



UNIVERSIDAD DE BURGOS
Departamento de **Química**

**DESARROLLO Y APLICACIÓN DE SENSORES Y
BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA LA
DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES
MEDIOAMBIENTALES Y AGROALIMENTARIOS**

- Tesis Doctoral -



Ana Calvo Pérez
Burgos 2014



UNIVERSIDAD DE BURGOS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Memoria de investigación titulada “*Desarrollo y aplicación de sensores y biosensores electroquímicos para la determinación de contaminantes medioambientales y agroalimentarios*” presentada para optar al Grado de Doctora en la Universidad de Burgos.



Fdo.: Ana Calvo Pérez



UNIVERSIDAD DE BURGOS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Dña, M^a. Julia Arcos Martínez, Catedrática de Universidad del Departamento de Química de la Universidad de Burgos y Dña, Olga Domínguez Renedo, Profesora Titular del Departamento de Química de la Universidad de Burgos,

INFORMAN FAVORABLEMENTE sobre la presente Tesis Doctoral, titulada "*Desarrollo y aplicación de sensores y biosensores electroquímicos para la determinación de contaminantes medioambientales y agroalimentarios*", realizada en el Área de Química Analítica del Departamento de Química de la Universidad de Burgos por Dña, Ana Calvo Pérez.

Y para que así conste, firman el presente informe en Burgos, a 30 de Enero de 2014.



Fdo.: M. Julia Arcos Martínez

Fdo.: Olga Domínguez Renedo

AGRADECIMIENTOS

Llega el momento de dar las gracias a todas aquellas personas que de una u otra forma, me han acompañado, ayudado y apoyado durante este tiempo.

En primer lugar, quiero agradecer de manera especial y sincera a mis directoras, Julia Arcos y Olga Domínguez, por su apoyo y confianza en mi trabajo y por su ejemplo de trabajo y dedicación. De la misma forma, agradecer a Asun, su ayuda e ideas en los pequeños problemas del día a día. Gracias a las tres.

A vosotros “electrolatinos”..., mil gracias por todos los momentos inolvidables tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias por estar en lo bueno y en lo malo. Habéis sido la mejor compañía que se puede tener en el día a día, trabajar a vuestro lado se hace mucho más fácil. Y confío en que los buenos momentos seguirán, aunque ya no compartamos laboratorio.

A los compañeros de café, congresos, etc... no hemos compartido laboratorio, pero sí muchos y buenos momentos juntos, que espero no acaben con el fin de esta etapa.

Agradecer al profesor Jean-Michel Kauffmann la oportunidad de trabajar durante tres meses en el Instituto de Farmacia de la ULB. Y a tí Laura, por haberme ayudado tanto en ese tiempo, por haberte

convertido en una persona imprescindible en mi vida, y por estar ahí siempre que te necesito a pesar de la distancia.

Gracias a mi familia, porque sin ellos todo esto no hubiera sido posible. A mis padres, mis hermanos y cuñados, y a esos cuatro pequeños renacuajos que hacen que la vida sea mucho más simple.

No puedo terminar los agradecimientos, sin dar las gracias a mis amigas. A todas vosotras que no entendéis nada de lo que hago, pero siempre estáis ahí, para escucharme y apoyarme. Porque sois muchas y muy diferentes, pero todas tenéis algo en común... ¡¡sois las mejores!! Un millón de gracias por ser cómo sois, por vuestros consejos, cariño y apoyo. Con este párrafo, os devuelvo un poquito de todo lo que vosotras me habéis dado.

A todos, sinceramente.....¡¡¡Muchas gracias!!!

ÍNDICE GENERAL

ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	9
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	17
2.1 Sensores y biosensores	19
2.1.1. Sensores electroquímicos	21
2.1.2. Biosensores electroquímicos	22
2.1.2.1. Enzimas	24
2.1.2.1.1. Mecanismo de acción del enzima	27
2.1.2.1.2. Inhibición enzimática	28
2.1.2.1.3. Métodos de inmovilización	31
2.1.2.1.4. Enzimas empleadas en la construcción de biosensores....	34
2.1.2.1.4.1. Plasma amino oxidasa	35
2.1.2.1.4.2. Horseradish peroxidasa	35
2.1.2.1.4.3. Tirosinasa	36
2.1.2.1.4.4. Glucosa oxidasa	36
2.1.3. Biosensor amperométrico	37
2.1.4. Electrodo serigrafiados	39
2.1.4.1. Construcción de electrodo serigrafiados	40
2.1.4.2. Tipos de electrodo serigrafiados	44
2.1.4.2.1. Electrodo serigrafiados no modificados	44
2.1.4.2.2. Electrodo serigrafiados modificados	45
2.1.4.2.2.1. Electrodo serigrafiados modificados con películas metálicas	46
2.1.4.2.2.2. Electrodo serigrafiados modificados con nanomateriales.	47
2.1.4.2.2.3. Electrodo serigrafiados modificados con enzimas ..	48

2.2. Contaminantes químicos	53
2.2.1. Contaminantes alimentarios	54
2.2.1.1. Aminas biógenas	55
2.2.1.2. Tiramina	57
2.2.1.3. Revisión bibliográfica de los métodos de análisis empleados en la determinación de tiramina	59
2.2.2. Contaminantes medioambientales	67
2.2.2.1. Cromo: introducción general	68
2.2.2.2. Cromo en el medio ambiente	70
2.2.2.3. Toxicidad y legislación del cromo	72
2.2.2.4. Especiación de cromo	74
2.2.2.5. Revisión bibliográfica de los métodos empleados en la especiación de cromo	75
2.3. Bibliografía	83
3. BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO BASADO EN EL ENZIMA PAO PARA LA DETERMINACIÓN DE TIRAMINA	109
3.1. Introducción	111
3.2. Disposable amperometric biosensor for the determination of tyramine using plasma amine oxidase	115
4. BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO BASADO EN EL ENZIMA HRP PARA LA DETERMINACIÓN DE TIRAMINA	131
4.1. Introducción	133
4.2. Disposable Horseradish Peroxidase Biosensors for the Selective Determination of Tyramine	137
5. ESPECIACIÓN ELECTROQUÍMICA DE CROMO MEDIANTE DPV	157
5.1. Introducción	159

5.2. Simultaneous determination of Cr (III) and Cr (VI) by differential pulse voltammetry using modified screen-printed carbon electrodes in array mode	163
6. ESPECIACIÓN ELECTROQUÍMICA DE CROMO CON BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS	185
6.1. Introducción	187
6.2. Speciation of chromium using chronoamperometric biosensors based on screen-printed electrodes	191
7. CONCLUSIONES	213
8. ANEXOS	225
Anexo I: Publicaciones científicas	227
Anexo II: Comunicaciones a congresos	235

ABSTRACT

Nowadays, the interest in the determination of different pollutants in food and environmental fields has exponentially grown. For this reason, the development of miniaturized analytical devices with properties including low cost, portability, accuracy, and ease of use for the high sensitivity and selective determination of the target analyte is necessary.

Biogenic amines (BAs) are one of the most important pollutants present in food products. Among them, tyramine (Tyr) can be considered as one of the most frequently BAs existing in different variety of foods. Likewise, heavy metals are among the most important environmental pollutants because of their high toxicity. In this way, chromium can be considered as an important toxic element especially Cr(VI), which carcinogenic effects have been demonstrated, being therefore its speciation more interesting than the determination of total chromium content.

Among other analytical techniques, high performance liquid chromatography (HPLC) and electrophoresis are the most frequently used in the determination of Tyr. In the case of chromium, the determination is usually carried out by atomic absorption spectrophotometry (AAS) and inductively coupled plasma (ICP) techniques. These techniques require tedious pretreatment processes of the sample and a complex and expensive instrumentation. Thus, the applicability of these devices in routine determinations is reduced.

Electrochemical methods are suitable to perform accurate and precise determinations requiring low sensitivities. These techniques present important advantages such as a simple and low cost instrumentation, and usually short analysis times. Furthermore, the reliability and accuracy of electrochemical methods remain the same or even better compared to the techniques normally used in the determination of pollutants.

In the last years, there has been a great development in the field of miniaturized electrodes, in particular screen-printed electrodes (SPEs). These systems overcome the disadvantage of the electrochemical techniques in terms of reproducibility, since these disposable devices are able to be mass produced. They present additional advantages including the possibility of “in situ” analysis and a great versatility due to the wide range of possible modifications. This last feature makes them particularly selective to a variety of analytes.

In this work two different biosensors have been developed for the determination of Tyr using screen-printed carbon electrodes (SPCEs) as disposable devices. Firstly, a chronoamperometric biosensor based on the immobilization of the enzyme plasma amine oxidase (PAO) has been constructed (PAO/SPCE). This biosensor shows a high sensitivity for the determination of Tyr being its capability of detection value of 2 μM ($\alpha=\beta=0.05$). The reproducibility and repeatability value obtained for the

described biosensor is 8.6% and 8.7%, respectively. Moreover, this biosensor has been successfully applied in the determination of Tyr in cheese commercial samples. In spite of the good results described above, the developed method resulted not selective for determination of Tyr, since other BAs also presented an analytical response in the optimized experimental conditions.

With the aim of developing a selective biosensor for the determination of Tyr, horseradish peroxidase (HRP) has been selected as the biological element for the fabrication of HRP/SPCEs based on its crosslinking immobilization. This enzyme has been also used for the construction of disposable biosensors based on its direct incorporation during the SPCEs production process (SPC_{HRP}Es). The experimental conditions have been optimized in both cases by experimental design method. In the case of the HRP/SPCE biosensor, a capability of detection of 0.01 μM has been obtained being the reproducibility value of 6.8% and the repeatability value of 7.1%. For the SPC_{HRP}E biosensor, the capability of detection value obtained was 2 μM with a reproducibility of 3.4% and a repeatability of 2.2%. The analysis of the possible interference by other BAs shows a good selectivity for both biosensors in the determination of Tyr, since no other BAs analyzed show chronoamperometric responses under the optimized experimental conditions. Comparing the results obtained with both biosensors it can be concluded that SPC_{HRP}E biosensors offer a very good sensitivity in the determination of Tyr with good performance features in terms of precision, adding the advantage of a shorter manufacturing process. SPC_{HRP}Es biosensors were then used in the analysis of Tyr in a cheese commercial sample with successful results.

A procedure for the simultaneous determination of Cr(III) and Cr(VI) by differential pulse voltammetry using SPCEs has been also developed. First, a selective sensor to Cr(III) using mercury film modified SPCEs has been constructed (Hg-SPCEs). The developed sensor shows a high sensitivity

(capability of detection of 39 μM) with good precision (reproducibility of 3%). Moreover, the Hg-SPCEs results highly selective to Cr(III) even in the presence of Cr(VI).

In a second step, a selective sensor for the analytical determination of Cr(VI) has been developed as well. In this case SPCEs have been modified with gold nanoparticles (AuNPs). The AuNPs-SPCEs sensors shows a capability of detection value of 0.5 μM with a reproducibility and repeatability values of 1.5% and 1.4%, respectively for the selective determination of hexavalent chromium even in the presence of Cr(III).

For the simultaneous determination of both species of chromium Hg-SCPEs and AuNPs-SPCEs have been connected in array mode. These developed array devices show successful results in the determination of Cr(III) and Cr(VI) even in complex samples such as waste water from a tannery.

Disposable biosensors have been also developed in order to improve the sensitivity in the speciation analysis of chromium. In this way, a selective biosensor for Cr(III) has been constructed based on the immobilization of the enzyme tyrosinase on SPCEs modified with tetrathiafulvalene (TTF) as a redox mediator (tyrosinase/SPC_{TTF}Es). The selective determination of Cr(III) with this sensor is based on the inhibitory effect of this species of chromium on the activity of tyrosinase. The capability of detection obtained for this biosensor is 2.0 μM being its reproducibility of 5.5%.

The inhibitive determination of Cr(VI) has been also performed using a disposable biosensor based on the immobilization of the enzyme glucose oxidase (GOx) on screen-printed carbon platinised electrodes (SPC_{Pt}Es) using ferricyanide as a redox mediator. The capability of detection and

reproducibility values obtained with this biosensor are 90.5 nM and 6.2%, respectively.

Finally, a bipotentiostatic chronoamperometric biosensor has been developed using a tyrosinase/SPC_{TTF}E and a GOx/SPC_{Pt}E connected in array mode for the simultaneous determination of Cr(III) and Cr(VI). This device shows good reproducibility for the speciation of both chromium species even in real samples such as tap water samples.

1. INTRODUCCIÓN

El número y tipos de contaminantes a los que en mayor o menor grado el ser humano puede quedar expuesto, es muy elevado. Dicha exposición puede tener diversos orígenes, siendo la medioambiental y la alimentaria las más frecuentes.

Dentro de los numerosos contaminantes medioambientales se encuentran los metales pesados, como el cromo, que es un importante metal ecotóxico a nivel de trazas, cuya determinación en medio acuoso es frecuentemente difícil debido a la falta de métodos analíticos suficientemente sensibles. Por otra parte, la relativa inocuidad de los iones de Cr(III) y la toxicidad de las especies de Cr(VI), sugiere la necesidad de llevar a cabo el desarrollo de procedimientos analíticos, que permitan no solo la cuantificación del contenido total de cromo presente en una muestra, sino también la especiación o determinación simultánea de ambas especies.

En cuanto a los contaminantes alimentarios, las aminos biógenas (BAs) son uno de los analitos de mayor interés en la actualidad. El organismo humano tolera fácilmente concentraciones bajas de BAs, ya que éstas son eficientemente degradadas por los enzimas monoamino oxidasa (MAO) y diamino oxidasa (DAO) en el tracto intestinal. Las BAs son posibles precursoras en la formación de compuestos cancerígenos de tipo nitrogenado. Las intoxicaciones más notorias son causadas por Tyr e histamina (His). Putrescina (Put) y Cadaverina (Cad), aunque no tienen efectos tóxicos por sí mismas, pueden aumentar la toxicidad de His y Tyr, ya que interfieren en las reacciones de detoxificación. Además, Put y Cad pueden causar una depreciación en el olor y el sabor, confiriendo sabores de putrefacción y carne podrida, respectivamente.

Tyr es una de las BAs encontradas con mayor frecuencia en alimentos, es capaz de generar cambios en la presión sanguínea, cefaleas e incluso un incremento atípico en el tránsito intestinal de los seres humanos.

La determinación de cromo y Tyr ha sido llevada a cabo frecuentemente empleando técnicas cromatográficas en las que son normalmente necesarias etapas previas de derivatización y tediosos pretratamientos de la muestra, así como, una instrumentación compleja, por lo que no resultan adecuadas para la realización de análisis rápidos e “in situ”. En el caso particular del cromo, se han utilizado también técnicas basadas en el empleo de fuentes de plasma de acoplamiento inductivo (ICP) acopladas a técnicas de emisión atómica (ICP-AES) o de espectrometría de masas (ICP-MS). Estos métodos, aunque muy sensibles, presentan problemas relacionados con el elevado coste instrumental y la complejidad de los análisis que los hacen difíciles de utilizar en análisis rutinarios.

Las técnicas electroquímicas se presentan actualmente como una atractiva alternativa debido a sus ventajas relacionadas con su elevada sensibilidad, su reducido coste de instrumentación y a la posibilidad de poder realizar análisis “in situ”. En este sentido, la especiación de cromo ha

sido llevada a cabo con éxito mediante voltamperometría diferencial de impulsos de redisolución adsorbtiva (DPAdSV) empleando diferentes complejantes. En este tipo de técnicas la especiación conlleva realizar generalmente varias etapas. Inicialmente se determina la concentración de Cr(VI) de forma directa, después de someter a la muestra a un proceso de oxidación, se determina la concentración total de cromo. La concentración de Cr(III) se obtiene finalmente por diferencia. El empleo de varias etapas de análisis impacta negativamente en la calidad del método, ya que la posibilidad de contaminación es tanto mayor cuanto mayor es el número de etapas que intervienen en un proceso.

Las limitaciones señaladas surgen de la necesidad de disponer de señales electroquímicas bien definidas relacionadas con el analito objeto de estudio. Efectivamente, una muestra con varios componentes es frecuente que proporcione respuestas electroquímicas solapadas. Diferentes tratamientos matemáticos, que incluyen las técnicas de calibración multivariante, han sido utilizados, y se han revelado útiles para abordar el problema de solapamiento de señales que tiene lugar en procesos como la determinación simultánea de Cr(III) y Cr(VI) en una misma muestra.

Una solución más sencilla al problema de solapamiento de señales consiste en la utilización de dispositivos provistos de varios electrodos de trabajo dispuestos en serie (modo “array”), de modo que cada uno de los electrodos pueda modificarse para hacerlo selectivo a una especie química en concreto.

Dentro de las técnicas electroquímicas desarrolladas para la cuantificación de diferentes elementos de interés analítico se encuentran aquellas que emplean sensores químicos que permiten realizar análisis sensibles y fiables. Entre los sensores químicos destacan actualmente los biosensores, que además de la elevada sensibilidad que presentan, constituyen unos de los dispositivos de mayor selectividad y por ello de gran aplicación en el campo del análisis químico.

En el caso de las BAs como la Tyr es posible llevar a cabo su análisis empleando biosensores electroquímicos que implican la utilización de enzimas del tipo amino oxidasa (AO) como MAO, DAO o plasma amino oxidasa (PAO) cuya interacción con las BAs genera productos de reacción susceptibles de sufrir reacciones redox en la superficie de un electrodo. El principal problema de estos biosensores es la falta de especificidad que les hace únicamente útiles para la determinación del contenido total de BAs presentes en una determinada muestra. El desarrollo de métodos de análisis más selectivos que permitan discriminar entre los diferentes tipos de BAs se hace entonces necesario. La solución a este problema puede encontrarse en la utilización de otro tipo de enzimas más selectivas hacia un determinado tipo de BA.

Un problema común en las técnicas electroquímicas que emplean electrodos sólidos convencionales es la falta de reproducibilidad de los resultados, lo que fundamentalmente se debe a la dificultad de tener superficies electródicas exactamente iguales para cada medida. Las posibilidades de estas técnicas pueden mejorarse en determinados casos por la sustitución de los clásicos electrodos y celdas por dispositivos serigrafiados desechables. Esta metodología presenta varias ventajas:

- Permite disponer de electrodos idénticos.
- Al ser desechables evitan todo el proceso de limpieza habitual en los electrodos sólidos.
- Los electrodos se pueden construir de acuerdo con las características de cada problema de análisis, pudiéndose seleccionar la composición de los electrodos al imprimir la pasta elegida modificada convenientemente, aumentando así la afinidad con el analito de interés. De igual manera, pueden incorporarse metales y nanomateriales, así como enzimas.
- Un gran número de unidades de tres electrodos de reducido tamaño, se imprimen simultáneamente. Estas unidades se

conectan fácilmente a un potenciostato portátil, constituyendo así un medio adecuado para realizar análisis “in situ”.

