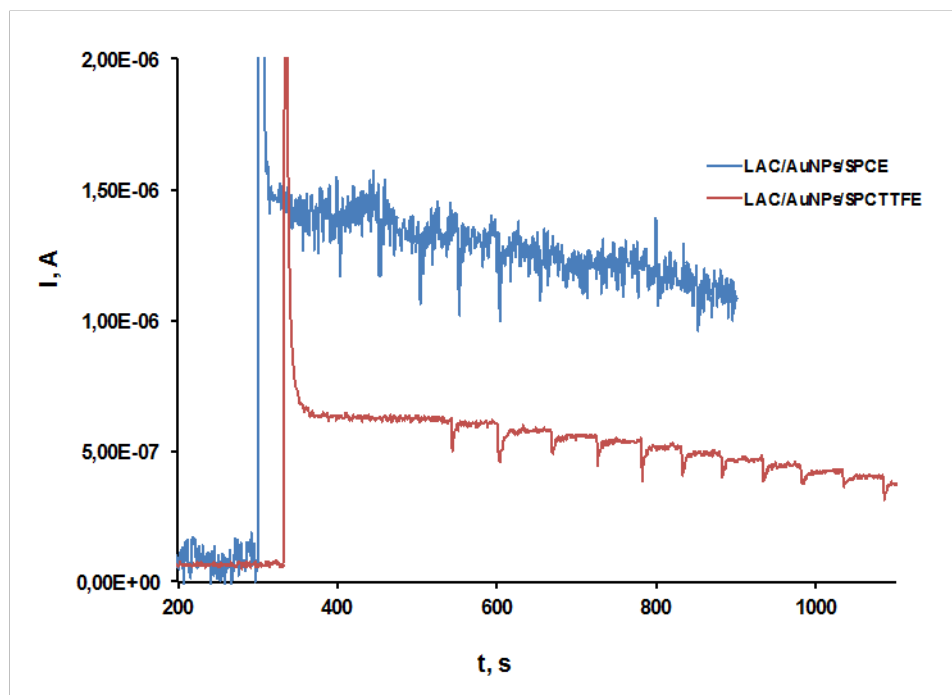


Figure 7. 3. Chronoamperograms for two different biosensors prepared on SPCE and SPC_{TTFE} such as LAC/AuNPs/SPCE as LAC/AuNPs/ SPC_{TTFE} , at $pH = 6.5$ (phosphate buffer) and $E_{ap} + 0.35$ V, 0.04 mM catechol, as a substrate.

The figure 7.4 is a schematic representation of possible redox reactions between TTF in the working electrode SPC_{TTFEs} , laccase and the substrate catechol. Also it can be notice that laccase oxidized catechol to o-quinone and O_2 reduces to H_2O .

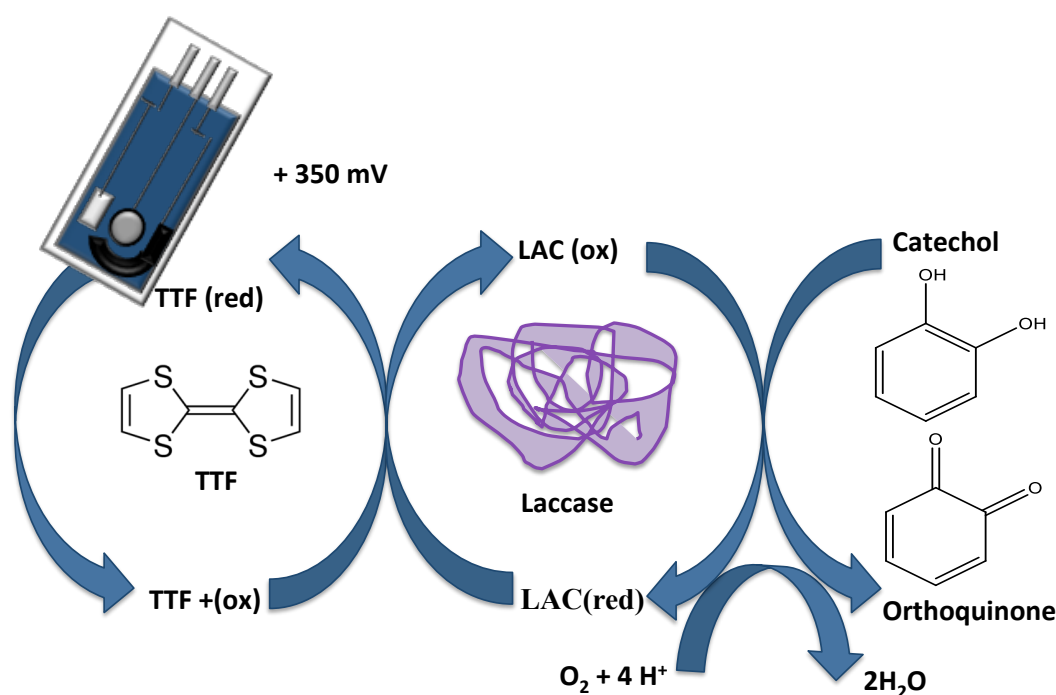


Figure 7.4. Schematic representation of possible mechanism of catechol electrochemical reactions at laccase based biosensor using TTF as a mediator, in the presence of oxygen.

To obtain a sensitive analytical signal, a group of experiments were carried out considering three important factors: applied potential (E_{ap}), pH and catechol concentration, changing one at a time in a selected range, and keeping constant the rest of the parameters. These experiments were done with LAC/AuNPs/SPC_{TTF}Es-based biosensors, because they are the bases for subsequent modifications. There were applied potentials between + 0.10 V and + 0.50 V at a fixed pH; once a potential of + 0.35 V was set, then pH was changed from 5.0 to 9.0, being the best between 6.0 and 7.0, so it was decided to work at pH 6.5. Different catechol solutions were tested ranging from 0.10 mM to 20 mM; the most stable signals were obtained with 0.040 mM catechol in cell. Figure 7.5 presents a typical chronoamperogram under the selected conditions.

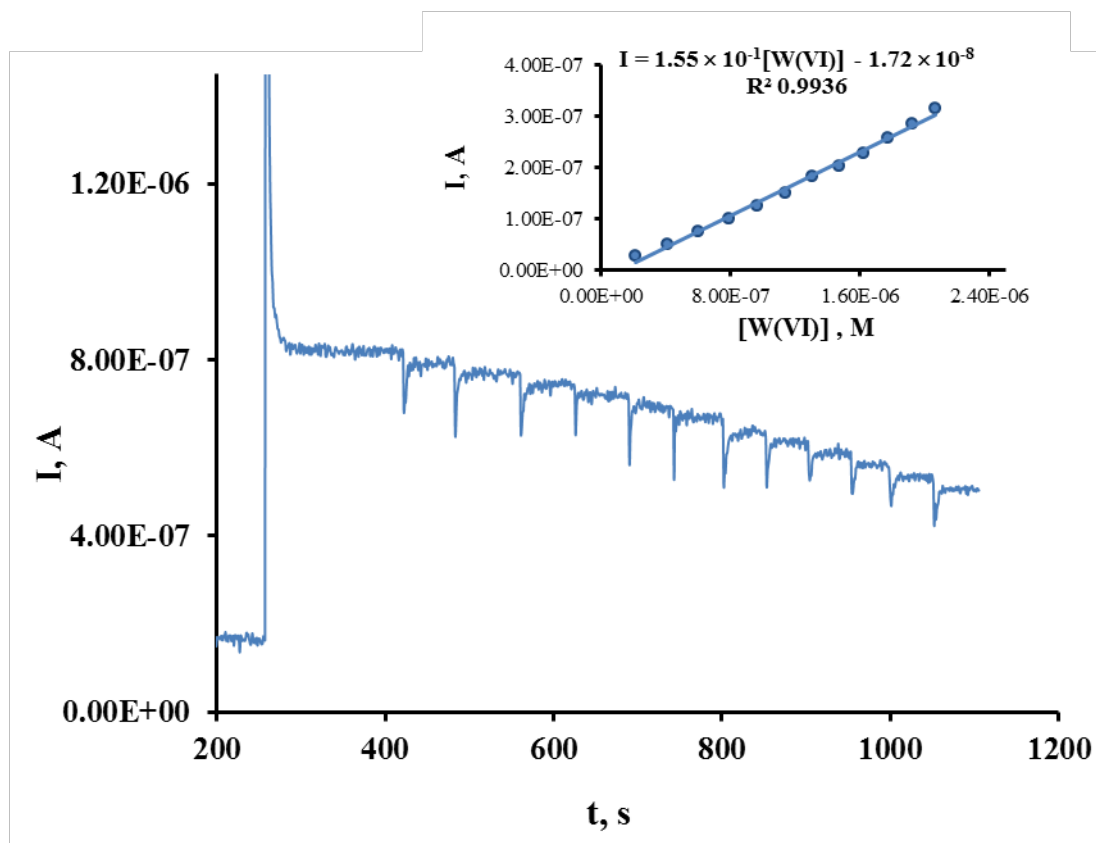


Figure 7. 5. Amperogram registered using LAC/AuNPs/SPC_{TF}Es based-biosensor under the optimum conditions (applied potential, + 0.35 V vs. Ag/AgCl; supporting electrolyte pH = 6.5 (phosphate buffer) and catechol 0.04 mM. Inset: calibration curve corresponding to this amperogram.

7.4.1 Electrodes characterization and validation

As it was explained in sec. 7.3.2 to 7.3.5 three different electroodic modification methods were applied in this research. So it was necessary to evaluate each biosensor by means of slopes of the calibration graphs and determining some figures of merit.

Electrodes characterization was done by estimating precision, in terms of repeatability and reproducibility, limit of detection and quantification, accuracy and sensitivity. All electrodes were characterized under the same optimized conditions chosen with the first modified biosensor LAC/AuNPs/SPC_{TF}Es.

The reproducibility of the different modified electrodes prepared, was determined by means of relative standard deviations RSD (%), of the slopes of three independent calibration curves and repeatability with the slopes of three independent calibration curves using the same modified electrode, as it is reported in table 7.1. LOD and LOQ were determined according to IUPAC definition [44], considering the LOD based on three times the standard deviation ($3S_y/x$) of the calibration curve divided by the slope of the calibration curve. LOQ is ten times the standard deviation ($10 S_y/x$) divided by the slope. All the biosensors show similar LOD and LOQ, between $(1.1 - 2.0) \times 10^{-7}$ M and $(3.5 - 6.7) \times 10^{-7}$ M respectively, as they can be seen in table 7.1.

LAC/AuNPs/SPC_{TTFEs} biosensors present the lowest repeatability and reproducibility. The rest of the modified electrodes were neither repeatable nor reproducible. In most of them, after two calibrations, the third was always very dispersed. For this reason only the best performance electrodes were validated. Table 7.1 shows figures of merit of different biosensors prepared.

Table 7. 1. Precision and limits of detection and quantitation of different LAC biosensors modified with AuNPs, MWCNT and SAMs at different contact time. Eap = + 0.35 V, phosphate buffer pH = 6.5, [catechol] = 0.04 mM; [stock solution W(VI)] = 2 mM, additions of 100 μ L

LAC based biosensor	Repeatability	Reproducibility	Sensitivity	LOD	LOQ
	RSD %	RSD %	A* M ⁻¹	M	M
LAC/ AuNPs/SPC _{TTFE}	3.2	2.2	0.2555	1.8 × 10 ⁻⁷	6.2 × 10 ⁻⁷
LAC/MWCNT/ AuNPs/SPC _{TTFE}	36.4	12.0	0.2271	1.6 × 10 ⁻⁷	5.4 × 10 ⁻⁷
LAC/SAMs/ AuNPs/SPC _{TTFE} 18 h	12.8	9.8	0.1861	1.9 × 10 ⁻⁷	6.5 × 10 ⁻⁷
LAC/SAMs/ AuNPs/SPC _{TTFE} 12 h	19.7	7.9	0.2143	1.9 × 10 ⁻⁷	6.5 × 10 ⁻⁷
LAC/SAMs/ AuNPs/SPC _{TTFE} 6 h	15.1	32.4	0.2222	2.0 × 10 ⁻⁷	6.6 × 10 ⁻⁷
LAC/SAMs/ AuNPs/SPC _{TTFE} 4 h	29.9	14.3	0.2342	1.1 × 10 ⁻⁷	3.5 × 10 ⁻⁷

Taking into account the great performance of the LAC/AuNPs/SPC_{TTFE}s, recovery of spiked blanks with CRM W(VI) standard (1000 ± 4) mgL⁻¹ were evaluated obtaining 102.3 ± 6.7 %. Table 7.2 resumes the results of this recovery %.