En esta memoria se describen diferentes métodos electroquímicos desarrollados para la determinación de Tyr basados en el empleo de biosensores desechables que implican la utilización de electrodos serigrafiados (SPEs). Este tipo de dispositivos ha sido también utilizado para llevar a cabo la determinación simultánea de Cr(III) y Cr(VI) en diferentes muestras acuosas empleando sistemas electródicos provistos de dos electrodos de trabajo diferentes.

El trabajo experimental desarrollado en la presente Tesis Doctoral se divide en 4 capítulos. En el capítulo 3, se describe la determinación electroquímica de Tyr utilizando el enzima PAO mediante cronoamperometría, empleando SPEs de carbono (SPCEs). En una primera etapa se lleva a cabo la optimización de las condiciones de inmovilización del enzima sobre la superficie electródica, seguida de una segunda etapa en la que se seleccionan las condiciones experimentales de medida óptimas para la determinación de Tyr. Finalmente, el método desarrollado se aplica en el análisis de una muestra de queso brie comercial.

En el capítulo 4, se detalla la determinación cronoamperométrica de Tyr utilizando en esta ocasión SPCEs modificados con el enzima horseradish peroxidasa (HRP). En esta sección se desarrollan dos tipos de biosensores diferentes: un biosensor basado en la inmovilización del enzima sobre el SPCE (HRP/SPCE) y un biosensor basado en el serigrafiado del propio enzima (SPC_{HRPE}). En ambos casos se realiza un proceso de optimización tanto de factores experimentales que influyen la respuesta electroquímica, así como de las variables que afectan directamente al proceso de inmovilización y serigrafiado del enzima. Los biosensores construidos son perfectamente validados mediante la determinación de su capacidad de detección y precisión. Finalmente, el biosensor basado en el

empleo de $\text{SPC}_{\text{HRP}}\text{Es}$ se utiliza en el análisis de una muestra de queso brie comercial.

El desarrollo de un método que permite la determinación simultánea de cromo en los estados de oxidación III y VI mediante voltamperometría diferencial de impulsos (DPV) utilizando SPCEs , se describe en el capítulo 5. El método se basa en la utilización de sistemas electroquímicos que constan de dos electrodos de trabajo dispuestos en modo “array”. Uno de los electrodos es modificado con una película de mercurio y el otro con nanopartículas de oro (AuNPs). Una vez establecidas las condiciones experimentales óptimas que permiten determinar ambas especies de forma simultánea, sin interferir la presencia de una especie de cromo en la determinación de la otra, el sensor desarrollado es aplicado al análisis de una muestra de agua residual de una industria peletera.

Por último, en el capítulo 6, se lleva a cabo la especiación de cromo en los estados de oxidación III y VI mediante cronoamperometría utilizando SPCEs modificados con diferentes enzimas. La determinación de ambas especies implica la utilización de sistemas electroquímicos basados en la utilización de dos electrodos de trabajo dispuestos en modo “array”. Uno de los electrodos es modificado con el enzima tirosinasa y el otro con el enzima glucosa oxidasa (GOx). Esta determinación es posible debido al efecto inhibitorio que presentan ambas especies de cromo sobre distintas enzimas.

2. *FUNDAMENTOS TEÓRICOS*

2.1. SENSORES Y BIOSENSORES

Los sensores y biosensores químicos han adquirido actualmente un interés renovado debido a las urgentes necesidades de disponer de más y mejor información analítica en condiciones no convencionales. Los sensores químicos representan una nueva clase de instrumentación analítica, caracterizada por sus reducidas dimensiones, bajo coste, fácil utilización y generación de la información en tiempo real.

Un sensor químico está formado por dos partes bien diferenciadas (Figura 2.1.) [1]. Un elemento de reconocimiento molecular o iónico (receptor) que interacciona selectivamente con un determinado componente de la muestra (analito), y un elemento instrumental (transductor) que traduce la interacción en una señal procesable. Ambas partes pueden encontrarse más o menos integradas, pero en todo caso conectadas, ya que

la señal primaria generada en la reacción de reconocimiento (de tipo electroquímico, óptico, térmico o másico) será convertida por el transductor en una señal secundaria. Cuando el material receptor tiene una procedencia biológica (enzimas, anticuerpos o ADN), los sensores químicos son denominados biosensores [2].

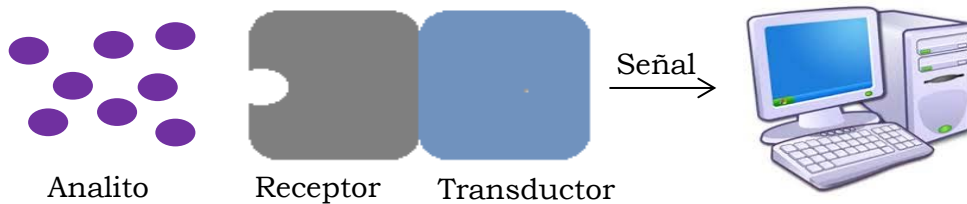


Figura 2.1.: Esquema de un sensor.

La clasificación de los sensores y biosensores se puede realizar atendiendo a diferentes criterios, como son el tipo de receptor utilizado, la metodología empleada para inmovilizar este receptor o el tipo de transductor utilizado, siendo ésta última la más aceptada [3]. En la tabla 2.1. se recogen los distintos tipos de sensores y biosensores según este último criterio:

Tabla 2.1.: Clasificación de sensores y biosensores según el tipo de transductor empleado

ÓPTICO	Transforman los cambios producidos por la interacción de un analito con el receptor en una señal óptica
ELECTROQUÍMICO	La señal transformada es debida a una interacción electroquímica entre el analito y el electrodo
PIEZOELÉCTRICO	Transforman un cambio de masa que tiene lugar sobre un electrodo modificado con materiales con propiedades piezoeléctricas
TÉRMICO	Dispositivos capaces de medir cambios en la concentración de un sustrato usando la variación de entalpía de una reacción enzimática

En los siguientes apartados se llevará a cabo una descripción más detallada de los sensores electroquímicos, ya que éstos han sido los empleados a lo largo de todo el trabajo reflejado en la presente memoria.

2.1.1. Sensores Electroquímicos

Los sensores basados en transductores electroquímicos han sido los más empleados en los últimos años. Esto se debe al hecho de que estos dispositivos son más robustos, su fabricación es más simple y económica que la del resto de transductores, y además, poseen un amplio intervalo de linealidad y tiempos de respuesta muy cortos.

Así mismo, los equipos necesarios para recoger y procesar la señal, tales como potenciostatos y conductímetros, son económicos, de fácil mantenimiento, manejo y miniaturización, y son de uso común en la mayoría de laboratorios de análisis.

Existen tres grandes grupos de transductores electroquímicos clasificados según la técnica electroquímica utilizada para obtener la información de la muestra:

- Conductimétricos
- Potenciométricos
- Amperométricos

Los sensores electroquímicos amperométricos son los utilizados con mayor frecuencia en análisis químico. Este tipo de dispositivos se basan en la aplicación de un potencial fijo sobre un electrodo de trabajo, generalmente de platino, oro o grafito, respecto a un electrodo de referencia. Un tercer electrodo, denominado auxiliar, es necesario en la mayoría de los casos para completar la celda electroquímica.

2.1.2. Biosensores electroquímicos

El concepto de biosensor implica que el elemento de reconocimiento biológico este en íntimo contacto con el elemento transductor. Este contacto deber ser permanente, por lo que los materiales biológicos tienen que estar fijados a la superficie del transductor [4]. Este proceso de fijación del material biológico se denomina inmovilización.

La inmovilización del material biológico es un proceso mediante el que se confina el bioreceptor sobre el transductor electroquímico, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad. Es el proceso más importante en la fabricación de un biosensor, ya que características tan importantes como el tiempo de vida o la sensibilidad, dependen en gran medida de la metodología de inmovilización utilizada.

El uso de material biológico inmovilizado aporta importantes ventajas en la construcción de biosensores electroquímicos. Entre estas ventajas destacan:

- Aumento de la estabilidad del receptor biológico.
- Posible reutilización del biosensor, disminuyendo el coste del proceso.

Los principales inconvenientes a destacar dentro del proceso de inmovilización son:

- Alteración de la conformación del material biológico respecto de su estado nativo.
- En el caso de la utilización de enzimas, pérdidas de su actividad catalítica.

Existen diferentes tipos de bioreceptores que se pueden inmovilizar sobre transductores electroquímicos, generando dos tipos diferentes de biosensores:

- Biosensores catalíticos: el elemento biológico puede ser un enzima, que puede encontrarse aislada, en un tejido orgánico, etc. Estos biosensores son los más habituales.
- Biosensores de afinidad: inmunosensores y quimiorreceptores, el elemento biológico es un anticuerpo o receptor.

Los enzimas son los elementos más comúnmente utilizados para la fabricación de biosensores debido a su selectividad, bajo coste, disponibilidad en el mercado y fácil manipulación. Fueron los primeros bioreceptores utilizados, y siguen siendo hoy en día los más empleados para la fabricación de biosensores. Entre los inconvenientes que presenta la utilización de enzimas en la construcción de biosensores, se encuentra la aparente pérdida de actividad enzimática cuando éstos son inmovilizados sobre la superficie del electrodo. Igualmente, el tiempo de vida que presentan los biosensores enzimáticos suele ser relativamente corto.

Otra forma de llevar a cabo la clasificación de los biosensores electroquímicos es la basada en el tipo de transductor electroquímico empleado (Tabla 2.2.).

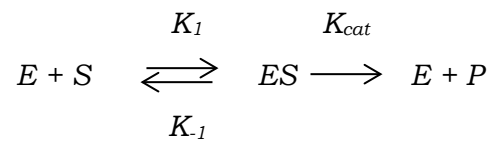
Tabla 2.2.: Clasificación de biosensores según el tipo de transductor electroquímico empleado

TRANSDUCTOR ELECTROQUÍMICO	TIPO DE MEDIDA
Conductimétrico	Variación en la conductividad del medio
Potenciométrico	Diferencia de potencial
Amperométrico	Corriente generada por reacciones redox de especies electroactivas
Impedimétrico	Cambios registrados en la impedancia

2.1.2.1. Enzimas

Desde el punto de vista químico, los enzimas son macromoléculas formados de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, y azufre combinados, que presentan propiedades catalíticas específicas. Los enzimas son catalizadores de naturaleza proteínica altamente específicos que aumentan notablemente la velocidad a la que tienen lugar los procesos fisiológicos, producidos por los organismos vivos, sin consumirse en el proceso [5].

En una reacción catalizada por un enzima, la sustancia sobre la que actúa el enzima se llama **sustrato**. El sustrato se une a una región concreta del enzima, llamado **centro activo** [6]. El mecanismo básico que describe una reacción enzimática que involucra un único sustrato, es el siguiente:



donde S es el sustrato, E el enzima, ES el complejo enzima-sustrato y P el producto.

Para una concentración de enzima, la velocidad de reacción catalizada enzimáticamente viene dada por la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v_0 = \frac{v_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

donde v_{max} es la máxima velocidad de reacción y K_M es la constante de Michaelis, que corresponde a la concentración de sustrato para la que la velocidad de reacción es igual a la mitad de la velocidad máxima [7].

En la figura 2.2. se muestra la variación de la velocidad de reacción enzimática con la concentración de sustrato, señalándose los valores de los parámetros K_M y v_{max} , y las zonas donde la señal obtenida es útil para la determinación de la concentración de sustrato y de la actividad enzimática. Desde el punto de vista analítico, a medida que la constante de Michaelis aumenta, la sensibilidad del método disminuye, aunque se amplía el intervalo de linealidad.

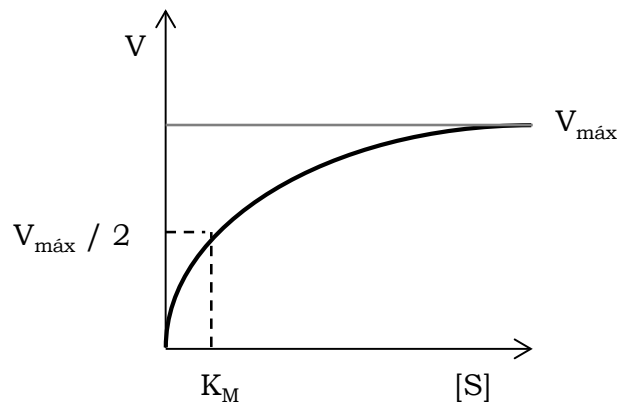


Figura 2.2.: Representación gráfica de la curva de saturación de un enzima donde se puede observar cómo evoluciona la relación entre la concentración de sustrato y la velocidad de la reacción.

Las propiedades de los enzimas derivan del hecho de ser proteínas y de actuar como catalizadores [7, 8]. Como proteínas, poseen una conformación natural más estable que las demás conformaciones posibles. Así, cambios en la conformación suelen ir asociados en cambios en la actividad catalítica.

Los factores que influyen de manera más directa sobre la actividad de un enzima son:

- *pH*: los enzimas poseen grupos químicos ionizables (carboxilos, amino, tiol, imidazol, etc.) en las cadenas laterales de sus aminoácidos. Según el pH del medio, estos grupos pueden tener

carga eléctrica positiva, negativa o neutra. Como la conformación de las proteínas depende, en parte, de sus cargas eléctricas, habrá un pH en el cual la conformación será la más adecuada para la actividad catalítica. Este es el llamado **pH óptimo**.

- **Temperatura:** en general, un aumento de la temperatura produce una aceleración de las reacciones químicas. Las reacciones catalizadas por enzimas siguen esta ley general. Sin embargo, al ser proteínas, a partir de cierta temperatura, se empiezan a desnaturalizar por el calor. La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se llama **temperatura óptima**. Por encima de esta temperatura, el aumento de velocidad de la reacción debido a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica debida a la desnaturalización térmica, y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse.
- **Cofactores:** a veces, un enzima requiere para realizar su función catalítica la presencia de sustancias no proteicas que colaboran en la catálisis: los cofactores. Cuando el cofactor es una molécula orgánica se llama **coenzima**.

La mayor parte de los enzimas catalizan la transferencia de electrones, átomos o grupos funcionales. Existen numerosos tipos de enzimas que actúan sobre un gran número y tipo de sustratos.

La clasificación de dichos enzimas se realiza por convenio internacional teniendo en cuenta las reacciones que cada enzima ejerce sobre el sustrato. Atendiendo a esta forma de clasificación, es posible distinguir entre seis grupos diferentes de enzimas. Estos grupos son los mostrados en la tabla 2.3. donde se recoge además el tipo de reacción catalizada por cada grupo enzimático [6].

Tabla 2.3.: Clasificación Internacional de los enzimas

Nº	CLASE	TIPO DE REACCIÓN CATALIZADA
1	OXIDO-REDUCTASAS	Transferencia de electrones (iones hidruro o átomos de H). Debido a esta capacidad redox, son el candidato ideal para su utilización como bioreceptores en biosensores amperométricos
2	TRANSFERASAS	Reacciones de transferencia de grupos
3	HIDROLASAS	Reacciones de hidrólisis (transferencia de grupos funcionales al agua)
4	LIASAS	Adición de grupos a dobles enlaces, o formación de dobles enlaces por eliminación de grupos
5	ISOMERASAS	Transferencia de grupos dentro de moléculas dando formas isoméricas
6	LIGASAS	Formación de enlaces C-O, C-S, C-N y C-C mediante reacciones de condensación acopladas a la rotura de ATP

2.1.2.1.1. Mecanismo de acción del enzima

Para que una reacción química tenga lugar, las moléculas de las especies que reaccionan deben chocar con una energía y una orientación adecuadas.

La actuación del enzima permite que los sustratos se unan a su centro activo con una orientación óptima para que la reacción se produzca y modifica las propiedades químicas del sustrato unido a su centro activo, debilitando los enlaces existentes y facilitando la formación de otros nuevos.

Hay dos modelos que explican la forma en que el sustrato se une al centro activo del enzima [8-10]:

- *Modelo llave-cerradura*: supone que la estructura del sustrato y la del centro activo son complementarias, de la misma forma que una llave encaja en una cerradura. Este modelo es válido en muchos casos, pero no es siempre correcto.
- *Modelo de ajuste inducido*: en algunos casos, el centro activo adopta la conformación idónea sólo en presencia del sustrato. La unión del sustrato al centro activo del enzima desencadena un cambio conformacional que da lugar a la formación del producto.

2.1.2.1.2. Inhibición enzimática

La actividad de un enzima puede ser reducida o eliminada completamente por la acción de ciertas sustancias conocidas con el nombre genérico de **inhibidores enzimáticos**. Muchos inhibidores son agentes que desnaturalizan a los enzimas, ya que éstos son moléculas proteínicas, susceptibles a una diversidad de agentes, especialmente químicos, como aniones complejos o metales pesados, etc. A menudo estos agentes que impiden la actividad enzimática actúan sobre casi todos los enzimas, lo que demuestra que su acción no es específica, sino que afectan a toda molécula proteínica. Otras sustancias bloquean específicamente determinadas reacciones enzimáticas y su especificidad es tal, que sólo cierto sustrato y cierto enzima son los susceptibles de ser afectados.

La inhibición enzimática es de gran importancia fisiológica [11], ya que a veces la inhibición de un solo enzima que forma parte de una cadena de reacciones metabólicas puede inhibir por completo a todo el proceso metabólico involucrado y ejercer en esa forma un efecto profundo y a veces

fatal sobre el organismo. Los inhibidores pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- **Irreversibles:** el enzima no recobra su actividad al eliminar el inhibidor del medio. Esto es debido a que el inhibidor irreversible, actúa por lo general modificando irreversiblemente o destruyendo algunos de los grupos esenciales del centro activo.
- **Reversibles:** el enzima recobra su actividad al eliminar el inhibidor del medio. Se trata de procesos en los que el inhibidor también interactúa con algún grupo esencial del enzima, pero lo hace de forma reversible. Las distintas formas de interacción se traducen en varios tipos de inhibición perfectamente diferenciables experimentalmente (Figura 2.3.):
 - En la **inhibición competitiva** el inhibidor se combina reversiblemente con el enzima en el sitio por el cual se debería unir el sustrato, impidiendo por lo tanto la formación del complejo activo enzima-sustrato, ya que se bloquea el centro activo del enzima. De ahí el nombre de competitiva porque efectivamente tanto el inhibidor como el sustrato compiten por el mismo sitio y tratan de desplazarse mutuamente de la enzima. Este efecto de inhibición puede reducirse aumentando la concentración de sustrato. En este tipo de inhibidores se incluyen sustancias que estructuralmente son muy parecidas al sustrato.
 - En la **inhibición no competitiva**, el inhibidor se une con el enzima en un sitio diferente al que se une al sustrato. Por esa razón la unión del sustrato con el enzima no es afectada por la presencia del inhibidor y se puede formar entonces un complejo enzima-sustrato-inhibidor. Este complejo es catalíticamente inactivo y no puede escindirse en productos de la reacción y complejo enzima-inhibidor. Este tipo de inhibición se

caracteriza entonces porque no puede ser reducido por un aumento de la concentración de sustrato. Es decir, el sustrato no puede desplazar al inhibidor unido al enzima.