Table 7. 2. Recovery of spiked blanks with W(VI) SRM standard, traceable to NIST, using LAC/AuNPs/SPC_{TTF}Es biosensors at 6.5 (phosphate buffer), 0.040 mM catechol and E ap + 0.35 V vs. Ag/AgCl. D.F. dilution factors 50.00 mL / 2.00 mL and 50.00 mL / 5.00 mL.

[W(VI)] added M	[W(VI)] found M	Recovery %	[W(VI)] mg L ⁻¹	D.F. 50/2	D.F. 50/5
4.16 × 10 ⁻⁷	4.44 × 10 ⁻⁷	106.8	4.27	106.75	1067.5
	4.41 × 10 ⁻⁷	106.1	4.24	106.05	1060.5
	3.91 × 10 ⁻⁷	94.0	3.76	93.95	939.5
	4.52 × 10 ⁻⁷	108.7	4.35	108.66	108.6
	3.99 × 10 ⁻⁷	95.9	3.84	95.94	959.4
Media		102.3			1023
Std. Dev.		6.8			68
RSD %		6.6			6.6

7.4.2 Kinetics and laccase inhibition

To study kinetic behavior of laccase enzyme with catechol as a substrate, optimum conditions were used in presence and absence of tungsten at several concentrations. To build Michaelis-Menten plots, successive aliquots of substrate were add in the cell with or without W(VI) until a constant rate was acquire, then with the linear part of it, there were obtained the two reciprocal Lineweaver Burk plots. Once Lineweaver Burk graphs were obtained, their slopes and intercepts were used to calculate Michaelis-Menten apparent constants. According to table 7.3 and figure 7.6, slopes and *K_m* apparent increases directly with the concentration of W(VI), which means that inhibitory effect of tungsten on the laccase/catechol reaction was confirmed through the higher affinity of the enzyme for the substrate in the absence of this metal. *K_m app* increases with the concentration of the metal inhibitor. These results suggest competitive inhibition of the enzymatic process by the presence of tungsten, accordingly to figure 7.4 and table 7.3. [45, 46].

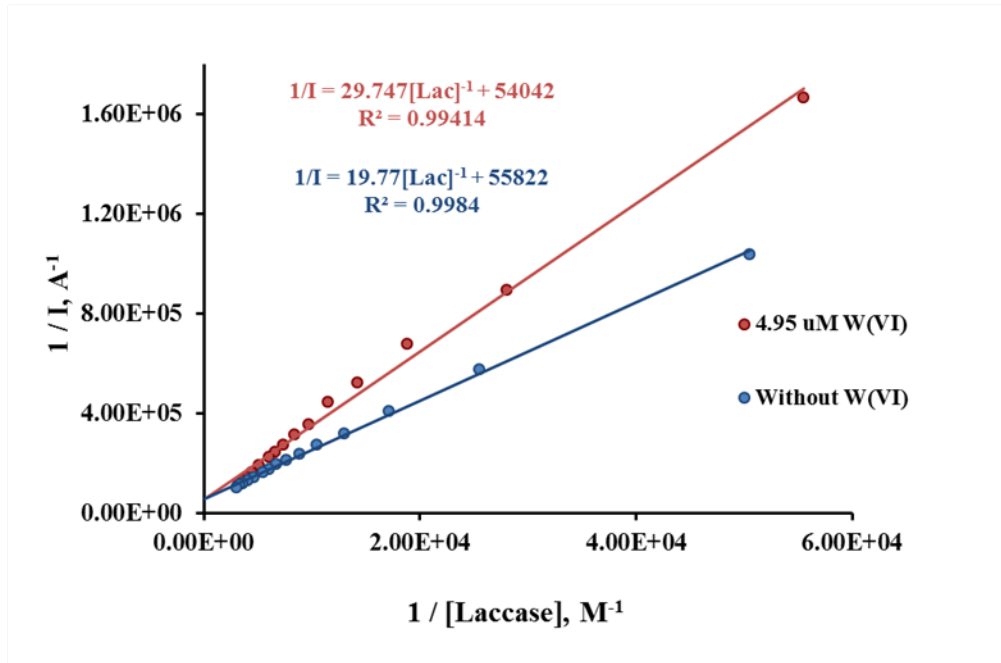


Figure 7.6. Lineweaver-Burk graphics for laccase activity on catechol using Lac/AuNPs/ SPC_{TTF}ES, with and without W(VI) at pH 6.5 (phosphate buffer), 0.040 mM catechol and $E_{ap} = + 0.35 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

Table 7.3. Km_{app} and Lineweaver-Burk calibration parameters for inhibition kinetics of laccase on catechol enzyme using LAC/AuNPs / SPC_{TTF}ES.

[W(VI)] M	Km/Vm (Slope)	$1/Vm$ (Intercept)	Vm	Km apparent, M
0	19.56	62047	1.61×10^{-5}	3.1×10^{-4}
$4.95 \times 10^{-6} \text{ M}$	29.747	54042	1.85×10^{-5}	5.5×10^{-4}
$3.06 \times 10^{-5} \text{ M}$	35.888	8483.5	1.18×10^{-5}	4.2×10^{-3}

Also it was evaluated the kinetics of the enzyme with electrodes modified with MWCNTS and SAMs with mercaptopropionic acid. The results obtained can be seen in figures 7.6 to figure 7.8 and tables 7.3 to table 7.5 respectively.

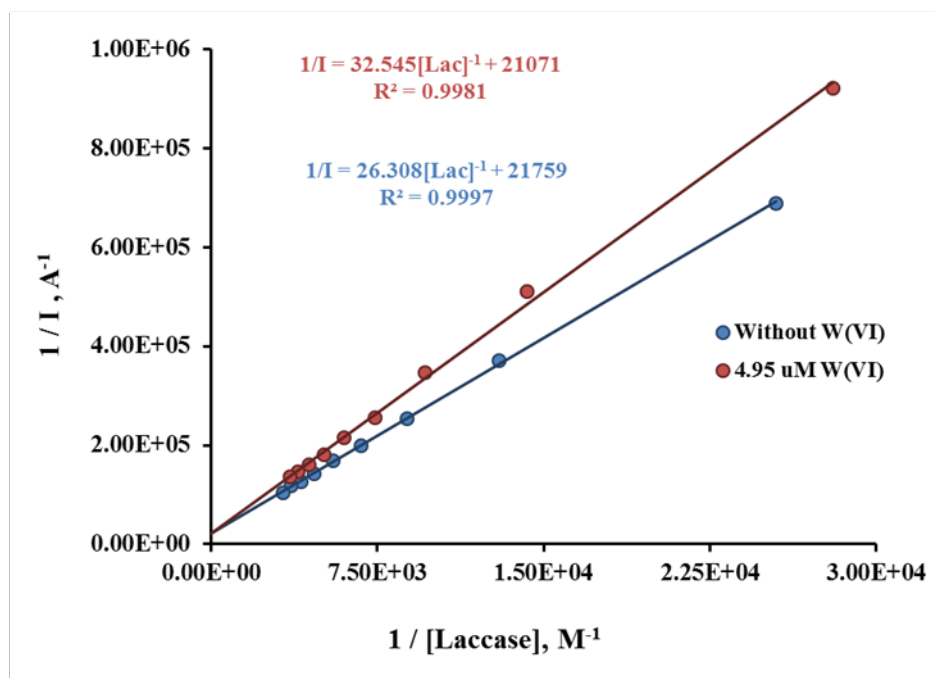


Figure 7.7. Lineweaver-Burk calibration parameters for inhibition kinetics of laccase on catechol enzyme using LAC/MWCNT/AuNPs / SPC_{TTFEs}, at 6.5 (phosphate buffer), 0.040 mM catechol, and E_{ap} + 0.35 V vs. Ag/AgCl.

Table 7.4. Km_{app} and Lineweaver-Burk calibration parameters for inhibition kinetics of laccase on catechol enzyme using modified biosensor LAC/MWCNT/AuNPs/SPC_{TTFEs}, with and without W (VI) at 6.5 (phosphate buffer), 0.040 mM catechol and E_{ap} + 0.35 V vs. Ag/AgCl.

[W(VI)] M	Km/Vm (Slope)	$1/Vm$ (Intercept)	Vm	Km apparent, M
0	26.308	21759	4.60×10^{-5}	1.209×10^{-3}
4.95×10^{-6} M	32.545	21071	4.75×10^{-5}	1.545×10^{-3}

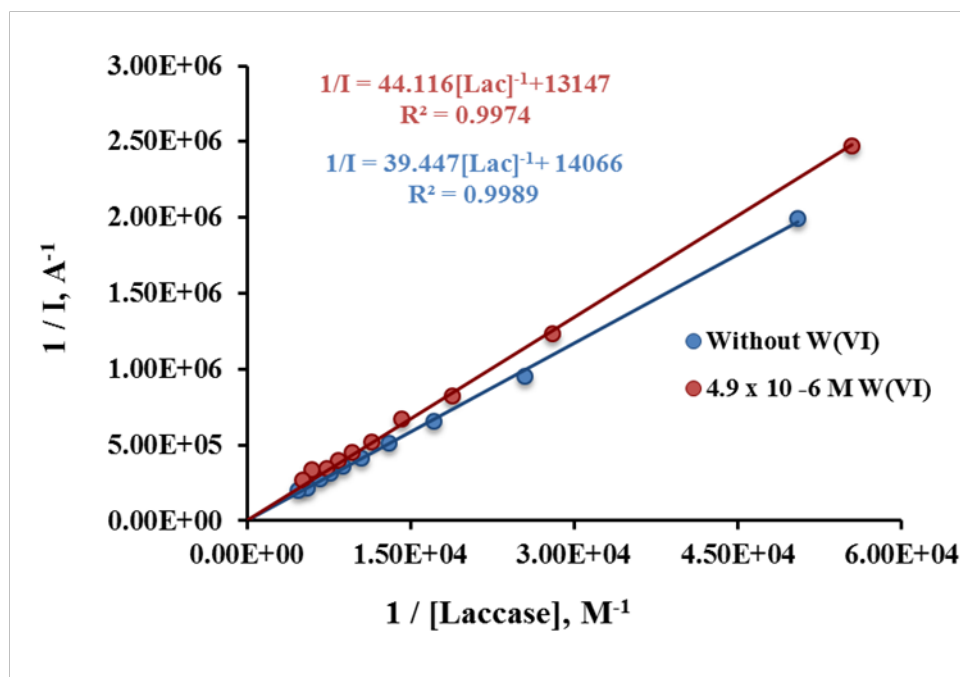


Figure 7.8. Lineweaver-Burk plots for laccase activity over catechol using Lac/SAM_{MC}PA_{12h}/AuNPs/ SPC_{TF}Es biosensor, with and without W(VI) at 6.5 (phosphate buffer), 0.040 mM catechol and E_{ap} + 0.35 V vs. Ag/AgCl.