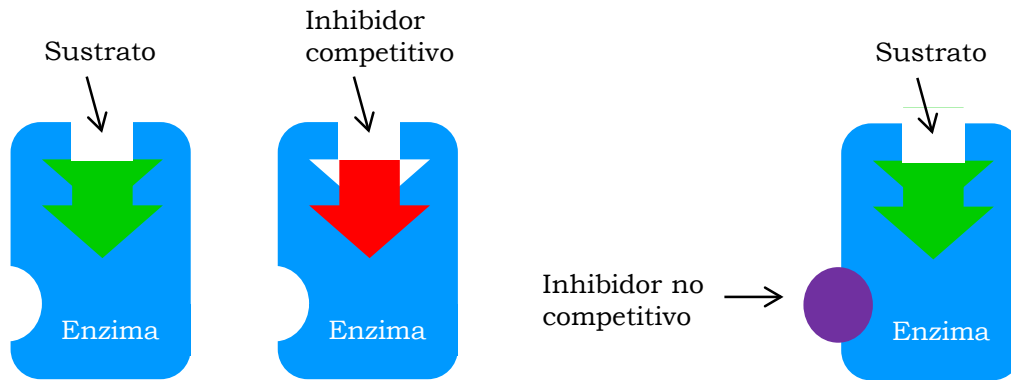


Figura 2.3.: Esquema de los distintos tipos de inhibición enzimática.

Las propiedades que presentan los enzimas como elementos de biorreconocimiento en el desarrollo de biosensores electroquímicos son las siguientes:

- Alta selectividad para un sustrato (o una familia de sustratos).
- Mecanismo de acción bien caracterizado.
- Mecanismo catalítico rápido y sensible.
- Posibilidad de integración a distintos modos de transducción.
- Posibilidad de transducción directa y continua.
- Disponibilidad de materiales enzimáticos de distinta clase, origen, actividad y estabilidad.
- Posibilidad de determinar grupos de sustancias mediante enzimas selectivos a esos grupos o mediante la inhibición enzimática que producen determinados grupos sobre ciertos enzimas.
- Procedimientos de inmovilización bien establecidos.
- Reutilizables.

- Producción masiva.
- Precio moderado.

2.1.2.1.3. Métodos de inmovilización

El proceso de construcción de biosensores electroquímicos con propiedades analíticas implica la inmovilización del enzima sobre la superficie electródica. Existen diversas formas de llevar a cabo dicho proceso que incluyen principalmente métodos de retención física, de unión química y biocompositos (Figura 2.4.).

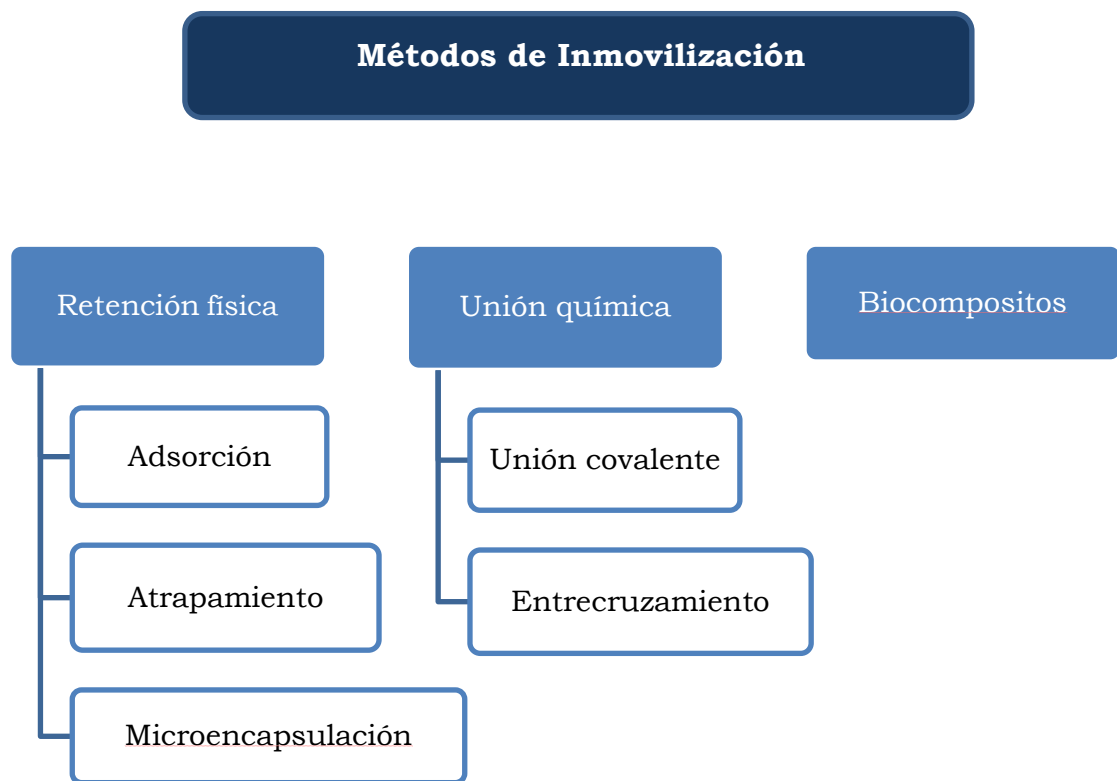


Figura 2.4.: Clasificación de los métodos de inmovilización.

Métodos de inmovilización por retención física

- *Adsorción*

La inmovilización mediante adsorción puede considerarse como el procedimiento más simple y menos agresivo. Se trata de un proceso que no requiere de reactivos especiales y, en el que los materiales biológicos adsorbidos guardan intacta su actividad, ya que la unión tiene lugar únicamente debido a interacciones iónicas, fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno. Es además un método sencillo, de bajo coste y que no implica cambios de especificidad enzimática, pero presenta como inconvenientes su baja estabilidad desde el punto de vista mecánico, ya que la unión con el soporte es débil y no es muy reproducible. Los procesos de adsorción enzimática se ven además afectados por numerosos factores tales como el pH del medio, fuerzas iónicas, la temperatura o la presencia de otros iones [12-14].

- *Atrapamiento*

El atrapamiento consiste en la retención física del enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa, constituida generalmente por monómeros fotocurables o polímeros del tipo poliacrilamina, PVC, colágeno, etc. También se suelen utilizar hidrogeles como poly(2-hydroxyetil metacrilato), o polímeros conductores, como el polipirrol [15-18]. Se trata de una técnica sencilla desde el punto de vista experimental, y no requiere de una gran cantidad de material biológico. Este método de inmovilización preserva la actividad biológica, pero la biomolécula no queda bien retenida, creándose barreras de difusión que limitan el transporte del substrato y alargan la respuesta del biosensor. Se requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, ya que pueden alterarse los grupos reactivos de la proteína, lo que provocaría pérdidas en la actividad enzimática.

- *Microencapsulación*

En el procedimiento de inmovilización mediante microencapsulación se emplean membranas semipermeables que retienen el material biológico sin necesidad de reactivos de ningún tipo. Dichas membranas semipermeables permiten que las moléculas de sustrato y productos pasen a través de ellas, pero no permiten el paso de las moléculas del enzima. Este método permite que el material biológico entre en contacto directo con el transductor, y, a su vez, mantiene la alta selectividad de los enzimas, dado que no se ven afectados por los cambios en el pH, la temperatura o la fuerza iónica del medio, debido a la existencia de la membrana.

Métodos de inmovilización por unión química

- *Unión covalente*

Este tipo de inmovilización produce una disminución significativa de la actividad del enzima, sin embargo, permite obtener superficies estables modificadas biológicamente, que proporcionan biosensores con tiempos de vida elevados. La inmovilización covalente se basa en la activación de grupos químicos en el sustrato de modo que reaccionen con los nucleófilos de la proteína. La reactividad de la superficie de inmovilización se logra normalmente mediante la reacción con compuestos de activación, tales como, N-hidroxisuccinimida o carbodiimida. De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de los enzimas, los más empleados para la formación de enlaces covalentes son principalmente la lisina, la cisteína, la arginina y los ácidos aspártico y glutámico. El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, y no pueden intervenir en la unión covalente. Se requiere

un control de los parámetros pH y fuerza iónica del medio. Además la superficie del transductor debe estar perfectamente limpia.

- *Entrecruzamiento*

La inmovilización mediante entrecruzamiento implica la formación de enlaces intramoleculares entre el enzima y reactivos bifuncionales de entrecruzamiento (dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos, etc). Los agentes de entrecruzamiento más utilizados son: glutaraldehído (GA) y diisocianato de hexametileno. El entrecruzamiento puede alterar los centros activos del enzima, por esto es aconsejable mezclarla con una proteína no activa y rica en residuos de lisina como la seroalbumina bovina (BSA), para que ambas se entrecrucen y se repartan el efecto indeseable del agente bifuncional, preservándose de esta forma, la actividad enzimática.

Biocompositos

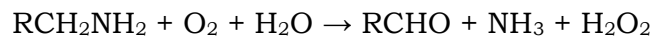
Este tipo de inmovilización no se trata de una modificación superficial, sino de una integración del componente biológico en el transductor. Es posible preparar un material que integra en su seno el transductor (grafito en polvo), el enzima, los posibles mediadores o cofactores, y un material aglomerante que hace la función de matriz de soporte.

2.1.2.1.4. Enzimas empleadas en la construcción de biosensores

En este apartado, se describen brevemente cada una de los enzimas utilizados a lo largo del trabajo desarrollado para la construcción de los diferentes biosensores electroquímicos.

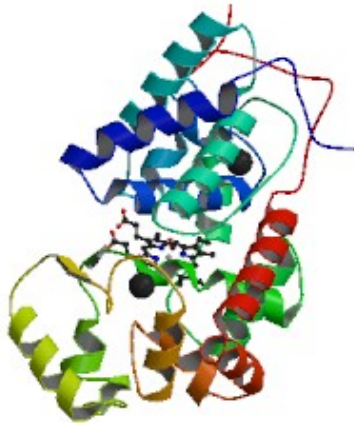
2.1.2.1.4.1. Plasma amino oxidasa

El enzima PAO, es un tipo de enzima AO (EC 1.4.3.21). Los enzimas AO se dividen en dos grupos, los que contienen átomos de cobre en su estructura como es el caso del enzima PAO y las que contienen el grupo flavín adenín dinucleótido (FAD). Todas las aminas activas son sustratos naturales, ya que estos enzimas catalizan reacciones del tipo:



El enzima PAO está compuesto por dos cadenas polipeptídicas iguales, con dos átomos de cobre y dos fosfatos de piridoxal por molécula.

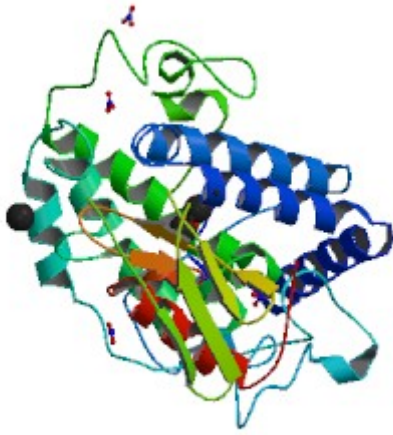
2.1.2.1.4.2. Horseradish Peroxidasa



Las peroxidases (EC 1.11.1.7) pertenecen a la categoría de las oxidorreductasas. La mayoría de las peroxidases son glicoproteínas de 20-70 kD de peso molecular, y contienen un grupo férrico de protoporfirina IX como grupo prostético, denominado citocromo C.

Las peroxidases producen, con la participación del peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones, la oxidación monoelectrónica de un amplio espectro de sustratos orgánicos e inorgánicos. El enzima HRP recibe su nombre de la fuente de la que se obtiene, el rábano picante.

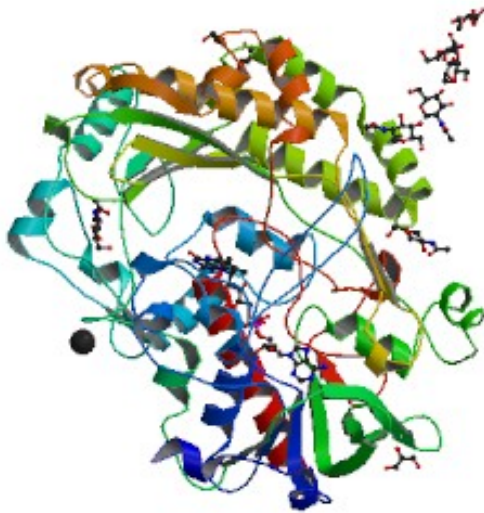
2.1.2.1.4.3. Tirosinasa



La tirosinasa (monofenol monooxigenasa) (EC 1.14.18.1) es un enzima que cataliza la oxidación de monofenoles y catecoles a o-quinonas. La tirosinasa es una enzima cuprífera, contiene cobre como cofactor, presente en tejidos de plantas y animales que actúa en la biosíntesis de los pigmentos de melanina en la piel de los invertebrados y en la

biosíntesis de compuestos polifenólicos (la mayoría de los cuales poseen una actividad antibiótica) en plantas y microbios.

2.1.2.1.4.4. Glucosa oxidasa



El enzima GOx (EC 1.1.3.4) es una oxidorreductasa que cataliza la oxidación de la glucosa para formar peróxido de hidrógeno y D-glucono- δ -lactona. En las células contribuye a degradar los azúcares hacia sus metabolitos. Este enzima es ampliamente utilizado para la determinación y cuantificación de glucosa libre en los fluidos biológicos, tales como sangre y

orina, en materia prima vegetal y en la industria de los alimentos. Tiene además numerosas aplicaciones en biotecnología, y se utiliza para la fabricación de biosensores sensibles a glucosa. Usualmente se extrae de *Aspergillus niger*.

2.1.3. Biosensor enzimático amperométrico

La primera publicación científica sobre un biosensor amperométrico basado en la utilización de enzimas como elementos biológicos fue descrita por Clark y Lions para la determinación de glucosa en sangre y se remonta a 1962 [19]. Desde entonces, estos dispositivos, especialmente los utilizados para la determinación de glucosa, han sido de los más estudiados.

Estos biosensores amperométricos combinan la elevada selectividad de los enzimas con la simplicidad de los transductores amperométricos. En este tipo de dispositivos, el analito difunde, primero a través de la disolución y después a través de la membrana (en el caso de existir), hasta entrar en contacto con el centro activo del enzima, donde reacciona formando un producto, generalmente con propiedades redox. Éste es oxidado o reducido sobre el electrodo, generando un producto que difunde de nuevo a la disolución. La intensidad recogida mediante amperometría es proporcional a la concentración del analito.

La reacción electroquímica suele ser mucho más rápida que la enzimática, por tanto no se puede considerar un paso limitante del mecanismo global.

Se han desarrollado diferentes métodos para la transferencia de electrones entre el enzima y el transductor amperométrico, lo que permite diferenciar tres generaciones de biosensores amperométricos:

- **Primera Generación**

Están basados en la medida de uno de los productos o del cofactor de la reacción enzimática. Por tanto, es necesario que la sustancia analizada tenga propiedades electroquímicas.

▪ **Segunda Generación**

La segunda generación de biosensores incorpora un mediador que se encarga de la transferencia electrónica entre el centro activo del enzima y la superficie del electrodo. El mediador debe reaccionar de manera rápida con el centro activo, minimizando así la competición con el cofactor natural del enzima. Es necesario también que tenga buenas propiedades electroquímicas, por ejemplo un potencial redox próximo a cero, con lo que se consiguen eliminar las reacciones redox de posibles interferentes. Los mediadores más utilizados, libres en disolución o inmovilizados junto con los enzimas, son entre otros el par ferri/ferrocianuro, 1,4-benzoquinona, derivados del ferroceno, tetracianoquinodimetano (TCNQ), tetratiafulvaleno (TTF), azul de Meldola y azul de metileno. El primer biosensor de segunda generación data de 1984, fue desarrollado por Cass y Davis, con ferroceno como mediador [20].

▪ **Tercera Generación**

En los biosensores de tercera generación la transferencia electrónica entre el centro activo del enzima y la superficie del electrodo se realiza de forma directa. Este tipo de biosensores muestra una mayor selectividad, puesto que trabajan a potenciales muy próximos a los intrínsecos del enzima, quedando menos expuestos a posibles interferentes. Una de las mayores dificultades en la construcción de este tipo de biosensores es como optimizar la transferencia electrónica entre el centro activo del enzima y la superficie del electrodo. La gran mayoría de enzimas tiene el centro activo en su interior y hace imposible un contacto directo entre éste y la superficie del transductor. Uno de los enzimas más viables para su utilización en este tipo de biosensores es la HRP ya que su centro activo no está en el interior.

2.1.4. Electrodo serigrafiado

Los SPEs más comunes son los producidos por la tecnología “thick film” (capas gruesas) [21-23]. Esta tecnología implica un método de impresión directa muy conocido y que ha sido utilizado con éxito en la construcción de electrodos miniaturizados desechables desde 1900. En los últimos años se ha convertido en un método para la producción en masa y con un bajo coste de dispositivos desechables [24-30], debido al interés creciente por métodos de análisis simples, sensibles, rápidos y baratos en campos ambientales, clínicos, industriales, etc.

Un electrodo serigrafiado producido por este tipo de tecnología consta de diferentes capas de diferentes pastas depositadas secuencialmente sobre un soporte o sustrato a través de una pantalla o malla, de tal manera que la tinta pasa a través de los espacios abiertos en la pantalla para ser impresos en el sustrato, definiendo de este modo la geometría del dispositivo.

Los problemas de reproducibilidad asociados al uso de electrodos sólidos, que requieren la regeneración de la superficie del electrodo después de cada uso, constituyen el mayor inconveniente para el desarrollo de electrodos comerciales sólidos. En este sentido, los electrodos serigrafiados, debido a su carácter desechable se presentan como una clara alternativa, evitando los tratamientos físico-químicos y electroquímicos de limpieza habituales en los electrodos convencionales.

Otra de las ventajas que presentan es la posibilidad de la total automatización en la fabricación de un sistema completo que contiene los tres electrodos (electrodo de trabajo, auxiliar y referencia) impresos en un mismo sustrato. Además la facilidad de miniaturización, los hace adecuados para ser integrados en equipos ligeros y portátiles, que permiten análisis “in situ”. Otra de las ventajas que presenta el uso de biosensores miniaturizados es el mínimo consumo de reactivos. Disponer de un área de

trabajo mucho menor requiere menor cantidad de material biológico, y permite trabajar con volúmenes de muestra más pequeños. Todas las características anteriores, añadidas a su diseño flexible, versatilidad y a la gran posibilidad de modificaciones que permite obtener una gran variedad de electrodos diferentes, hacen de esta tecnología un campo emergente para la producción de sensores y biosensores.

2.1.4.1. Construcción de electrodos serigrafiados

El proceso de fabricación de SPEs consiste básicamente en pasar la tinta a través de una pantalla para depositarla sobre un sustrato plano con el fin de imprimir el electrodo. Un dibujo esquemático del electrodo que se define por los poros de los substratos se reproduce sobre el mismo sustrato (Figura 2.5.).

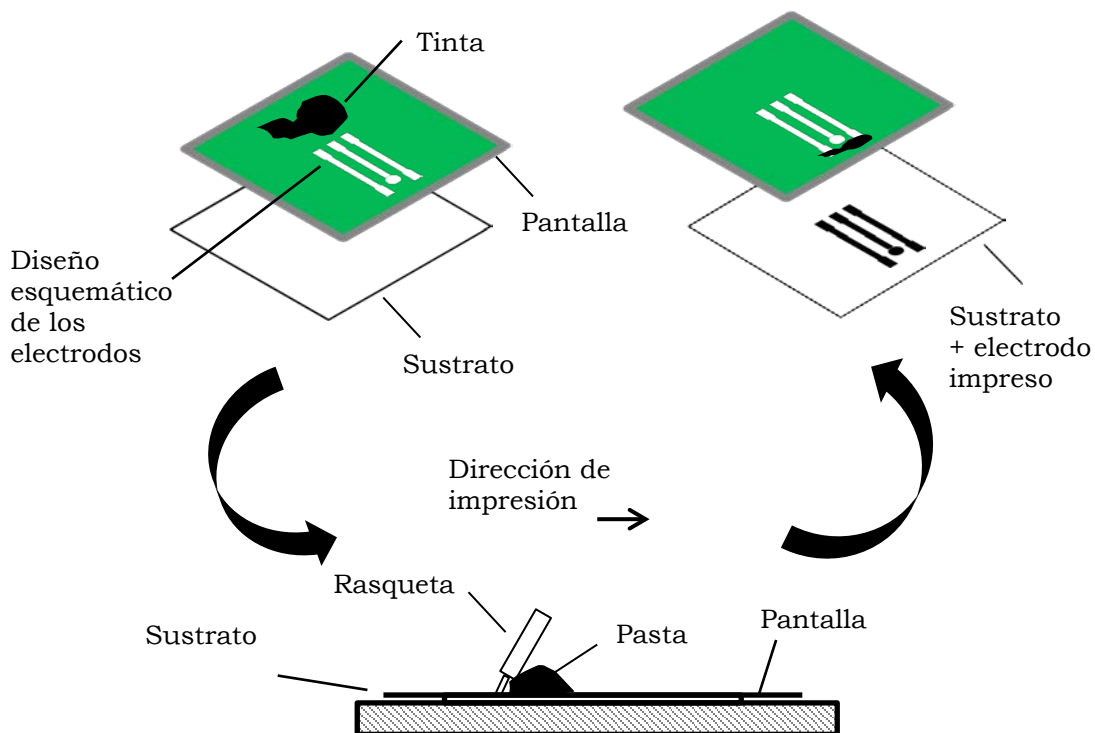


Figura 2.5.: Representación esquemática del proceso de serigrafado.

Normalmente, repetidas combinaciones de diferentes pantallas y tintas se emplean para la fabricación de los tres electrodos (trabajo, referencia y contraelectrodo) que componen el dispositivo (Figura 2.6.).

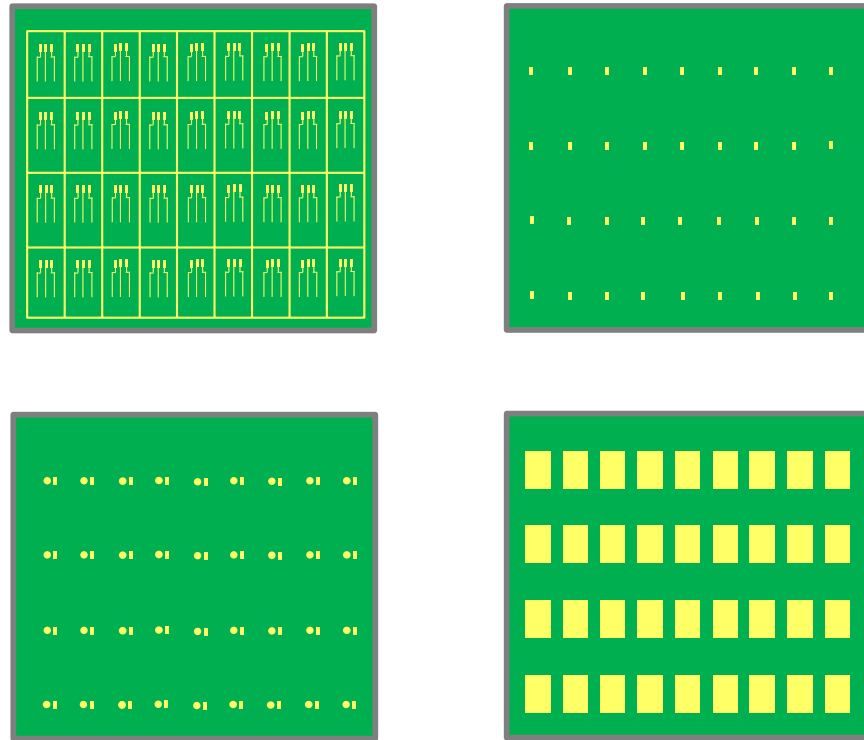


Figura 2.6.: Representación esquemática de las diversas pantallas utilizadas en la construcción de los electrodos serigrafiados.

La etapa final de la impresión consiste en aplicar una capa de aislamiento parcial, con el fin de definir el área de contacto eléctrico en un extremo, y la superficie del electrodo en el otro, y de esta forma la geometría del sensor.

Debido al gran uso en los últimos años de los procesos de serigrafía en la industria, diversos dispositivos de fabricación y materiales están disponibles comercialmente [29, 31].

El esquema mostrado en la figura 2.7. muestra las etapas básicas del proceso de fabricación de los SPEs.



Figura 2.7.: Esquema de las etapas necesarias en la construcción de electrodos serigrafiados.

Materiales y métodos

Sustrato

El sustrato es el material de soporte que proporciona una superficie para la impresión de las partes funcionales y constructivas del sensor. En general, el sustrato debe ser robusto, de bajo coste, compatible con los demás elementos del sensor y por supuesto de un material inerte. El PVC [32-38], ha sido uno de los materiales más utilizados como sustrato debido a que cuenta con propiedades dieléctricas, inercia química y, presenta además, un bajo coste y una alta manejabilidad. Otros materiales utilizados como sustrato son: cerámica de alúmina [39, 40], policarbonato [41], nitrocelulosa [42], acero esmaltado y poliéster [43-62].

Tintas y pastas

Las tintas o pastas se depositan secuencialmente a través de pantallas sobre el sustrato para formar las partes funcionales y estructurales de los sensores. Existe una amplia gama de tintas con diferentes propiedades físicas y químicas (conductividad, viscosidad, resistencia térmica, etc). Muchas de ellas se pueden obtener de casas comerciales especializadas.

Se pueden clasificar en dos categorías principales:

- *Tintas conductoras*: las tintas conductoras forman las pistas conductoras y los electrodos de los sensores. El material conductor puede ser oro, plata, polvo de carbono o platino, que se dispersa en un agente aglomerante (vidrio pulverizado, resinas, etc.) empleando disolventes del tipo etilenglicol o ciclohexanona.
- *Tintas dieléctricas*: la tinta dieléctrica forma la capa de aislamiento o encapsulado del sensor, generalmente incorpora aditivos basados en óxidos metálicos o agentes aglomerantes de carácter aislante, como la alúmina.

Material sensor

El material sensor es la parte específica del biosensor hacia el analito. Puede ser incorporado directamente en el proceso de serigrafiado del electrodo (dando lugar a biocompositos) o bien, es posible fijarlo posteriormente empleando otros procesos de inmovilización.

En cualquier caso, se prefiere aplicar estos materiales en las últimas etapas del proceso de fabricación, para evitar pérdidas en la sensibilidad y

estabilidad por efecto de las condiciones extremas a las que se puede someter al elemento de reconocimiento.

2.1.4.2. Tipos de electrodos serigrafiados

Los SPEs pueden clasificarse en dos grupos en función de si la superficie del electrodo de trabajo ha sido modificada o no [63]:

- SPEs no modificados
- SPEs modificados

A continuación, se describen más detalladamente cada uno de los tipos de electrodos serigrafiados.

2.1.4.2.1. Electrodos serigrafiados no modificados

La elaboración de electrodos modificados desechables es sin duda uno de los objetivos más importantes del empleo de la tecnología “thick film”. Sin embargo, algunos trabajos muestran que el uso de SPEs no modificados representa una alternativa extremadamente atractiva frente al uso de electrodos sólidos convencionales de mercurio, carbón vítreo, metales nobles y pasta de carbono en electroanálisis.

En la bibliografía, son pocas las referencias encontradas en las que se utilicen SPEs no modificados, entre ellas, se encuentra la determinación de compuestos orgánicos del tipo aurotiomalato (compuesto útil en el diagnóstico de artritis reumatoide) en muestras de orina, llevada a cabo con SPEs de pasta de carbono [64]. O la determinación de vitamina B2 en muestras alimentarias propuesta por Kadara [65]. También han sido determinados utilizando SPEs no modificados, principios activos del tipo

procaína [66] y codeína [67], y antibióticos como lincomicina [68] en miel y leche.

Los SPEs no modificados se han utilizado también con bastante éxito en el análisis de compuestos de tipo inorgánico entre los que destacan los metales. De esta forma, se ha determinado plata mediante voltamperometría de onda cuadrada (SWV) [69], plomo [70] y cadmio [71] mediante DPASV en diferentes muestras acuosas.

La mayor parte de los SPEs utilizados en la determinación de los compuestos descritos anteriormente son electrodos de carbono, sin embargo existen otros trabajos en los que se emplean SPEs fabricados empleando tintas o pastas de metales nobles. Así, con SPEs de oro (SPAuEs) se ha logrado la determinación de plomo en agua de río utilizando mediante DPASV [72] y de arsénico en agua potable mediante voltamperometría de onda cuadrada de redisolución anódica (SWASV) [73]. Esta misma técnica se ha utilizado con éxito en la determinación de plomo en aguas naturales empleando SPEs fabricados con pasta de plata [74].

2.1.4.2.2. Electrodos serigrafados modificados

Hasta comienzos de la década de los 70 únicamente se empleaban electrodos inertes como el de mercurio, oro, carbono y platino en medidas electroanalíticas, sin embargo se observó que una modificación en la superficie inerte del electrodo puede dar lugar a una gran variedad de sensores que pueden aplicarse posteriormente en la determinación de diversos analitos de interés.

La modificación de un electrodo consiste en atribuir y controlar nuevas propiedades fisico-químicas a un electrodo inerte mediante el acoplamiento de especies químicas activas a su superficie [75].

Los procesos de modificación de electrodos más comunes implican la deposición de una película metálica, de nanopartículas metálicas o de enzimas. Esta modificación de los SPEs puede tener lugar durante el proceso de construcción de los mismos, o bien posteriormente.

2.1.4.2.2.1. Electrodos serigrafiados modificados con películas metálicas

La película metálica más utilizada es la de mercurio, aunque por razones de toxicidad, en los últimos años se han desarrollado sensores con otros metales. En este tipo de modificación, se deposita una fina capa de mercurio sobre un electrodo de carbono. Este tipo de electrodos se utilizan sobretodo en la determinación de metales, que se analizan fácilmente mediante técnicas de redisolución.

La primera determinación de un metal utilizando SPEs modificados con película de mercurio, fue llevada a cabo por Wang [76] con el objetivo de cuantificar plomo a nivel de trazas. Tras este primer trabajo, otros metales como cadmio, cobre, berilio, antimonio y zinc [77-83], han sido determinados electroquímicamente utilizando SPEs modificados con película de mercurio.

El mercurio es un elemento tóxico, por este motivo su incorporación en sensores se está sustituyendo por películas de otros metales menos contaminantes, para evitar así problemas medioambientales.

Uno de los metales más utilizados, después del mercurio, en la modificación de electrodos serigrafiados, es el bismuto [84].

La mayoría de referencias encontradas sobre SPEs modificados con películas de bismuto, describen aplicaciones relacionadas con determinaciones de metales pesados. Algunos ejemplos son la

determinación de cromo en muestras de agua de río [85], o la determinación de plomo y cadmio en extractos de suelo y aguas residuales [86], cadmio en muestras de saliva [87] así como, plomo y zinc en aguas residuales [88]. Además del bismuto, otros metales como por ejemplo el oro [32] han sido utilizados para modificar la superficie de SPEs y empleados posteriormente en la determinación de mercurio.

2.1.4.2.2.2. Electrodo serigrafado modificado con nanomateriales

La nanotecnología se define como el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a nanoescala, y la explotación de fenómenos y propiedades de dicha materia. El alto potencial de esta tecnología se debe al cambio en las propiedades físicas y químicas [89] (conductividad eléctrica, calor, resistencia, elasticidad, reactividad, etc) de la materia cuando se encuentra en escala nanométrica, debido a efectos cuánticos. Por este motivo en los últimos años, el interés por el empleo de nanomateriales en electroanálisis ha ido en aumento, con el objetivo de mejorar la selectividad y la sensibilidad. Los nanomateriales más frecuentemente empleados en electroquímica son las nanopartículas metálicas y los nanotubos de carbono.

Nanopartículas metálicas

La modificación con nanopartículas metálicas de SPEs presenta un gran interés debido a las excelentes propiedades que aportan éstas a la superficie electródica.

El uso de este tipo de sistemas presenta varias ventajas con respecto a los macroelectrodos del mismo material: mayor área superficial efectiva, mejor transporte de masa e incluso, en ocasiones, propiedades catalíticas que disminuyen el potencial al que se observan los procesos redox.

En los últimos años, son varias las referencias encontradas de trabajos que emplean SPEs modificados con nanopartículas metálicas, sobretodo de metales como oro, plata y platino. De esta forma se han determinado moléculas inorgánicas como sulfitos en muestras de agua, vinagre y jugo de pepinillo [90], cloruros [91] o agua oxigenada [92]. Se han analizado también metales como el cromo [93] y arsénico [94] en muestras de agua o antimonio en muestras de agua de río y preparados farmacéuticos [95].

Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono fueron descubiertos por S. Iijima en Japón mientras realizaba investigaciones sobre los fullerenos [96]. Se denominan nanotubos a estructuras tubulares cuyo diámetro es de orden nanométrico.

Actualmente es posible encontrar nanotubos de diferentes materiales como silicio o nitruro de boro, pero generalmente el término se aplica a los nanotubos de carbono. Los nanotubos de carbono han atraído un gran interés debido a sus excelentes propiedades estructurales, mecánicas y electrónicas, como una elevada estabilidad química y térmica, elevada elasticidad e incluso en algunos casos conductividad metálica. Su pequeño tamaño y conductividad les convierte en los electrodos más pequeños existentes, con diámetros inferiores a un nanómetro [97]. Los nanotubos de carbono han sido empleados para la determinación de compuestos orgánicos como son los aminoácidos [98], glutamato [99] o dopamina [100]. Además se han determinado metales como zinc, cadmio y plomo [101, 102].

2.1.4.2.2.3. Electrodo serigrafiado modificado con enzimas

Los enzimas han sido ampliamente utilizados en la construcción de biosensores ya que a pesar de su elevado coste de extracción, aislamiento y purificación, se unen de forma selectiva y rápida a los analitos.

Los enzimas son capaces de catalizar reacciones químicas de forma específica; esta especificidad es la clave principal de su utilización en la construcción de biosensores frente a otros catalizadores químicos.

Existen un gran número de biosensores basados en la inmovilización de enzimas sobre electrodos serigrafados. El más destacable, es el biosensor de glucosa [103], debido al gran éxito comercial obtenido. Este biosensor está basado en la inmovilización por entrecruzamiento del enzima GOx sobre la superficie de un SPCE.

Este tipo de biosensores se han utilizado para la determinación de una gran variedad de analitos de diversa naturaleza, tales como fármacos, hormonas, pesticidas, compuestos aromáticos e inorgánicos también.

Biosensores empleados en la determinación de compuestos de interés alimentario

Dentro de los compuestos de interés alimentario, destacan compuestos como las BAs. Para la determinación de este tipo de analitos, se han desarrollado una gran variedad de biosensores basados casi todos en enzimas del tipo AO [104, 105].

Generalmente la determinación de este tipo de compuestos se lleva a cabo directamente sobre el propio alimento, aunque también existe la posibilidad de determinarlas en muestras como en saliva humana o en sangre. Así, en el trabajo desarrollado por Piermarini [106] se ha realizado la construcción de un biosensor que utiliza el enzima DAO y azul de Prusia como mediador electroquímico para la determinación de BAs en saliva. Del mismo modo, Nagy y col. han logrado la determinación de Put en sangre empleando SPEs de platino (SPPtEs) modificados con el enzima putrescina oxidasa (PUO) [107].

En cuanto a la determinación de BAs en alimentos existen en la bibliografía trabajos que describen el análisis del contenido total de BAs en muestras de vino y cerveza empleando SPAuEs modificados con el enzima DAO [108].

El contenido total de BAs en pescado también es un parámetro de interés analítico. Por ello, son varios los trabajos que describen dicha determinación empleando biosensores electroquímicos basados en la utilización de electrodos serigrafados. En el trabajo desarrollado por Lange y Wittmann se han utilizado SPPEs modificados con diferentes enzimas AO: PUO, tiramina oxidasa (TAO), DAO y MAO para llevar a cabo dicho análisis [109, 110].

Igualmente, las enzimas AO se han combinado con otro tipo de enzimas para construir dos tipos diferentes de biosensores basados en la utilización de SPCEs modificados con una mezcla de enzimas: MAO-HRP y DAO-HRP, respectivamente, empleando ferrocenometanol (HOMeFc) como mediador electroquímico [111].

Biosensores empleados en la determinación de metales

Los biosensores utilizados para la determinación de metales tienen tanto aplicaciones biomédicas como ambientales. Debido al gran número de metales existentes y a sus diferentes estados de oxidación, son muchas las referencias bibliográficas relacionadas con la determinación de metales utilizando SPEs [112]. Existe un especial interés en la determinación de metales que presentan un mayor carácter tóxico como son por ejemplo arsénico o mercurio entre otros.