Table 7. 5. K_m $_{app}$ and Lineweaver-Burk calibration parameters for inhibition kinetics of laccase on catechol enzyme using LAC/SAM/AuNPs/SPC_{TF}Es, at three different contact time between 3-mercaptopropionic acid and gold nanoparticles, at 6.5 (phosphate buffer) and E_{ap} + 0.35 V vs. Ag/AgCl.

Electrode	[W(VI)]	K_m/V_m	$1/V_m$	V_m	K_m
	M	(Slope)	(Intercept)	V	apparent, M
3-MCPA 6h	0	35.152	16226	6.16×10^{-5}	2.17×10^{-3}
	4.9×10^{-6} M	40.968	6775.5	1.48×10^{-4}	6.05×10^{-3}
3-MCPA 12 h	0	39.447	14066	7.11×10^{-5}	2.80×10^{-3}
	4.9×10^{-6} M	44.116	13147	7.61×10^{-5}	3.36×10^{-3}
3-MCPA 18 h	0	29.974	10720	9.33×10^{-5}	2.80×10^{-3}
	4.9×10^{-6} M	31.143	9537.9	1.05×10^{-4}	3.27×10^{-3}

We can notice that K_m $_{app}$ increases in presence of the inhibitor, such as W(VI) and regressions intercept in Y axis, for all cases. Figures 7.8 and table 7.5, presents K_m $_{app}$ for LAC/SAM_{MC}PA/SPC_{TF}Es at different times of contact with 3-

MCPA. K_m app increases with the time of contact of 18 h, 12 h. That suggested a competitive type inhibition.

7.5 Interferences study

An analysis of possible effects caused by the presence of different metal ions was carried out by preparing standards of different cations to acquire concentrations in cell as 1.0 μ M, 10 μ M, 0.1 mM and 1 mM. Then there were calculated the current from the baseline to the current signals obtained, determining inhibition percentage of the substrate with the various metals added. Nevertheless, figure 7.9 represents the inhibition of possible interferences, that could be present in natural waters such as Fe(III), Al(III), Ca(II), Mg(II), Zn(II), Mo(VI), Cu(II), Na(I) and K(I).

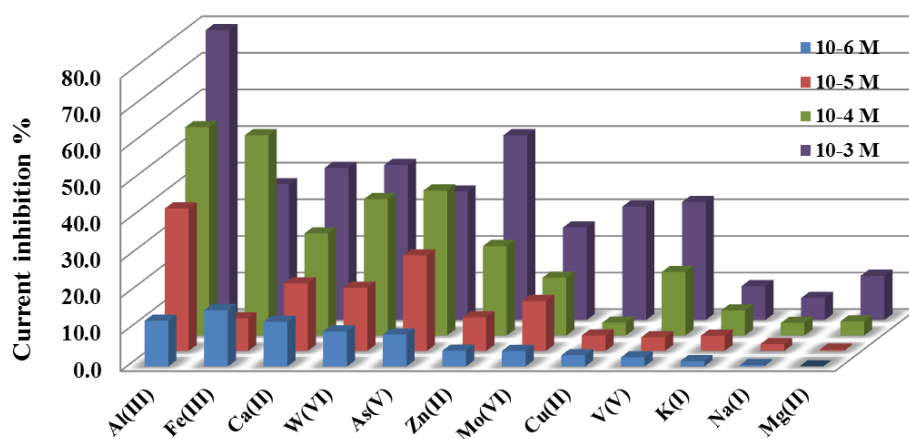


Figure 7. 9. Inhibition percentage of substrate current from several interferent cations for LAC/AuNPs/SPC_{TTF}Es based biosensor at 6.5 (phosphate buffer), 0.040 mM catechol and E ap + 0.35 V vs. Ag/AgCl.

According to this figure Al(III), Fe(III), Ca(II) and As(V) can be interferents at several concentrations, but at high concentrations these interferences decrease, being higher the current for W(VI). In agreement with several references, heavy metals in such concentrations can be removed from water samples before use the biosensors [47, 48].

7.6 Conclusions

The biosensors prepared in this work are based on the laccase enzyme inhibition by the presence of W(VI). This fact can be used to measure the decrease of a substrate current by successive additions of W(VI), this is the fundamental of the amperometric biosensors developed. According to Lineweaver-Burk plots built from the Michaelis-Menten kinetic curves lead to confirm that the laccase inhibition by W(VI) is competitive for these modified electrodes.

The immobilization of laccase enzyme over the electrodes with AuNPs/SPCTTFEs showed excellent figures of merit such as repeatability and reproducibility, with a RSD of 3.3% and 2.2% respectively. LOD 1.8×10^{-7} M and LOQ 6.2×10^{-7} M, accuracy in spiked blanks with a recovery of 102.3% with a RSD of 6.6%, compared with the other modified electrodes when enzyme is immobilized over SAMs/AuNPs/SPCTTFEs or MWCNT/AuNPs/SPCTTFEs. These modified electrodes with MWCNT and 3-MCPA at different contact times, have lower RSD% for the repeatability and reproducibility, but LOD or LOQ are similar in all cases in a range of $(1.0 - 2.0) \times 10^{-7}$ M, and $(3.5 - 6.5) \times 10^{-7}$ M respectively, being the biosensors with SAMs (18 hs of contact) the second choice with acceptable repeatability and reproducibility to analyse W(VI) in water.

Some metals such as Al(III), Fe(III), Ca(II) and As(V) may represent significant interferences when W(VI) is present at low concentrations, if they are present in water samples, but there are many methods to remove them from water.