La determinación de metales mediante biosensores se puede llevar a cabo gracias a la inhibición que producen los propios metales sobre la actividad enzimática de ciertos enzimas. Mediante esta metodología se ha

determinado vanadio en muestras de agua de grifo debido a su efecto inhibitorio sobre el enzima fosfatasa alcalina [113] o arsénico por inhibición del enzima acetilcolinesterasa [114] utilizando SPCEs. Estos mismos transductores se han utilizado en el desarrollo de biosensores para la determinación de mercurio en muestras de plasma humano basados en la inhibición del enzima ureasa [62].

La combinación del enzima ureasa con nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y el enzima glutámico deshidrogenasa ha permitido la determinación de mercurio, cobre y cadmio en muestras de agua y suelo empleando un biosensor desechable [115].

Otro enzima seleccionado para la determinación de metales ha sido el enzima GOx. Este enzima se ha utilizado con éxito para la determinación de mercurio, plata, cobre, cadmio, combinando el biosensor correspondiente con la técnica de análisis de inyección en flujo [116].

2.2. CONTAMINANTES QUÍMICOS

En la actualidad existen cientos de sustancias químicas a las que de una manera u otra el ser humano resulta, o al menos, puede resultar expuesto y que pueden impactar negativamente en su organismo. Muchas de estas sustancias son prácticamente desconocidas en cuanto a sus potenciales efectos tóxicos sobre la salud de personas o animales, o su posible efecto en el medio ambiente, mientras que para otras ni siquiera es bien conocida su presencia, debido a la gran diversidad de orígenes de las mismas. Sus aplicaciones van desde diferentes industrias hasta los aditivos alimentarios, pasando por medicamentos o productos de uso doméstico, etc. Incluso algunas no son producidas de manera voluntaria, sino que aparecen, bien como subproductos de la fabricación de otras, bien como consecuencia de la degradación de residuos, o como resultado de procesos de combustión u otras causas. Por este motivo, existe actualmente un gran

interés respecto a la seguridad medioambiental y alimentaria. Este interés se extiende al control de los elementos contaminantes implicados en ambos ámbitos, siendo la concentración en la que se encuentren los diferentes contaminantes en el medio, uno de los factores más importantes implicados en la propia toxicidad de los mismos.

2.2.1. Contaminantes alimentarios

La seguridad alimentaria es un tema de creciente interés social, ya que todos los ciudadanos como consumidores, se encuentran expuestos a los tóxicos o al menos a las sustancias potencialmente tóxicas presentes en los alimentos, que pueden llegar a acumularse en el organismo, pudiendo incluso llegar a producir efectos adversos sobre la salud [117].

En este sentido, se define como contaminante alimentario, cualquier sustancia no añadida intencionadamente a los alimentos, que está presente en éstos como resultado de la producción, fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, o como resultado de la propia contaminación medioambiental.

En función de sus orígenes, los tóxicos alimentarios se pueden clasificar en cinco grandes grupos:

- Contaminantes tóxicos naturales
- Contaminantes biológicos
- Contaminantes químicos
- Aditivos alimentarios
- Tóxicos derivados

Dentro de los contaminantes tóxicos naturales, destacan por sus características y efectos nocivos las BAs.

2.2.1.1. Aminas biógenas

Las BAs son compuestos orgánicos nitrogenados de bajo peso molecular formados por descarboxilación de un aminoácido básico o aromático bajo el efecto de un enzima (tipo aminoácido descarboxilasa) específico para cada uno de los aminoácidos. Estos enzimas son abundantes en los tejidos animales y en los microorganismos. Las BAs pueden encontrarse en una gran variedad de alimentos y bebidas: como carnes, pescados, alimentos fermentados como el queso, frutas, así como en el vino, la cerveza y otras bebidas alcohólicas. Son buenos indicadores químicos de la frescura de un producto alimentario [118-120]. En la tabla 2.4. se resumen las principales BAs presentes en productos alimentarios con sus correspondientes aminoácidos precursores. En la figura 2.8. se muestra además la estructura química de dichas BAs cuya determinación presenta un elevado interés analítico.

Desde un punto de vista biológico, las BAs son moléculas con funciones fisiológicas esenciales para los seres vivos [121, 122]. En plantas, la Put y algunas poliaminas como la espermidina (Spd) y la espermina (Spm), están implicadas en diversos procesos celulares de respuesta al estrés y al envejecimiento. En animales están implicadas en procesos tan relevantes como la división celular o la transmisión nerviosa. Así por ejemplo, la His actúa como neurotransmisor y la Tyr es un intermediario de las rutas de biosíntesis de otros neurotransmisores.

Tabla 2.4.: Principales BAs junto con sus aminoácidos precursores [118].

AMINOÁCIDO PRECURSOR	AMINAS BIÓGENAS CORRESPONDIENTES
Arginina	Putrescina, espermina, espermidina
Lisina	Cadaverina
Triptófano	Triptamina
Tirosina	Tiramina
Histidina	Histamina

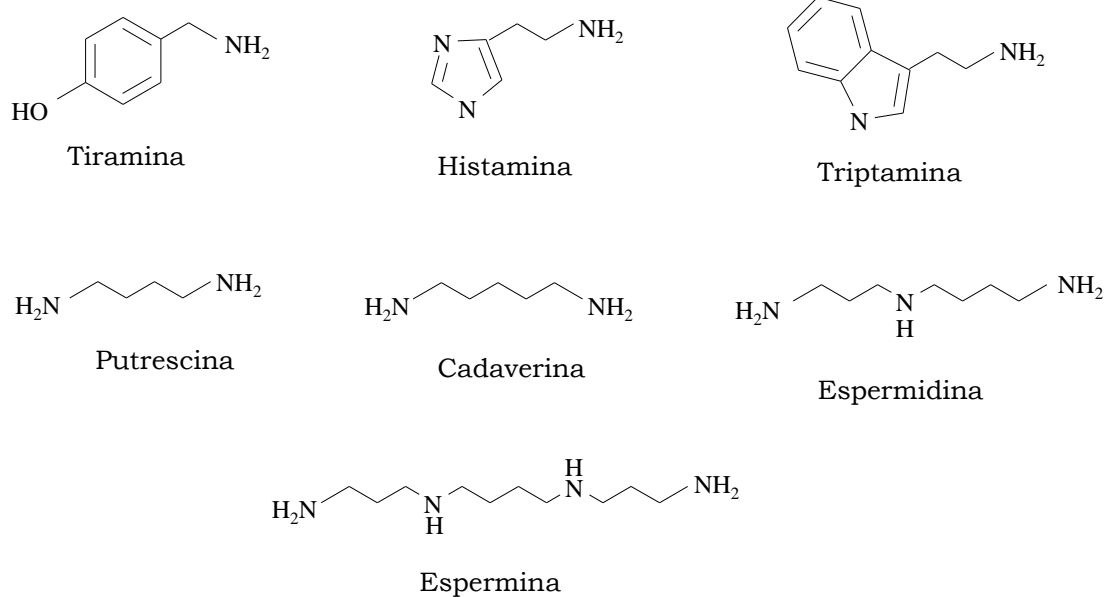


Figura 2.8.: Estructura de las principales BAs encontradas en productos alimentarios.

La intoxicación por BAs se origina por la ingestión de alimentos que contienen altos niveles de este tipo de aminas. Estos compuestos son muy importantes desde el punto de vista toxicológico, ya que pueden conferir toxicidad a los alimentos incluso antes de ser considerados organolépticamente inaceptables. Esta intoxicación puede presentar en el hombre una gran variedad de síntomas: cutáneos, gastrointestinales, hemodinámicos, etc. [123].

Cabe destacar que hay personas especialmente sensibles a las BAs debido a que los enzimas responsables de su detoxificación, la MAO o la DAO no son funcionales, bien por problemas genéticos o por la presencia de inhibidores como el alcohol o determinados fármacos antidepresivos.

Por tanto, es difícil establecer los niveles tóxicos para cada una de las BAs ya que depende de la eficacia de los sistemas de detoxificación y por lo tanto varía de unos individuos a otros. Además, también depende de la presencia de otras BAs ya que pueden tener efectos sinérgicos. Sin

embargo, aunque en nuestro país en la actualidad no existe ninguna legislación clara sobre las concentraciones permitidas en los alimentos, las autoridades sanitarias recomiendan reducir al máximo la ingestión de estos compuestos. No obstante, es necesario subrayar que las concentraciones de BAs varían no sólo de un tipo de alimento a otro, sino también dentro de un mismo tipo de alimento.

En los apartados siguientes se describe con mayor detalle las características relacionadas con la BA estudiada en el presente trabajo de tesis doctoral, la Tyr.

2.2.1.2. Tiramina

La Tyr es una de las BAs que se encuentra con mayor frecuencia en productos alimentarios. Puede tener un doble origen: endógeno y exógeno [118]. La Tyr exógena es aportada por ciertos alimentos (quesos fermentados, carnes, pescados, frutas, legumbres) y bebidas (vino, cerveza,..), pudiendo presentar riesgos toxicológicos y defectos organolépticos. La Tyr endógena proviene de la transformación por los enzimas proteolíticos de ciertas proteínas (caseína, serina, globulina) en tirosina, aminoácido precursor de la Tyr, que se obtiene como producto de descarboxilación de la L-tirosina por acción de la tirosina descarboxilasa tal y como se observa en la figura 2.9.

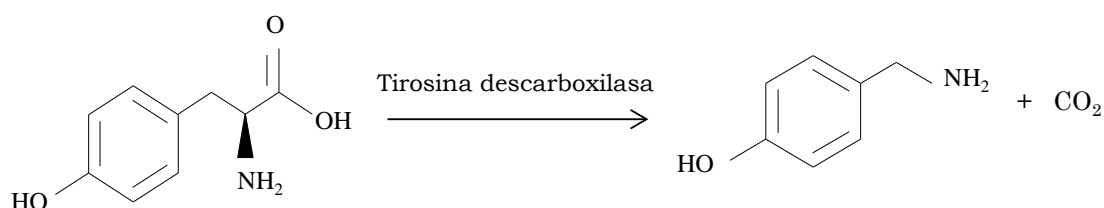


Figura 2.9.: Reacción de descarboxilación del aminoácido L-tirosina.

La toxicidad de la Tyr se debe principalmente a su efecto vaso activo, aunque también puede producir defectos organolépticos y riesgos toxicológicos. La intoxicación producida por Tyr se conoce también como “*reacción del queso*” debido a los altos niveles que esta BA presenta en algunos quesos. En el caso de personas con tratamientos antidepresivos basados en inhibidores de la MAO está contraindicado el consumo de queso, debido a los altos niveles de Tyr que puede contener.

Una amina vasoactiva es una amina que afecta al sistema vascular, contrayendo los vasos sanguíneos y consecuentemente aumentando la presión sanguínea, por eso se conocen también como aminas presoras. Se encuentran en este grupo la Tyr, dopamina, norepinefrina, triptamina (Tryp), feniletilamina e histamina. La mayor parte de estos compuestos se metabolizan rápidamente y no representan un verdadero riesgo para la salud humana.

Así, la ingesta de alimentos ricos en Tyr como quesos, vinos, aguacate, naranja, plátano o tomate, pueden producir dolores intensos de cabeza e hipertensión [117]. La Tyr además aumenta la presión sanguínea por un mecanismo indirecto de reabsorción que controla normalmente los niveles intraneuronales de catecolaminas. La reabsorción de la Tyr desplaza las catecolaminas de los gránulos de almacenamiento dejándolas libres y aumentando consecuentemente la presión sanguínea. En la tabla 2.5. se muestra el contenido en Tyr en diferentes tipos de frutas, verduras y quesos.

La concentración de aminas presoras exógenas y de otras aminas vasoactivas controlada es cuidadosamente por el enzima MAO, un enzima muy difundido por el organismo. Debido a la rápida conversión metabólica de las aminas por la MAO y por otros enzimas del mismo tipo, la administración de aminas presoras a los mamíferos ejerce poco efecto en la presión sanguínea. Sin embargo, los efectos son manifiestos cuando se inhibe el enzima MAO. Algunos inhibidores de la MAO (iMAO), como son los

fármacos isocarboxiácida, mialamida, sulfato de fenilcina y trancilpromina, se han utilizado en el tratamiento clínico de la depresión psiquiátrica. Uno de los mayores inconvenientes del empleo clínico de los inhibidores de la MAO es la mayor posibilidad de reacciones adversas a los alimentos ingeridos que liberan monoaminas en el organismo [124-127].

Tabla 2.5.: Contenido de Tyr en $\mu\text{g/g}$ en algunos tipos de alimentos

ALIMENTO	TIRAMINA
Pulpa de plátano	7
Tomate	4
Aguacate	23
Patata	2
Espinaca	1
Naranja	10
Queso Cheddar	120 - 1500
Queso Camembert	20 - 2000
Queso Stilton azul	466 - 2170
Queso fundido	26 - 50

Según lo expuesto anteriormente, la determinación del contenido de Tyr en alimentos presenta actualmente un elevado interés analítico debido a los potenciales efectos adversos para la salud humana de esta molécula.

2.2.1.3. Revisión bibliográfica de los métodos de análisis empleados en la determinación de tiramina

Los métodos analíticos más utilizados en la determinación de Tyr, son los basados en técnicas cromatográficas y electroforéticas. Dentro de las diferentes técnicas cromatográficas existentes, la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) ha sido la más empleada en la determinación analítica de Tyr [128-183]. En la mayoría de las referencias encontradas la detección

final del analito se lleva a cabo principalmente empleando alguno de los detectores siguientes: fluorimétrico [132, 137, 151, 152, 154, 156], ultravioleta-visible (UV-vis) [129, 135, 138, 139, 142, 155, 157] o un espectrómetro de masas [130, 131, 143, 153, 159]. Aunque también es posible encontrar trabajos que emplean sistemas de detección amperométricos [162, 180, 182].

Otras técnicas cromatográficas empleadas en la determinación de Tyr, son por ejemplo, la cromatografía de líquidos (LC) [184-198], cromatografía de gases (GC) [199-202], cromatografía en capa fina (TLC) [203-207], cromatografía líquida de ultra (UPLC) y ultra alta eficacia (UHPLC) [208-215], cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) [216], cromatografía líquida micelar (MLC) [217-219], cromatografía iónica (IC) [220-226], o cromatografía electrocinética micelar (MEKC) [227-230].

La combinación de las técnicas cromatográficas anteriores con otros métodos de separación, proporciona diferentes alternativas que permiten la detección de Tyr. Así, Shaodong y col. han llevado con éxito el acoplamiento de un proceso de derivatización “in situ” junto con una etapa de microextracción en fase líquida con cromatografía HPLC para determinar Tyr en bebidas alcohólicas [186]. Igualmente, Self y col. [210] han logrado la determinación de Tyr por UHPLC en diferentes variedades de pescados empleando microextracción en fase sólida como una etapa de pretratamiento de la muestra. Este mismo sistema de pretratamiento ha sido elegido por Basheer y col. [136] para la determinación de Tyr en muestras de zumo de naranja mediante HPLC y, por Saaid y col. [231] en muestras de salsa de tomate y salsa de camarones empleando en ambos casos HPLC como técnica cromatográfica.

Las técnicas electroforéticas han sido ampliamente utilizadas en la determinación de Tyr [163, 232-247], aunque generalmente los límites de detección obtenidos son elevados en comparación con los obtenidos por

técnicas cromatográficas. De esta forma, se ha determinado el contenido en Tyr en muestras de agua, carne o bebidas fermentadas.

La determinación de Tyr también ha sido llevada a cabo empleando técnicas de análisis enzimático. Así, en el trabajo descrito por Punakivi [248] la determinación de Tyr mediante espectrofotometría UV-vis se basa en una reacción enzimática en la que interviene el enzima transglutaminasa. El enzima transglutaminasa cataliza reacciones de transferencia de grupos acilo entre un substrato dador, como puede ser una proteína, y otro aceptor, como pueden ser las BAs (debido a su grupo amino), liberándose amoníaco como producto de la reacción, lo que permite llevar a cabo un seguimiento espectrofotométrico. De esta forma se cuantificó el contenido en Tyr en muestras de carne estropeada.

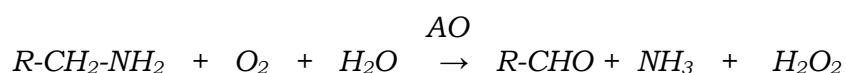
Las desventajas comunes que presentan las técnicas analíticas descritas anteriormente para la determinación cuantitativa de Tyr, son las necesarias etapas de derivatización, los tediosos pretratamientos de la muestra y el requerimiento de una instrumentación compleja. Todos estos factores hacen inadecuadas a estas técnicas analíticas para la realización de análisis rápidos e *in situ*.

Las técnicas electroquímicas se presentan como una clara alternativa debido a sus especiales características, como son, su elevada sensibilidad así como, la sencillez en la instrumentación utilizada. En este sentido, los sensores y biosensores electroquímicos se han utilizado frecuentemente en el análisis selectivo de sustancias que requieren bajas capacidades de detección, con procesos simples y de bajo coste, permitiendo determinaciones de forma directa y a tiempo real.

La mayoría de los biosensores electroquímicos descritos en bibliografía para la determinación de Tyr se basan en la inmovilización de enzimas sobre la superficie del electrodo de trabajo. La medida realizada en

este tipo de dispositivos consiste en el seguimiento mediante amperometría de alguno de los productos de la reacción enzimática en la que interviene el analito.

La mayoría de enzimas utilizados en la determinación de Tyr, así como de otras BAs, son enzimas del tipo AO. La reacción redox que tiene lugar con este tipo de enzimas es la siguiente:



En los biosensores electroquímicos basados en estas enzimas la respuesta electroanalítica se obtiene a través de la oxidación o reducción del peróxido de hidrógeno generado en la reacción enzimática descrita. Este proceso redox requiere generalmente la aplicación de potenciales de medida muy elevados.

Entre los trabajos basados en la utilización de enzimas del tipo AO se encuentra el descrito por Chemnitius y col. [110]. Estos autores han llevado a cabo la determinación de Tyr en muestras de pescado empleando un electrodo de trabajo de platino en el que se inmovilizó por entrecruzamiento, empleando GA, una mezcla de dos enzimas; MAO y PUO. Para llevar a cabo este análisis fue necesario aplicar un potencial de +600 mV para cuantificar la intensidad registrada debido a la producción de peróxido de hidrógeno, por acción de la combinación de ambas enzimas.

Bóka y col. [249] también han empleado enzimas del tipo AO para el desarrollo de biosensores electroquímicos para la determinación de Tyr. Estos autores combinan el biosensor desarrollado con la técnica de análisis de inyección de flujo para determinar el contenido en Tyr en muestras de pescado y carne de cerdo. En este caso se emplean electrodos de grafito modificados con dos enzimas AO diferentes: MAO y DAO. La inmovilización

de ambas enzimas se lleva a cabo empleando un hidrogel que contiene un compuesto de Os (PV17-dme-Os) como mediador. Con el enzima DAO se analiza el contenido total de BAs, y con el enzima MAO se determina de forma más selectiva el contenido en Tyr.

Los enzimas del tipo AO han sido utilizados en combinación con otros enzimas entre los que destaca el enzima HRP. La combinación del enzima HRP con una enzima AO, permite reducir el potencial de medida, ya que el enzima HRP reduce el peróxido de hidrógeno generado en la primera reacción enzimática (Figura 2.10.). Entre los biosensores basados en la coinmovilización de AO y HRP se encuentra el descrito por Niculescu y col. [250]. Estos autores emplean una mezcla de enzimas: HRP y un enzima AO obtenida del guisante, para determinar a un potencial de -50 mV el contenido en Tyr en muestras de pescado, utilizando un electrodo de trabajo de platino. La coinmovilización se lleva a cabo por entrecruzamiento con un polímero redox basado en Os.

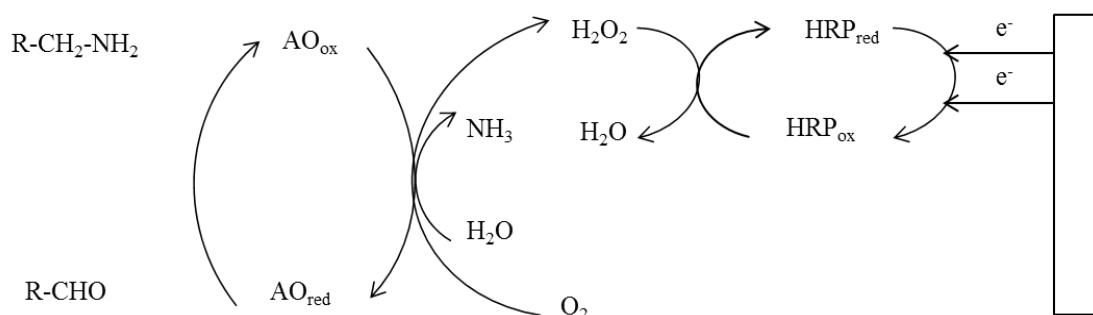


Figura 2.10.: Esquema del mecanismo implicado en reacciones que combinan el enzima HRP y un enzima del tipo AO.

Además de enzimas del tipo AO, en la determinación Tyr también se han utilizado enzimas como la tirosinasa. Así, Apetrei y col. [251] han determinado amperométricamente Tyr por acción de dicho enzima inmovilizado por electropolimerización en polipirrol en un electrodo de platino. Aplicando el método desarrollado al análisis del contenido en Tyr en

muestras de col. El enzima tirosinasa oxida la Tyr a dopaquinona, que genera la respuesta electroanalítica, al reducirse sobre la superficie del electrodo (Figura 2.11.)

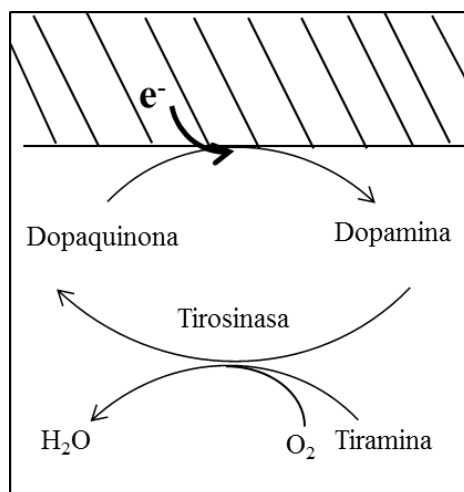


Figura 2.11.: Esquema de la reacción redox que tiene lugar en el biosensor de tirosinasa.

Tal y como se ha descrito anteriormente, la mayoría de referencias relacionadas con biosensores electroquímicos útiles en la determinación de Tyr se basan en medidas amperométricas, aunque también existen algunas referencias que emplean otras técnicas electroquímicas. En este sentido, Telsnig y col. [252] utilizan electrodos de pasta de carbono modificados con el enzima AO obtenida del guisante para analizar el contenido en Tyr en muestras de salsa de pescado, mediante DPV.

El uso de SPEs en el desarrollo de sensores y biosensores, además de todas las ventajas que aportan las técnicas electroquímicas, ofrece buenos valores de reproducibilidad. Generalmente los trabajos descritos para la determinación de BAs con biosensores electroquímicos desechables se basan en la utilización de enzimas tipo AO como elemento biológico para la construcción de biosensores amperométricos. Entre estos trabajos se encuentra el desarrollado por Lange y col. [109] que utilizan un SPpTE como electrodo de trabajo para la determinación amperométrica de Tyr en

muestras de pescado y carne empleando el enzima tiramina oxidasa, inmovilizada sobre la superficie del electrodo de trabajo mediante entrecruzamiento, empleando GA como agente entrecruzante.

Otro de los trabajos que utilizan con éxito SPEs para la determinación de Tyr es el descrito por Telsnig y col. [253]. En este caso se ha llevado a cabo la combinación de un biosensor amperométrico basado en SPCEs con la técnica de análisis de inyección de flujo para determinar Tyr en muestras de carne de pollo. El enzima utilizado en la construcción de dicho biosensor fue el enzima AO obtenida del guisante que fue inmovilizada sobre el electrodo de trabajo de carbono modificado previamente con dióxido de manganeso. La inmovilización del enzima tiene lugar por adsorción.

Finalmente, Alonso y col. [47] han desarrollado dos biosensores electroquímicos amperométricos para la determinación de BAs, entre ellas, la Tyr, en muestras de pescado. Estos autores, emplean una combinación de enzimas AO: MAO y DAO, respectivamente, con el enzima HRP. Los enzimas fueron inmovilizados sobre la superficie del electrodo de trabajo por el método de unión covalente. En esta ocasión, se empleó HOMeFc como mediador electroquímico para lograr registrar la señal amperométrica a un potencial de +250 mV.

2.2.2. Contaminantes medioambientales

Dentro de los contaminantes ambientales, los metales pesados están reconocidos como elementos altamente tóxicos y peligrosos. Los metales pesados presentan como principal característica, que los distingue del resto de contaminantes ambientales, su falta de biodegradabilidad. Por otra parte, es importante señalar que el comportamiento químico y por tanto, la toxicidad de un elemento metálico depende en gran medida de su estado de oxidación.

Entre los metales pesados que han sido catalogados como elementos altamente tóxicos y cuya toxicidad depende de su grado de oxidación se encuentra el cromo.

2.2.2.1. Cromo: Introducción general

El cromo es el elemento número 24 más abundante de la corteza terrestre, con una abundancia aproximada de 100 ppm [254, 255] Es un metal duro, blanco, brillante y frágil, presenta una configuración electrónica $[\text{Ar}] 3d^5 4s^1$ y una estructura cristalina cúbica centrada en el cuerpo (Figura 2.12.) [256].



Figura 2.12.: Estructura cúbica centrada en el cuerpo (BCC).

Fue descubierto en 1798 por Nicolas-Louis Vauquelin, que fue capaz de producir óxido de cromo (CrO_3) mezclando crocoíta (PbCrO_4) con ácido clorhídrico. La crocoíta es un mineral naranja rojizo que Johann Gottlob Lehmann encontró en 1761 en los Montes Urales. Finalmente Vauquelin descubrió que se podía aislar cromo metálico calentando el óxido en un horno de carbón, incluso detectó trazas de cromo en gemas preciosas, como por ejemplo, en rubíes y esmeraldas. En 1854, Bunsen aisló el cromo mediante electrólisis a partir de una solución de cloruro cromoso. Lo llamó cromo (del griego "chroma", que quiere decir "color") debido a los distintos colores que presentan los compuestos de este elemento. [257]

El cromo presenta varios estados de oxidación que van desde 0 hasta VI, como puede verse en la figura 2.13. De ellos destacan la forma trivalente como la más estable y la hexavalente de propiedades marcadamente oxidantes [258].

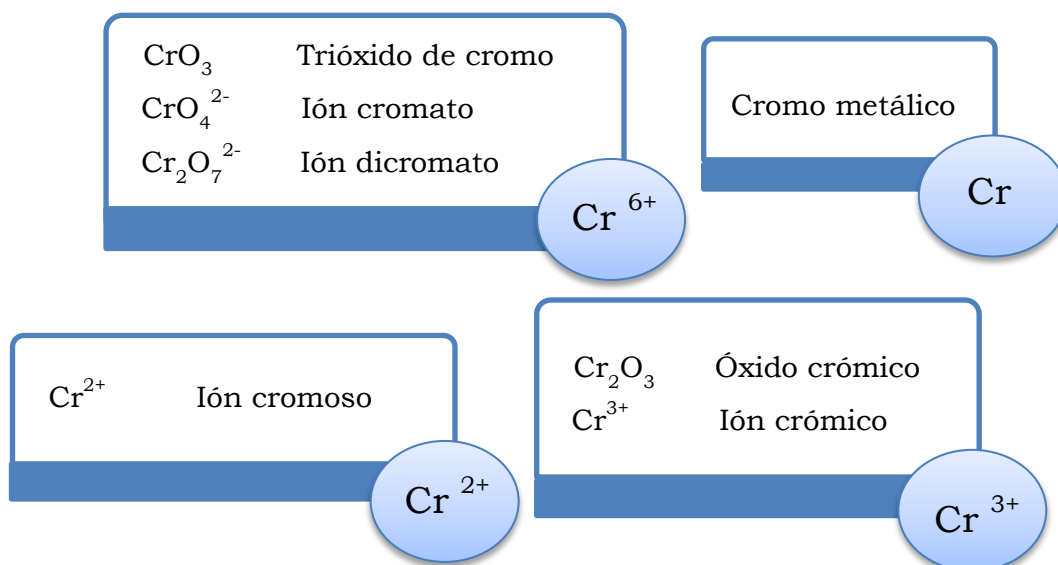


Figura 2.13.: Principales estados de oxidación y compuestos de cromo.

El cromo es un elemento químico ampliamente utilizado en la actualidad en diversos campos. Entre los usos más habituales del cromo se encuentran [259]:

- Evitar la corrosión en aleaciones con hierro, níquel o cobalto aportando además un aumento de su dureza y tenacidad. De hecho, las aleaciones de hierro, níquel y cromo son muy fuertes y soportan temperaturas muy altas. Se utilizan en motores a reacción y turbinas de gas.
- Del mismo modo, en los aceros inoxidable, el cromo constituye un 10% o más de la composición final para lograr esa resistencia a la corrosión. A causa de su dureza, una aleación de Cr-Co-W puede emplearse frecuentemente en la fabricación de herramientas de corte.
- El cromo depositado electrolíticamente proporciona un acabado brillante, duro y resistente a la corrosión por lo que se ha utilizado durante mucho tiempo en la industria del automóvil aunque ha comenzado a ser reemplazado por compuestos plásticos.

- En forma de cromita, se usa como material refractario debido a su alto punto de fusión, su pequeña dilatación térmica y la estabilidad de su estructura cristalina.
- Las sales de cromo se emplean para colorear el vidrio y el cuero. El CrO_2 se usa en cintas magnéticas.
- En los laboratorios de ciencias, el ácido crómico se utiliza para limpiar el material de vidrio si tiene trazas de compuestos orgánicos.
- Regula el metabolismo del azúcar. Se emplea para controlar el nivel de azúcar en sangre en personas con diabetes del tipo II porque ayuda a distribuir la glucosa a las células.
- Catalizador en la síntesis del amoníaco.

Los innumerables usos del cromo en diferentes ámbitos de la actividad humana han provocado un aumento considerable de la presencia de dicho elemento en el medio ambiente.

2.2.2.2. Cromo en el medio ambiente

La presencia de cromo en el ambiente puede provenir de fuentes naturales. En este sentido, el cromo nunca se encuentra en estado libre en la naturaleza, aunque sus compuestos si están muy extendidos. Muchos minerales y piedras preciosas deben su color a la presencia de cromo en su estructura. La fuente mineral más importante de cromo es la cromita (Figura 2.14.).

La **cromita** es un mineral de fórmula química FeCr_2O_4 , que a veces puede contener magnesio, aluminio o titanio (entre otros) en su estructura. Se emplea en moldes para la fabricación de ladrillos; y en general para fabricar materiales refractarios (como los ladrillos para hornos de

fundición). Una buena parte de la cromita se emplea para obtener cromo o en aleaciones e incluso en la fabricación de vidrio verde.

Las fuentes naturales de cromo incluyen también emisiones volcánicas, incendios forestales y restos vegetales principalmente. El cromo generalmente no permanece en la atmósfera, sino que se deposita en el suelo y el agua.



Figura 2.14.: Cromita.

Por otra parte, tal y como se ha descrito anteriormente, son numerosos los procesos industriales en los que se emplea cromo y que puede, por tanto, dar lugar a la generación de grandes cantidades de residuos de cromo que se acaban vertiendo en el medio. Así, son frecuentes las emisiones de cromo en aire en forma de pequeñas partículas o aerosoles debido a procesos de soldadura, principalmente, con acero inoxidable, y también por el uso de productos químicos que contienen cromo hexavalente como algunas pinturas. Además, estas emisiones de carácter antropogénico, se producen también como resultado de actividades industriales entre las que destacan el cromado, curtido, inhibición de la corrosión, disoluciones de lavado de cristales, conservación de maderas, acabado metálico o procesado del mineral de cromita, en donde se emplean tanto cromo trivalente como hexavalente [260-262].

La contaminación en el agua ocurre mediante desechos de la industria textil y las curtidoras de cuero. Por el contrario, la contaminación de suelos puede relacionarse con la presencia de residuos de cromo de la

industria y cenizas de carbón provenientes de plantas de electricidad [263, 264].

Aproximadamente el 75% de la reserva mundial de mena de cromo está en Sudáfrica, como puede verse en la figura 2.15. Los países industriales de Europa y Norteamérica deben depender del suministro de la mena de cromo en el extranjero; EEUU consume aproximadamente el 14% de la producción mundial. El reciclado de la chatarra de acero inoxidable como fuente de cromo es una importante fuente secundaria [258].

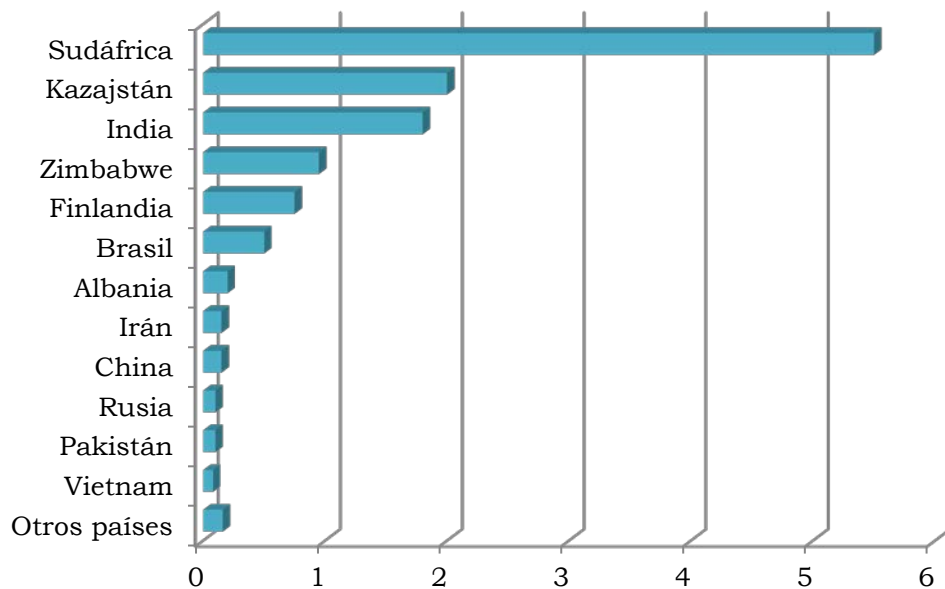


Figura 2.15.: Producción minera de cromo en 2001 /Mt.

2.2.2.3. Toxicidad y legislación del cromo

El cromo es uno de los metales pesados que presenta diferente comportamiento toxicológico en función del estado de oxidación en el que se encuentre. Son varios los posibles estados de oxidación en los que puede encontrarse el cromo, pero son las formas trivalente y hexavalente, las que presentan mayor importancia biológica y toxicológica.

Los compuestos de Cr(III) no son irritantes ni corrosivos y son considerablemente menos tóxicos que los compuestos de Cr(VI). Según la Agencia internacional sobre el cáncer (IARC), el Cr(VI) se encuentra clasificado dentro del grupo 1 de sustancias con suficiente evidencia de ser carcinógenas para el ser humano, mientras que el Cr(III) se incluye en el grupo 3 entre los agentes no clasificables por su carácter carcinogénico en los seres humanos [117]. De hecho, la forma trivalente es la más frecuente, resultando esencial para el ser humano por el papel que desempeña en el metabolismo de la insulina como factor de tolerancia de la glucosa (GTF), y en el metabolismo lipídico y de las proteínas, recomendándose una ingesta entre 50 y 200 μg diarios.

Los efectos adversos provocados por el cromo en seres humanos son atribuidos a la forma hexavalente de dicho elemento. El Cr(VI) presenta un elevado interés en el campo industrial, pero se trata de una especie altamente tóxica debido a su capacidad de traspasar las membranas celulares, que le confiere propiedades carcinogénicas, ya que, una vez dentro de la célula puede reaccionar con el ADN produciendo finalmente tumores. Además de sus efectos cancerígenos, el Cr(VI) puede provocar también bronquitis y neumonitis, deterioros gastrointestinales, hepáticos y renales así como, úlceras en la piel y reacciones alérgicas, estas últimas independientes de la dosis.

La población general está expuesta al cromo por el consumo de alimentos, agua potable, y la inhalación de aire que contiene la sustancia química. La ingesta media diaria del aire, el agua y los alimentos se estima en menos de 0.2 a 0.4 μg , 2.0 g, y 60 g, respectivamente, según la Agencia de Protección Medioambiental (EPA) [265].

Las concentraciones totales de cromo en el agua de consumo suelen ser inferiores a 2 $\mu\text{g L}^{-1}$, aunque se han descrito concentraciones de hasta 120 $\mu\text{g L}^{-1}$. Las *Normas internacionales para el agua potable* de la OMS de

1958 recomendaron una concentración máxima admisible de cromo de 0.05 mg L⁻¹, basándose en los posibles efectos perjudiciales para la salud. En la primera edición de las *Guías para la calidad del agua potable*, publicada en 1984, se mantuvo el valor de referencia de 0.05 mg L⁻¹, y se especificó que se refería al cromo total debido a la dificultad de analizar únicamente la forma hexavalente. Las Guías de 1993 pusieron en duda el valor de referencia de 0.05 mg L⁻¹ debido a la capacidad cancerígena del cromo hexavalente por inhalación y a su genotoxicidad, pero los datos toxicológicos disponibles no justificaban la determinación de un nuevo valor de referencia. Como medida práctica se mantuvo como valor de referencia provisional 0.05 mg L⁻¹, una concentración que se considera que es poco probable que implique riesgos significativos para la salud, hasta que se disponga de información nueva y el cromo pueda ser evaluado de nuevo [266].