7.7 References

1. Koutsospyros, A., Braidia, W., Christodoulatos, C., Dermatas, D., Strigul, N. (2006). A review of tungsten: From environmental obscurity to scrutiny. *J. Hazard. Mater.* 136, 1–19.
2. Bednar, J., Boyd, R. E., Jones, W. T., McGrath, C. J., Johnson, D. R., Chappell, M. A., Ringelberg, D. B. (2009). Investigations of tungsten mobility in soil using column tests. *Chemosphere*, 75, 1049–1056.
3. Hsu, S.C., Hsieh, H.L., Chen, C.P., Tseng, C. M., Huang, S.C., Huang, C.H., Huang, Y.T., Radashevs.ky, V., Lin, S.H. (2011). Tungsten and other heavy metal contamination in aquatic environments receiving wastewater from semiconductor manufacturing. *J. Hazard. Mater.* 189, 193–202.
4. Strigul, N., Koutsospyros, A., Christodoulatos, C. (2010). Tungsten speciation and toxicity: Acute toxicity of mono- and poly-tungstates to fish. *Ecotox. Environ. Safe.* 73, 164–171.
5. Feldmann, J., Cullen, W. R. (1997). Occurrence of volatile transition metal compounds in landfill gas: synthesis of molybdenum and tungsten carbonyls in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 31, 2125–2129.
6. Leffler, P.E., Kazantzis, G. (2015). Tungsten, *Handbook on the Toxicology of Metals*, Academic Press, (pp. 1297-1306).
7. Pawa, S., Ali, S. (2004). Liver necrosis and fulminant hepatic failure in rats: protection by oxyanionic form of tungsten. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Mol. Basis Dis.* 1688, 210–222.
8. Piech, R., Bugajna, A., Baś, S., Kubiak, W. W. (2010). Ultrasensitive determination of tungsten(VI) on pikomolar level in voltammetric catalytic adsorptive catechol-chlorate(V) system. *J. Electroanal. Chem.*, 644, 74–79.
9. Seiler, R. L., Stollenwerk, K. G., Garbarino, J. R. (2005). Factors controlling tungsten concentrations in ground water, Carson Desert, Nevada. *Appl. Geochem.* 20, 423–441.
10. Johannesson, K. H., Dave, H. B., Mohajerin, T. J., Datta, S. (2013). Controls on tungsten concentrations in groundwater flow systems: The role of adsorption, aquifer sediment Fe(III) oxide/oxyhydroxide content, and thiotungstate formation. *Chem. Geol.* 351, 76–94.

11. Lubal, P., Koprivova, H., Sedo, O., Havel, J., Lis, S., But, S. (2006). Simultaneous determination of molybdenum(VI) and tungsten(VI) and its application in elemental analysis of polyoxometalates. *Talanta*, *69*, 800–806.
12. Fodor, P., Ipolyi, I. (2005). Atomic Absorption Spectrometry: Electrothermal. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (2nd ed., pp. 170–180). USA: Elsevier.
13. Strigul, N. (2010). Does speciation matter for tungsten ecotoxicology? *Ecotox. Environ. Safe.* *73*, 1099–1113.
14. Bednar, A., Mirecki, J., Inouye, L., Winfield, L., Larson, S., Ringelberg, D. (2007). The determination of tungsten, molybdenum, and phosphorus oxyanions by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, *72*, 1828–1832.
15. Tsuji, K., Nakano, K., Takahashi, Y., Hayashi, K., Ro, C.U. (2012). X-ray Spectrometry. *Anal. Chem.* *84*, 636–668.
16. El-Shahawi, M. S., Al Khateeb, L. A. (2012). Spectrofluorometric determination and chemical speciation of trace concentrations of tungsten species in water using the ion pairing reagent procaine hydrochloride. *Talanta*, *88*, 587–592.
17. Bhowal, S. K., Bhattacharyya, M. (1989). Determination of traces of molybdenum and tungsten by extraction and polarography of their salicylhydroxamates. *Talanta*, *36*, 989–992.
18. Alvarado-Gómez, A.L., Alonso-Lomillo, M.A., Domínguez-Renedo, O., Arcos-Martínez, M.J. (2015). A Chronoamperometric Screen Printed Carbon Biosensor Based on Alkaline Phosphatase Inhibition for W(IV) Determination in Water, Using 2-Phospho-L-Ascorbic Acid Trisodium Salt as a Substrate. *Sensors Basel*, *15*, 2232–2243.
19. Durán, N., Rosa, M.A., D'Annibale, A., Gianfreda, L. (2002) Enzyme *Microb. Technol.* *31*, 907–931.
20. Mayer, A. M., Staples, R. C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, *60*, 551–565.
21. Sassolas, A., Blum, L. J., Leca-Bouvier, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol. Adv.* *30*, 489–511.
22. Kuwahara, T., Asano, T., Kondo, M., Shimomura, M. (2013). Bioelectrocatalytic O₂ reduction with a laccase-bearing poly(3-

- methylthiophene) film based on direct electron transfer from the polymer to laccase. *Bioelectrochemistry*, 91, 28–31.
23. Fernández-Fernández, M., Sanromán, M. A., Moldes, D. (2013). Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnol. Adv.* 31, 1808–1825.
 24. Jędrychowska, A., Malecha, K., Cabaj, J., Sołoducho, J. (2015). Laccase biosensor based on low temperature co-fired ceramics for the permanent monitoring of water solutions. *Electrochim. Acta*, 165, 372–382.
 25. Alonso-Lomillo, M.A., Yardimci, C., Dominguez-Renedo, O., Arcos-Martinez, M.J. (2009). CYP450 2B4 covalently attached to carbon and gold screen printed electrodes by diazonium salt and thiols monolayers. *Anal. Chim. Acta*, 633, 51–56.
 26. Qin, X., Wang, H., Miao, Z., Chen, L., Zhao, W., Shan, M., Chen, Q. (2010). Amperometric biosensor based on gold nanoparticles-decarated multiwalled carbon nanotubes-poly(diallyldimethylammonium chloride) biocomposite for the determination of choline. *Sensor. Actuator. B-Chem.* 147, 593–598
 27. Welch, C.M., Compton. R.G. (2006). The use of nanoparticles in electroanalysis. *Anal. Bioanal. Chem.*, 384, 601-619.
 28. Liu, Y. Qu, X. Guo, H. Chen, H. Liu, B. Dong. S. (2006). Facile preparation of amperometric laccase biosensor with multifunction based on the matrix of carbon nanotubes–chitosan composite. *Biosens. Bioelectron.* 21, 2195–2201.
 29. Tsai, Y.C., Chiu, C.C. (2007). Amperometric biosensors based on multiwalled carbon nanotube-Nafion-tyrosinase nanobiocomposites for the determination of phenolic compounds. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 125, 10–16.
 30. Tsai, Y.C., Chen, S.Y., Liaw, H.W. (2007). Immobilization of lactate dehydrogenase within multiwalled carbon nanotube-chitosan nanocomposite for application to lactate biosensors. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 125, 474–481.
 31. Lee, C.A., Tsai, Y.C. (2009). Preparation of multiwalled carbon nanotube-chitosan-alcohol dehydrogenase nanobiocomposite for amperometric detection of ethanol. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 138, 518–523
 32. Campuzano, S.; Loaiza, Ó. A.; Pedrero, M.; de Villena, F. J. M.; Pingarrón, J. M. (2004). An integrated bienzyme glucose oxidase–fructos dehydrogenase–tetrathiafulvalene-3-mercaptopropionic acid–gold electrode