2.2.2.4. Especiación de cromo

El término especiación pretende expresar la idea de que las formas químicas específicas bajo las que puede presentarse un elemento deben ser consideradas de manera individual. La razón principal para llevar a cabo esta discriminación es que la reactividad química y el efecto sobre los seres vivos es muy variable de una especie a otra, de forma que la determinación de la concentración total del elemento no es suficiente para obtener información sobre el efecto que produce en un sistema [267].

Es bien conocido en el caso del cromo, que ambas especies pueden coexistir en aguas naturales y efluentes, dependiendo de las características redox y pH del medio. La problemática de su determinación analítica radica en que la manipulación y tratamiento previo de la muestra, pueden producir cambios en la relación entre ambas especies químicas, y que dadas las bajas concentraciones que deben determinarse de ambas especies no son muchos los métodos que permitan su cuantificación con la

sensibilidad necesaria. De ahí, el interés de su análisis, cuantificación, y además especiación.

2.2.2.5. Revisión bibliográfica de los métodos de especiación de cromo

Los procedimientos analíticos de especiación de cromo se basan generalmente en la combinación de métodos de preconcentración y separación con diferentes técnicas de detección [268-270]. Los métodos de separación incluyen generalmente técnicas de microextracción líquida [271-276], extracción en fase sólida [277-285] y en punto de nube [286-294], cromatografía de intercambio iónico [295-297] o HPLC [298-306].

Las técnicas utilizadas en la determinación y especiación de las especies de cromo incluyen, sobre todo, espectrometría de absorción atómica con cámara de grafito (ETAAS) [275, 278, 291, 307-319] y espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS) [271-274, 279-282, 286-290, 320-335]. En este sentido, la combinación ETAAS con diferentes métodos de separación, proporciona diferentes alternativas que permiten la especiación de cromo. Así, Jiang y col. han realizado con éxito el acoplamiento de un proceso de extracción en fase sólida magnética (MSPE) utilizando nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 como absorbente junto la técnica ETAAS para especiar cromo en muestras de agua de lagos y de grifo [307]. Del mismo modo, Liang y col. [291] han logrado la especiación de cromo con ETAAS utilizando, en este caso, la extracción en punto de nube como método de separación y preconcentración, en muestras de agua natural. Otras técnicas de separación utilizadas conjuntamente con ETAAS incluyen la extracción en fase sólida empleando pirrolidintiocarbamato de amonio como agente extractante, para especiar el contenido en cromo de muestras de agua mineral y de salinas [278] y, la microextracción líquida empleando tributilfosfato como agente extractante, para especiar el contenido en cromo en muestras de agua y de lixiviados obtenidos de juguetes de plástico [275]. La misma metodología emplean Sadegui y col. [312] para realizar la especiación de cromo en muestras de agua y orina,

empleando, en este caso, un líquido iónico como agente extractante. Soares y col. [314] determinan y especian el contenido en cromo en muestras de pan, para ello realizan una digestión ácida y una extracción alcalina como etapa previa, para llevar a cabo el análisis finalmente por ETAAS.

En cuanto a FAAS, existen varios trabajos relacionados con la utilización de dicha técnica como sistema de detección en procedimientos de especiación de cromo basados en técnicas de separación. Así, Zu y col. [319] emplean como método de separación de las distintas especies de cromo la extracción en punto de nube utilizando p-octil-fenil-éter de polietilenglicol (Tritón X-100) como agente surfactante, para determinar el contenido en cromo en muestras de agua por FAAS. Matos y col. [287] llevan a cabo una metodología similar para especiar el contenido en cromo de muestras de agua, empleando Tritón X-114 como agente extractante. FAAS ha sido también empleada utilizando la extracción en fase sólida como paso previo para lograr la especiación de cromo en muestras de agua y alimentos utilizando una resina quelante [279]. Finalmente, Sarica y col. [303] emplean como método de separación HPLC y lo combinan con FAAS para especiar el contenido de cromo en muestras de agua de consumo y de aguas residuales.

Además de las técnicas descritas anteriormente, la especiación de cromo ha logrado llevarse a cabo empleando sistemas basados en la utilización de ICP. En la mayoría de trabajos encontrados en la bibliografía, el ICP se acopla a un espectrómetro de masas [283-285, 295-302, 336-345], aunque también es posible encontrar ejemplos basados en la utilización de sistemas de emisión atómica con ICP [346-352] .

Entre los trabajos basados en la utilización de sistemas ICP-MS se encuentra el descrito por Chen y col. [296] que logran especiar cromo en muestras de agua empleando cromatografía de intercambio iónico como un método de separación previo al análisis mediante ICP-MS. Otros métodos cromatográficos empleados conjuntamente con la técnica de ICP-MS

incluyen la utilización de HPLC para determinar y especiar el contenido en cromo en muestras en muestras de humo generadas en el proceso de soldadura. Las técnicas de extracción también han sido empleadas como técnicas de separación para lograr la especiación de cromo en diferentes muestras empleando ICP-MS. Así, Chen y col. [284] llevan a cabo una extracción en fase sólida empleando nanotubos de carbono como método de separación de las diferentes especies de cromo en muestras de agua natural.

Tal y como se ha descrito anteriormente, la técnica ICP-AES ha sido empleada también con éxito en la especiación de cromo en muestras de agua residuales y de grifo. En este caso, es necesario llevar a cabo procesos de separación de las distintas especies de cromo empleando técnicas de extracción como la extracción en punto de nube con tenoiltrifluoroacetona [352] o la extracción en fase sólida empleando una resina quelante [349].

Otras técnicas analíticas que han sido utilizadas en la especiación de cromo, aunque con menos frecuencia son las técnicas espectrofotométricas de UV-vis [276, 277, 292-294, 304-306, 353-355] y de fluorescencia [356-358] que han sido aplicadas en el análisis de diferentes muestras de agua e incluso en muestras de alimentos, como salsa de tomate. Del mismo modo, las técnicas electroforéticas también han demostrado ser útiles para llevar a cabo la especiación de cromo en muestras de agua [359, 360].

Los inconvenientes que presentan los métodos analíticos utilizados en la determinación y especiación de cromo, son las necesarias etapas previas de separación o preconcentración de la muestra, el empleo de una instrumentación y unos procedimientos experimentales complejos, el alto coste de la instrumentación necesaria y los largos tiempos de análisis requeridos. Estos inconvenientes reducen considerablemente la aplicación de las técnicas descritas en el análisis rutinario.

Las técnicas electroquímicas debido a sus características se presentan como alternativa a las técnicas analíticas mencionadas anteriormente. Estas técnicas permiten obtener una elevada sensibilidad en multitud de analitos utilizando una instrumentación muy sencilla y mediante procesos de muy bajo coste. Además presentan la posibilidad de realizar análisis “in situ”, es decir determinaciones de forma directa y a tiempo real, a diferencia de las técnicas analíticas descritas anteriormente como ETAAS, FAAS o ICP-MS.

Existen numerosas referencias que describen la especiación de cromo utilizando técnicas electroquímicas [361]. La mayoría de las referencias encontradas sobre la especiación electroquímica de cromo implican como técnica de análisis, la voltamperometría de redisolución adsorbtiva (AdSV) [362-369]. Muchos de dichos trabajos se basan en el uso de un electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE) como electrodo de trabajo [363-369]. En este sentido, Arancibia y col. [363] logran llevar a cabo la especiación de cromo en aguas de mar, mediante AdSV utilizando rojo de pirogarol (PGR) como complejante. En este trabajo la especiación de cromo implica varias etapas. En una primera etapa se determina el contenido en Cr(VI) mediante AdSV, en una segunda etapa se somete a la muestra a un proceso de oxidación mediante radiación UV y, se determina el contenido total de cromo mediante AdSV. Finalmente, el contenido en Cr(III) se determina por diferencia de los valores obtenidos en las etapas anteriores. Este procedimiento de especiación de cromo en varias etapas ha sido utilizado también por Vukovanovic y col. [370] para el análisis de Cr(III) y Cr(VI) en muestras de agua empleando violeta de pirocatecol (PCV) como agente complejante. Otro agente complejante útil en la especiación de cromo en varias etapas es el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA). Así, Bobrowski y col. [365] han logrado la determinación de ambas especies de cromo mediante AdSV utilizando DTPA como agente complejante y en presencia de nitrato, en muestras de agua residuales de una industria de curtido de pieles, fraccionando estas muestras reales mediante filtración de flujo tangencial (TFF). Li y col. [367] emplean la misma técnica electroquímica y el mismo complejante que Bobrowski y col. para especiar

el contenido en cromo de muestras de agua natural. Finalmente, Boussemart y col. [369] utilizan también DTPA para determinar Cr(III) y Cr(VI) en muestras de aguas de mar siguiendo el mismo procedimiento en varias etapas.

La determinación simultánea de Cr(III) y Cr(VI) implica en la mayoría de las ocasiones el empleo de mezclas de diferentes complejantes. Así, Grabarczyk [364] emplea como complejantes DTPA y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para especiar el contenido en cromo de diferentes muestras de agua de río y grifo mediante AdSV. En algunos trabajos el empleo de esta mezcla de complejantes implica la utilización de técnicas de calibrado multivariante para lograr la resolución de las señales electroquímicas solapadas que aparecen en este tipo de análisis. Entre dichos trabajos se encuentran los descritos por Domínguez y col. [366, 368, 371] donde se logra determinar el contenido de Cr(VI) y Cr(III) de forma simultánea empleando como complejantes PCV y ácido N-(2-hidroxietil) etilendiaminotriacético (HEDTA). En este caso es necesario llevar a cabo un procedimiento de calibración multivariante para lograr la determinación simultánea de ambas especies en muestras de agua contaminada.

Existen también trabajos descritos en bibliografía en la que la determinación electroquímica con HMDE implica la determinación selectiva de una de las especies de cromo en presencia de la otra. Así, Domínguez y col. [371] logran determinar Cr(VI) en presencia de Cr(III) en muestras de agua de río y de grifo mediante AdSV empleando pirrolidinditiocarbamato de amonio (APDC) como agente complejante.

A pesar de los buenos resultados obtenidos con electrodos de mercurio, el uso de HMDE hoy en día se está reduciendo debido a sus problemas de contaminación ambiental. Entre los trabajos relacionados con la especiación de cromo empleando otro tipo de electrodos se encuentra el de Jorge y col. [362] donde determinan la concentración de Cr(III) y Cr(VI) utilizando un electrodo de disco rotatorio modificado con película de

bismuto en muestras de agua de río, mediante AdSV empleando DTPA como complejante.

Los SPEs también han sido empleados con éxito en la determinación de cromo, aunque puede decirse que apenas existen trabajos, relacionados con la utilización de los mismos para la especiación de dicho elemento. Únicamente, Sánchez-Moreno y col. [372] han descrito un método que logra la determinación del contenido en cromo trivalente y cromo hexavalente en muestras de lixiviados de vertederos de residuos sólidos urbanos, empleando un sensor modificado con un compuesto de grafito-epoxi y dos complejantes diferentes, uno selectivo a cada especie de cromo, difenilcarbazida (DPC) selectivo a Cr(VI) y di(2-hidroxifenilimino)etano (DPHE) selectivo a Cr(III), empleando técnicas potenciométricas.

Sin embargo, existen varios trabajos que describen con éxito la posibilidad de realizar la determinación de una de las especies de cromo en presencia de la otra. De esta forma, Bergamini [373] determina el contenido de cromo hexavalente en muestras de agua residual utilizando SPCEs modificados con una película de poli-L-histidina mediante voltamperometría de barrido lineal (LSV). Utilizando la misma técnica electroquímica, Metters [374] determina el contenido en Cr(VI) en muestras de agua medioambiental empleando SPAuEs. Igualmente, Hallam [375] logra llevar a cabo la determinación a nivel de trazas de cromo hexavalente en muestras de agua empleando SPCEs no modificados en los que lleva a cabo un estudio electroquímico de la reducción de Cr(VI) empleando diferentes técnicas electroquímicas que incluyen la cronoamperometría y la LSV.

Otros trabajos descritos en bibliografía basados en el empleo de electrodos desechables son los descritos por Domínguez y col. [376] y Sadeghi y col. [377]. En el primer caso, los autores logran determinar el contenido en cromo hexavalente en muestras de agua residual, utilizando SPCEs modificados con AuNPs y nanopartículas de plata (AgNPs) mediante

DPV. En el caso del trabajo descrito por Sadeghi y col., los SPCEs son modificados con nanotubos de carbono y quercetina para lograr la determinación del contenido en Cr(VI) en muestras de agua de consumo.

En bibliografía es posible encontrar otros trabajos que describen la modificación de SPCEs para la determinación selectiva de una de las especies de cromo. Así, Banerjee [378] determina el contenido en cromo hexavalente en muestras de agua residual, utilizando SPCEs modificados con L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) utilizando, en este caso, la cronoamperometría como técnica analítica.

2.3. BIBLIOGRAFIA

- [1] B.R. Eggins, *Biosensors : an introduction*, Wiley : Teubner, Chichester, 1996.
- [2] D.P. Nikolelis, *Biosensors for direct monitoring of environmental pollutants in field*, Kluwer Academic Press, Dordrecht, 1997.
- [3] J.M. Pingarrón Carrazón, P. Sánchez Batanero, *Química electroanalítica: fundamentos y aplicaciones*, Síntesis, Madrid, 2003.
- [4] S. Alegret, M. del Valle, A. Merkoçi, *Sensores electroquímicos: introducción a los quimiosensores y biosensores: curso teórico-práctico*, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 2004.
- [5] R. Boyer, *Conceptos de bioquímica*, International Thomson, México, 2000.
- [6] A.L. Lehninger, D.L. Nelson, M.M. Cox, *Principios de bioquímica*, 5 ed., Omega, Barcelona, 2009.
- [7] J. Chabas Lopez, *Enzimología: química de las enzimas, métodos de preparación*, Editorial Científico-Médica, Barcelona, 1969.
- [8] R.F. Boyer, *Conceptos en bioquímica*, International Thomson Editores, México, 2000.
- [9] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, N.D. Clarke, *Bioquímica*, 5 ed., Reverté, Barcelona, 2003.
- [10] J.R. Whitaker, *Principles of enzymology for the food sciences*, 2 ed., Marcel Dekker, Nueva York, 1994.
- [11] R.H. Garrett, C.M. Grisham, *Biochemistry*, 4th International ed., Brooks-Cole, Boston.
- [12] M. Moyo, J.O. Okonkwo, N.M. Agyei, *Electroanalysis*, 25 (2013) 1946-1954.
- [13] I.S. Kucherenko, O.O. Soldatkin, B.O. Kasap, S. Öztürk, B. Akata, A.P. Soldatkin, S.V. Dzyadevych, *Electroanalysis*, 24 (2012) 1380-1385.

-
- [14] V.G. Gavalas, N.A. Chaniotakis, *Mikrochimica Acta*, 136 (2001) 211-215.
- [15] F. Yıldırımoğlu, F. Arslan, S. Çete, A. Yaşar, *Sensors*, 9 (2009) 6435-6445.
- [16] J. Samseya, R. Srinivasan, Y.T. Chang, C.W. Tsao, V.S. Vasantha, *Analytica Chimica Acta*, 793 (2013) 11-18.
- [17] A.T. Lawal, S.B. Adeloju, *Biosensors and Bioelectronics*, 40 (2013) 377-384.
- [18] J.A. Young, X. Jiang, J.R. Kirchhoff, *Electroanalysis*, 25 (2013) 1589-1593.
- [19] L.C. Clark Jr, C. Lyons, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102 (1962) 29-45.
- [20] A.E.G. Cass, G. Davis, G.D. Francis, H. Allen O Hill, W.J. Aston, I. John Higgins, E.V. Plotkin, L.D.L. Scott, A.P.F. Turner, *Analytical Chemistry*, 56 (1984) 667-671.
- [21] M. Prudenziati, B. Morten, *Sensors and Actuators*, 10 (1986) 65-82.
- [22] M. Prudenziati, *Sensors and Actuators A: Physical*, 25 (1990) 227-234.
- [23] B. Morten, M. Prudenziati, A. Taroni, *Sensors and Actuators*, 4 (1983) 237-245.
- [24] O.Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, *Talanta*, 73 (2007) 202-219.
- [25] M. Albareda-Sirvent, A. Merkoçi, S. Alegret, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 69 (2000) 153-163.
- [26] K.C. Honeychurch, J.P. Hart, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 22 (2003) 456-469.
- [27] J.P. Hart, S.A. Wring, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 16 (1997) 89-103.
- [28] M. Li, Y.T. Li, D.W. Li, Y.T. Long, *Analytica Chimica Acta*, 734 (2012) 31-44.

- [29] J.P. Metters, R.O. Kadara, C.E. Banks, *Analyst*, 136 (2011) 1067-1076.
- [30] J.P. Hart, A. Crew, E. Crouch, K.C. Honeychurch, R.M. Pemberton, *Analytical Letters*, 37 (2004) 789-830.
- [31] J.M. Cooper, A.E.G. Cass, *Biosensors: a practical approach*, 2 ed., Oxford University Press, Oxford, 2004.
- [32] J. Wang, B. Tian, *Analytica Chimica Acta*, 274 (1993) 1-6.
- [33] M.F. Cardosi, S.W. Birch, *Analytica Chimica Acta*, 276 (1993) 69-74.
- [34] S.D. Sprules, I.C. Hartley, R. Wedge, J.P. Hart, R. Pittson, *Analytica Chimica Acta*, 329 (1996) 215-221.
- [35] S.D. Sprules, J.P. Hart, R. Pittson, S.A. Wring, *Electroanalysis*, 8 (1996) 539-543.
- [36] G. Silva Nunes, G. Jeanty, J.-L. Marty, *Analytica Chimica Acta*, 523 (2004) 107-115.
- [37] A.M. Oliveira Brett, F.M. Matysik, M. Vieira, *Electroanalysis*, 9 (1997) 209-212.
- [38] J.P. Hart, A.K. Abass, K.C. Honeychurch, R.M. Pemberton, S.L. Ryan, R. Wedge, *Indian Journal of Chemistry - Section A Inorganic, Physical, Theoretical and Analytical Chemistry*, 42 (2003) 709-718.
- [39] P. Atanasov, A. Kaisheva, S. Gamburzev, I. Iliev, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 8 (1992) 59-64.
- [40] D.H. Craston, C.P. Jones, D.E. Williams, N. El Murr, *Talanta*, 38 (1991) 17-26.
- [41] C.G.J. Koopal, A.A.C.M. Bos, R.J.M. Nolte, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 18 (1994) 166-170.
- [42] G. Cui, S.J. Kim, S.H. Choi, H. Nam, G.S. Cha, K.J. Paeng, *Analytical Chemistry*, 72 (2000) 1925-1929.
- [43] J.P. Metters, M. Gomez-Mingot, J. Iniesta, R.O. Kadara, C.E. Banks, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 177 (2013) 1043-1052.
- [44] J.P. Metters, S.M. Houssein, D.K. Kampouris, C.E. Banks, *Analytical Methods*, 5 (2013) 103-110.