- for the simultaneous determination of glucose and fructose. *Bioelectrochemistry*, *63*, 199–206.
33. Bendikov, M; Wudl, F; Perepichka, D. F. (2004). Tetrathiafulvalenes, Oligoacenes, and Their Buckminsterfullerene Derivatives: The Brick and Mortar of Organic Electronics. *Chem. Rev.* *104*, 4891–4945.
 34. Asturias-Arribas, L., Alonso-Lomillo, M. A., Domínguez-Renedo, O., Arcos-Martínez, M. J. (2013). Screen-printed biosensor based on the inhibition of the acetylcholinesterase activity for the determination of codeine. *Talanta*, *111*, 8-12.
 35. Henao-Escobar, W. Domínguez-Renedo, O.; Alonso-Lomillo, M. A.; Arcos-Martínez, M. J. (2013). Simultaneous determination of cadaverine and putresine using a disposal monoamine oxidase based biosensor. *Talanta*, *117*, 405-411.
 36. Molinero-Abad, B., Alonso-Lomillo, M., Domínguez-Renedo, O., Arcos-Martínez, M. A. (2014). Malate quinone oxidoreductase biosensors based on tetrathiafulvalene and gold nanoparticles modified screen-printed carbon electrodes for malic acid determination in wine. *Sensor. Actuat. B-Chem.* *202*, 971-975.
 37. Giz, M. J.; Duong, B.; Tao, N. J. (1999). In situ STM study of self-assembled mercaptopropionic acid monolayers for electrochemical detection of dopamine. *J. Electroanal. Chem.* *465*, 72–79.
 38. Albareda-Sirvent, M., Merkoci, A., Alegret, S. (2000). Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. *Sensor. Actuat. B-Chem.* *69*, 153-163.
 39. Alonso-Lomillo, M. A., Domínguez-Renedo, O., Arcos-Martínez, M. J. (2010). Screen-printed biosensors in microbiology: A review. *Talanta*, *82*, 1629–1636.
 40. Domínguez-Renedo, O., Alonso-Lomillo, M.A., Ferreira-Gonçalves, L., Arcos-Martínez, M.J. (2009). Development of urease based amperometric biosensors for the inhibitive determination of Hg (II). *Talanta*, *79*, 1306-1310.
 41. Yaropolov, A.I., Skorobogatko, O.V., Vartanov, S.S., Varfolomeyev, S.D. (1994). Laccase. Properties, catalytic mechanism, and applicability. *Appl. Biochem. Biotechnol.* *49*, 257–280.

42. Vaz-Domínguez, C., Campuzano, S., Rüdiger, O., Pita, M., Gorbacheva, M., Shleev, S., Fernández, V.M., De Lacey, A.L. (2008). Laccase electrode for direct electrocatalytic reduction of O₂ to H₂O with high-operational stability and resistance to chloride inhibition. *Biosens. Bioelectron.* *24*, 531–537
43. Madhavi, V. Lele, S.S. (2009). Laccase properties and applications. *Bioresources*, *4*, 1694-1717.
44. Long, G.L., Winefordner. (1983). Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.* *55*, 712A–724A.
45. Nelson, D.L., Cox, M.M. (2007). Leningher: Principios de Bioquímica (5ta. Mortar of Organic Electronics. *Chem. Rev.* *104*, 4891–4945.
46. Asturias-Arribas, L., L.W., Woods, A.E., Wells, M.R. (1987). *Food Composition and Analysis* (pp. 283-348). New York: Van Nostrand Reinhold Company.
47. Alvarado-Gómez, A.L., Alonso-Lomillo, M.A., Domínguez-Renedo, O., Arcos-Martínez, M.J. (2015). A Chronoamperometric Screen Printed Carbon Biosensor Based on Alkaline Phosphatase Inhibition for W(IV) Determination in Water, Using 2-Phospho-l-Ascorbic Acid Trisodium Salt as a Substrate. *Sensors Basel*, *15*, 2232–2243.
48. Bálintová M. and Petriláková A.(2011). Study of pH Influence on Selective Precipitation of Heavy Metals from Acid Mine Drainage. *Chem. Eng. Trans.* 345 – 350.

8. Conclusiones Generales

8. Conclusiones Generales

1. Se ha demostrado que las enzimas fosfatasa alcalina y lacasa se han podido utilizar en la preparación de biosensores enzimáticos para determinar vanadio y tungsteno en aguas.
2. Todos los biosensores resultaron ser de fácil preparación, rápidos y con buenos parámetros de desempeño en muestras de agua.
3. El uso de nanopartículas de oro depositadas a + 0.18 V vs. Ag/AgCl durante 15 segundos sobre el electrodo de trabajo de los SPCE, mejora las señales cronoamperométricas, por lo que se utilizaron en los diferentes biosensores desarrollados en esta investigación.
4. La fosfatasa alcalina en presencia de vanadio o de tungsteno disminuye su actividad enzimática y pareciera que esta inhibición podría catalogarse como mixta, por el tipo de gráficas que se producen en ausencia y presencia de los metales y los valores de las constantes de Michaelis-Menten.
5. El procedimiento desarrollado para determinar vanadio con la ALP y el 5-monofosfato de riboflavina como sustrato (ALP/AuNPs/SPCE) ha mostrado buenos parámetros de desempeño, con una repetibilidad en términos de RSD de 7.6 %, una reproducibilidad de 5.9 % y un LOD de $3.9 \pm 0.4 \mu\text{M}$.
6. La veracidad ha sido evaluada en muestras de agua enriquecidas con un patrón certificado de V(V) SRM 3165 (lot 992706), de $1000 \pm 4 \text{ mg / L}$ trazable al NIST, del que se ha recuperado una concentración de $995 \pm 52 \text{ mg/L}$ ($n = 5$; $\alpha = 0.05$), valor que se encuentra dentro del límite de confianza. En el estudio de recuperación con muestras de agua enriquecida con $3.70 \mu\text{M}$, se ha obtenido una concentración media de $3.66 \pm 0.21 \mu\text{M}$ ($n = 7$, $\alpha = 0.05$, RSD = 5.7%) y una recuperación de 98.9 %.
7. El segundo biosensor preparado con ALP también se basa en la reacción de inhibición, ya que la reacción entre la enzima ALP y el sustrato *p*-NPP, se ve afectada por la presencia de V(V), lo que permite la cuantificación del metal V(V) en agua. Este efecto sugiere una inhibición mixta, teniendo la enzima mayor afinidad por el sustrato en ausencia del metal que en presencia de este.

8. El biosensor de ALP/AuNPs/SPCE utilizando *p*-NPP como sustrato para determinar V(V), también ha demostrado tener un buen desempeño, con un LOD diez veces menor que el del biosensor de la sección anterior. Sin embargo mantiene semejante su repetibilidad y reproducibilidad, con un 7.6 % y un 8.1 % respectivamente, una veracidad en muestras de agua enriquecidas de 103 % con un RSD = 3%, y una recuperación de un patrón certificado SRM trazable al NIST, cuya $[V(V)] = (1000 \pm 5 \text{ mg L}^{-1})$ a partir de blancos enriquecidos, del que se ha recuperado $1025 \pm 37 \text{ mg L}^{-1}$, ámbito que incluye el valor certificado.
9. El estudio de interferencias ha demostrado que para V(V), las más significativas son la presencia de Cr(III), Mo(VI) y W(VI), si están presentes en muestras de agua potable a concentraciones entre 10^{-6} M a 10^{-4} M .
10. El tercer biosensor desarrollado ALP/AuNPs/SPCEs con 2-PLAsc como sustrato, ofrece una buena alternativa sensible para determinar W(VI), con muy buen desempeño en muestras de agua, con un LOD de $0.29 \mu\text{M}$, una repetibilidad de 6.4 % y una reproducibilidad de 5.2 %, como RSD. La veracidad evaluada a través de un SRM patrón estándar de referencia certificado de $1000 \pm 4 \text{ mg L}^{-1}$ en W(VI) recuperó 991 ± 68 , con un RSD = 7 %. Además varios estudios con muestras de blancos enriquecidos, agua del tubo y agua embotellada enriquecidas dieron recuperaciones de 99.1 % RSD = 2.9 % y 101.3 % con RSD = 8.5 % respectivamente.
11. El estudio de interferencias de cationes que pueden estar presentes en el agua, indica que metales como Se(IV), As(V), Sn(II), Al(III), y Fe(III) a concentraciones mayores a los μM debe tomarse en consideración.
12. La enzima lacasa puede ser inhibida por la presencia de W(VI), por lo que se aprovechó esta característica para cuantificar W(VI) en aguas.
13. Se trabajó para el último biosensor con SPCEs que tenían incorporado un mediador electroquímico, el tetratiafulvaleno TTF de modo que los biosensores fueron nombrados como SPC_{TTF}Es.
14. Se han utilizado varias formas para inmovilizar la enzima lacasa sobre los SPC_{TTF}Es, tales como AuNPs, AuNPs y MWCNTs y SAMs sobre las AuNPs, con dos tioles, el 1,2-etanoditiol y el ácido 3-mercaptopropiónico. Las

- monocapas autoensambladas se prepararon a diferentes tiempos de contacto, entre 3 h y 18 h, pero no todos demostraron buen desempeño.
15. Los parámetros evaluados como la repetibilidad y la reproducibilidad de cada sensor modificado, demostraron que entre más modificaciones se le hagan al dispositivo, menor repetibilidad y reproducibilidad se obtienen. Sin embargo la sensibilidad y bajos límites de detección y cuantificación es muy similar entre los dispositivos.
 16. Los mejores resultados se han obtenido con el biosensor LAC/AuNPs/SPC_{TF}Es, con un LOD de 0.18 μ M, una repetibilidad de 3.3 % una reproducibilidad de 2.2 %, en términos de RSD y una recuperación de 102.3 % en blancos enriquecidos con un estándar de referencia SRM trazable al NIST. Le sigue en desempeño el biosensor LAC/SAMs/AuNPs/SPC_{TF}Es, con 18 h de contacto, con una repetibilidad de 12.8 %, una reproducibilidad de 9.8 %, y un LOD de 0.19 μ M.
 17. Los estudios cinéticos de inhibición para este grupo de biosensores, indican comportamientos similares en presencia y ausencia del metal W(VI) y sugieren que se da una inhibición competitiva en todos los casos.
 18. La veracidad se ha evaluado solo para los biosensores LAC/AuNPs/SPC_{TF}Es en términos de recuperación de muestras blanco enriquecidas con un estándar de referencia estándar SRM trazable al NIST, con una recuperación de 102.3% y un RSD de 6.6%.
 19. Algunos metales como Al(III), Fe(III), and V(V) pueden representar interferencias significativas cuando el W(VI) se encuentre a bajas concentraciones, por lo que se recomienda utilizar alguno de los métodos que existen para remover estos cationes del agua.