- [45] G. Cui, J.H. Yoo, J. Yoo, S.W. Lee, H. Nam, G.S. Cha, *Electroanalysis*, 13 (2001) 224-228.
- [46] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, L. Ferreira-Gonçalves, M.J. Arcos-Martínez, *Biosensors and Bioelectronics*, 25 1333-1337.
- [47] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, P. Matos, M.J. Arcos-Martínez, *Analytica Chimica Acta*, 665 (2010) 26-31.
- [48] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, L.D.T.D. Román, M.J. Arcos-Martínez, *Analytica Chimica Acta*, 688 (2011) 49-53.
- [49] L. Asturias-Arribas, M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, *Talanta*, 105 (2013) 131-134.
- [50] L. Asturias-Arribas, M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, *Analytica Chimica Acta*, 685 (2011) 15-20.
- [51] A. Calvo-Pérez, O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, *Electroanalysis*, 22 (2010) 2924-2930.
- [52] A. Calvo-Pérez, O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, *Microchimica Acta*, 180 (2013) 253-259.
- [53] A. Calvo-Pérez, O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, *Electroanalysis*, 25 (2013) 1316-1322.
- [54] L. Del Torno-De Román, M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 176 (2013) 858-862.
- [55] L. Del Torno-De Román, M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, C. Merino-Sánchez, M.P. Merino-Amayuelas, M.J. Arcos-Martínez, *Talanta*, 86 (2011) 324-328.
- [56] O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, P. Recio-Cebrián, M.J. Arcos-Martínez, *Science of the Total Environment*, 426 (2012) 346-350.
- [57] W. Henao-Escobar, O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, *Microchimica Acta*, 180 (2013) 687-693.
- [58] M.E. Burgoa Calvo, O. Domínguez Renedo, M.J. Arcos Martínez, *Analytica Chimica Acta*, 549 (2005) 74-80.

- [59] M.E. Burgoa Calvo, O. Domínguez Renedo, M.J. Arcos Martínez, *Talanta*, 74 (2007) 59-64.
- [60] O. Domínguez Renedo, M.J. Arcos Martínez, *Analytica Chimica Acta*, 589 (2007) 255-260.
- [61] O. Domínguez-Renedo, M.E.B. Calvo, M.J. Arcos-Martínez, *Sensors*, 8 (2008) 4201-4212.
- [62] O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, L. Ferreira-Gonçalves, M.J. Arcos-Martínez, *Talanta*, 79 (2009) 1306-1310.
- [63] O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, *Talanta*, 73 (2007) 202-219.
- [64] M.F. Bergamini, M.V.B. Zanoni, *Electroanalysis*, 18 (2006) 1457-1462.
- [65] R.O. Kadara, B.G.D. Haggett, B.J. Birch, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (2006) 4921-4924.
- [66] M.F. Bergamini, A.L. Santos, N.R. Stradiotto, M.V.B. Zanoni, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43 (2007) 315-319.
- [67] Y. Shih, J.M. Zen, H.H. Yang, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29 (2002) 827-833.
- [68] M.-H. Chiu, H.-H. Yang, C.-H. Liu, J.-M. Zen, *Journal of Chromatography B*, 877 (2009) 991-994.
- [69] J.W. Dilleen, S.D. Sprules, B.J. Birch, B.G.D. Haggett, *Analyst*, 123 (1998) 2905-2907.
- [70] K.C. Honeychurch, J.P. Hart, D.C. Cowell, *Electroanalysis*, 12 (2000) 171-177.
- [71] K.C. Honeychurch, J.P. Hart, D.C. Cowell, D.W.M. Arrigan, *Electroanalysis*, 14 (2002) 177-185.
- [72] S. Laschi, I. Palchetti, M. Mascini, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114 (2006) 460-465.
- [73] S. Laschi, G. Bagni, I. Palchetti, M. Mascini, *Analytical Letters*, 40 (2007) 3002-3013.

- [74] J.M. Zen, C.-C. Yang, A.S. Kumar, *Analytica Chimica Acta*, 464 (2002) 229-235.
- [75] A.C. Pereira, A.D.S. Santos, L.T. Kubota, *Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas*, 25 (2002) 1012-1021.
- [76] J. Wang, B. Tian, *Analytical Chemistry*, 64 (1992) 1706-1709.
- [77] O. Domínguez-Renedo, M.J.G. Gonzalez, M.J. Arcos-Martínez, *Sensors*, 9 (2009) 219-231.
- [78] D. Desmond, B. Lane, J. Alderman, G. Hall, M. Alvarez-Icaza, A. Garde, J. Ryan, L. Barry, G. Svehla, D.W.M. Arrigan, L. Schniffner, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 34 (1996) 466-470.
- [79] M. Jasinski, P. Grundler, G.U. Flechsig, J. Wang, *Electroanalysis*, 13 (2001) 34-36.
- [80] K.Z. Brainina, N.Y. Stozhko, L.V. Aleshina, G.N. Lipunova, *Journal of Analytical Chemistry*, 58 (2003) 965-971.
- [81] J. Wang, S. Thongngamdee, D. Lu, *Analytica Chimica Acta*, 564 (2006) 248-252.
- [82] A.A. Ensafi, Z. Nazari, I. Fritsch, *Electroanalysis*, 22 (2010) 2551-2557.
- [83] M.F.M. Noh, I.E. Tothill, *Sains Malaysiana*, 40 (2011) 1153-1163.
- [84] N. Serrano, A. Alberich, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 46 (2013) 15-29.
- [85] L. Lin, N.S. Lawrence, S. Thongngamdee, J. Wang, Y. Lin, *Talanta*, 65 (2005) 144-148.
- [86] R.O. Kadara, I.E. Tothill, *Anal Bioanal Chem*, 378 (2004) 770-775.
- [87] M. Khairy, R.O. Kadara, D.K. Kampouris, C.E. Banks, *Analytical Methods*, 2 (2010) 645-649.
- [88] N. Serrano, J. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396 (2010) 1365-1369.
- [89] E. Katz, I. Willner, J. Wang, *Electroanalysis*, 16 (2004) 19-44.

- [90] B. Molinero-Abad, M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, *Microchimica Acta*, (2013) 1-5.
- [91] H.S. Toh, C. Batchelor-Mcauley, K. Tschulik, R.G. Compton, *Analyst*, 138 (2013) 4292-4297.
- [92] M. Chikae, K. Idegami, K. Kerman, N. Nagatani, M. Ishikawa, Y. Takamura, E. Tamiya, *Electrochemistry Communications*, 8 (2006) 1375-1380.
- [93] O. Domínguez-Renedo, L. Ruiz-Espelt, N. García-Astorgano, M.J. Arcos-Martínez, *Talanta*, 76 (2008) 854-858.
- [94] Y.S. Song, G. Muthuraman, Y.Z. Chen, C.C. Lin, J.M. Zen, *Electroanalysis*, 18 (2006) 1763-1770.
- [95] O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, *Analytica Chimica Acta*, 589 (2007) 255-260.
- [96] S. Iijima, *Nature*, 354 (1991) 56-58.
- [97] J.J. Gooding, *Electrochimica Acta*, 50 (2005) 3049-3060.
- [98] R.C. Carvalho, A. Mandil, K.P. Prathish, A. Amine, C.M.A. Brett, *Electroanalysis*, 25 (2013) 903-913.
- [99] R. Khan, W. Gorski, C.D. Garcia, *Electroanalysis*, 23 (2011) 2357-2363.
- [100] M. Moreno, A.S. Arribas, E. Bermejo, M. Chicharro, A. Zapardiel, M.C. Rodríguez, Y. Jalit, G.A. Rivas, *Talanta*, 80 (2010) 2149-2156.
- [101] L. Fu, X. Li, J. Yu, J. Ye, *Electroanalysis*, 25 (2013) 567-572.
- [102] U. Injang, P. Noyrod, W. Siangproh, W. Dungchai, S. Motomizu, O. Chailapakul, *Analytica Chimica Acta*, 668 (2010) 54-60.
- [103] J.D. Newman, A.P.F. Turner, G. Marrazza, *Analytica Chimica Acta*, 262 (1992) 13-17.
- [104] K. Kivirand, T. Rincken, *Analytical Letters*, 44 (2011) 2821-2833.
- [105] J.I. Lee, Y.W. Kim, *Korean Journal of Food Science and Technology*, 44 (2012) 141-147.

- [106] S. Piermarini, G. Volpe, R. Federico, D. Moscone, G. Palleschi, *Analytical Letters*, 43 (2010) 1310-1316.
- [107] L. Nagy, G. Nagy, R.E. Gyurcsányi, M.R. Neuman, E. Lindner, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 53 (2002) 165-175.
- [108] M. Di Fusco, R. Federico, A. Boffi, A. MacOne, G. Favero, F. Mazzei, *Anal Bioanal Chem*, 401 (2011) 707-716.
- [109] J. Lange, C. Wittmann, *Anal Bioanal Chem*, 372 (2002) 276-283.
- [110] G.C. Chemnitius, U. Bilitewski, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 32 (1996) 107-113.
- [111] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, P. Matos, M.J. Arcos-Martínez, *Analytica Chimica Acta*, 665 (2010) 26-31.
- [112] O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43 (2013) 1042-1073.
- [113] A.L. Alvarado-Gámez, M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 693 (2013) 51-55.
- [114] S. Sanllorente-Méndez, O. Domínguez-Renedo, M. Julia Arcos-Martínez, *Sensors*, 10 (2010) 2119-2128.
- [115] B.B. Rodriguez, J.A. Bolbot, I.E. Tohill, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380 (2004) 284-292.
- [116] M.R. Guascito, C. Malitesta, E. Mazzotta, A. Turco, *Sensor Letters*, 7 (2009) 153-159.
- [117] A.M. Cameán Fernández, M. Repetto, *Toxicología alimentaria*, Díaz de Santos, Madrid ; Buenos Aires, 2006.
- [118] M. Moll, N. Moll, *Compendio de riesgos alimentarios*, Acribia, Zaragoza, 2006.
- [119] G. Vollmer, *Elementos de bromatología descriptiva*, Acribia, Zaragoza, 1999.
- [120] J.J. Moreno Vígara, R.A. Peinado Amores, *Química enológica*, A. Madrid Vicente: Mundi-Prensa, Madrid, 2010.

- [121] D.M. Linares, M. Cruz Martin, V. Ladero, M.A. Alvarez, M. Fernandez, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51 691-703, 1970.
- [122] L. Beneduce, A. Romano, V. Capozzi, P. Lucas, L. Barnavon, B. Bach, P. Vuchot, F. Grieco, G. Spano, *Annals of Microbiology*, 60 (2010) 573-578.
- [123] I. Escriche Roberto, E.M. Doménech Antich, Universidad Politécnica de Valencia, *Gestión del autocontrol en la industria agroalimentaria*, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, 2006.
- [124] T. Shibamoto, L.F. Bjeldanes, B. Sáenz Pérez, *Introducción a la toxicología de los alimentos*, Acribia, Zaragoza, 1996.
- [125] J.P.F. D'Mello, *Food safety: contaminants and toxins*, CABI, Wallingford, 2003.
- [126] M. Repetto, G. Repetto Kuhn, *Toxicología fundamental*, 4 ed., Díaz de Santos, Madrid, 2009.
- [127] J.H. Duffus, H.G.J. Worth, *Fundamental toxicology*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2006.
- [128] Z. Li, Q. Zhong, J. Xing, Z. Xiong, Y. Wu, *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 13 (2013) 191-197.
- [129] J. Zhong, X. Ye, Z. Fang, G. Xie, N. Liao, J. Shu, D. Liu, *Food Control*, 28 (2012) 151-156.
- [130] Y. Wu, S. Zhou, D. Xu, *Chinese Journal of Chromatography (Se Pu)*, 31 (2013) 111-116.
- [131] F. Gosetti, E. Mazzucco, M. Gennaro, E. Marengo, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405 (2013) 907-916.
- [132] E. De Mey, G. Drabik-Markiewicz, H. De Maere, M.C. Peeters, G. Derdelinckx, H. Paelinck, T. Kowalska, *Food Chemistry*, 130 (2012) 1017-1023.
- [133] J. Sánchez, C. Ruiz-Capillas, *Eur Food Res Technol*, 234 (2012) 285-294.
- [134] R. Gatti, C. Lotti, R. Morigi, A. Andreani, *Journal of Chromatography A*, 1220 (2012) 92-100.

- [135] S. Shukla, H.-K. Park, J.-K. Kim, M. Kim, *Food Science and Biotechnology*, 20 (2011) 851-854.
- [136] C. Basheer, W. Wong, A. Makahleh, A.A. Tameem, A. Salhin, B. Saad, H.K. Lee, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 4332-4339.
- [137] P.F. Gao, X.F. Guo, H. Wang, H.S. Zhang, *Journal of Separation Science*, 34 (2011) 1383-1390.
- [138] H.L. Jiang, L.Y. Ying, S.C. Zhou, M. Ying, W. Shen, D.H. Qiu, *Journal of Separation Science*, 34 (2011) 1055-1062.
- [139] K.J. Huang, C.X. Jin, S.L. Song, C.Y. Wei, Y.M. Liu, J. Li, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879 (2011) 579-584.
- [140] S. Andic, H. Gencelep, S. Kose, *International Journal of Food Properties*, 13 (2010) 1300-1314.
- [141] A.A. Tameem, B. Saad, A. Makahleh, A. Salhin, M.I. Saleh, *Talanta*, 82 (2010) 1385-1391.
- [142] S. Shukla, H.-K. Park, J.-K. Kim, M. Kim, *Food and Chemical Toxicology*, 48 (2010) 1191-1195.
- [143] P. Forgó, A. Kiss, *Toxicological and Environmental Chemistry*, 92 (2010) 601-607.
- [144] K.J. Huang, C.Y. Wei, W.L. Liu, W.Z. Xie, J.F. Zhang, W. Wang, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 6636-6641.
- [145] N. García-Villar, S. Hernández-Cassou, J. Saurina, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 6387-6393.
- [146] Ö. Özdestan, A. Üren, *Talanta*, 78 (2009) 1321-1326.
- [147] M. Saaid, B. Saad, N.H. Hashim, A.S. Mohamed Ali, M.I. Saleh, *Food Chemistry*, 113 (2009) 1356-1362.
- [148] H.M. Mao, B.G. Chen, X.M. Qian, Z. Liu, *Microchemical Journal*, 91 (2009) 176-180.
- [149] T. Tang, T. Shi, K. Qian, P. Li, J. Li, Y. Cao, *Journal of Chromatography B*, 877 (2009) 507-512.

- [150] H. Gençcelep, G. Kaban, M.İ. Aksu, F. Öz, M. Kaya, *Food Control*, 19 (2008) 868-872.
- [151] N. Zhang, H. Wang, X.F. Guo, H.S.H. Zhang, *Journal of Separation Science*, 31 (2008) 2804-2812.
- [152] C. Proestos, P. Loukatos, M. Komaitis, *Food Chemistry*, 106 (2008) 1218-1224.
- [153] F. Gosetti, E. Mazzucco, V. Gianotti, S. Polati, M.C. Gennaro, *Journal of Chromatography A*, 1149 (2007) 151-157.
- [154] Q.X. Zhao, J. Xu, C.H. Xue, W.J. Sheng, R.C. Gao, Y. Xue, Z.J. Li, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (2007) 3083-3088.
- [155] E.H. Soufleros, E. Bouloumpasi, A. Zotou, Z. Loukou, *Food Chemistry*, 101 (2007) 704-716.
- [156] P. Hernández-Orte, A. Peña-Gallego, M.J. Ibarz, J. Cacho, V. Ferreira, *Journal of Chromatography A*, 1129 (2006) 160-164.
- [157] F. Tang, L. Tao, X. Luo, L. Ding, M. Guo, L. Nie, S. Yao, *Journal of Chromatography A*, 1125 (2006) 182-188.
- [158] Z.J. Li, Y.N. Wu, H. Liu, C.H. Xue, *Journal of hygiene research*, 34 (2005) 577-580.
- [159] F. Calbiani, M. Careri, L. Elviri, A. Mangia, L. Pistarà, I. Zagnoni, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005) 3779-3783.
- [160] E.K. Paleologos, M.G. Kontominas, *Analytical Chemistry*, 76 (2004) 1289-1294.
- [161] R.E. Anli, N. Vural, S. Yilmaz, Y.H. Vural, *Journal of Food Composition and Analysis*, 17 (2004) 53-62.
- [162] M. Szewczyńska, M. Wcisło, M. Trojanowicz, J. Saar, E. Dainese, D. Compagnone, *Chemia Analityczna*, 48 (2003) 591-606.
- [163] J. Lange, K. Thomas, C. Wittmann, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 779 (2002) 229-239.
- [164] S. Casal, M.B.P.P. Oliveira, M.A. Ferreira, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 25 (2002) 2535-2549.

- [165] N.M. Tamim, L.W. Bennett, T.A. Shellem, J.A. Doerr, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (2002) 5012-5015.
- [166] R. Romero, M. Sánchez-Viñas, D. Gázquez, M.G. Bagur, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (2002) 4713-4717.
- [167] J. Kirschbaum, K. Rebscher, H. Brückner, *Journal of Chromatography A*, 881 (2000) 517-530.
- [168] M.T. Salazar, T.K. Smith, A. Harris, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (2000) 1708-1712.
- [169] R. Romero, D. Gázquez, M.G. Bagur, M. Sánchez-Viñas, *Journal of Chromatography A*, 871 (2000) 75-83.
- [170] R. Romero, M.G. Bagur, M. Sánchez-Viñas, D. Gázquez, *Chromatographia*, 51 (2000) 404-410.
- [171] D.F. Hwang, S.H. Chang, C.Y. Shiua, C. Tuu-Jyi, *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 693 (1997) 23-29.
- [172] O. Busto, M. Miracle, J. Guasch, F. Borrull, *Journal of Chromatography A*, 757 (1997) 311-318.
- [173] D. Hornero-Méndez, A. Garrido-Fernández, *Journal of Food Protection*, 60 (1997) 414-419.
- [174] T. Hernández-Jover, M. Izquierdo-Pulido, M.T. Veciana-Nogués, M.C. Vidal-Carou, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (1996) 2710-2715.
- [175] S. Moret, L.S. Conte, *Journal of Chromatography A*, 729 (1996) 363-369.
- [176] S. Buiatti, O. Boschelle, M. Mozzon, F. Battistutta, *Food Chemistry*, 52 (1995) 199-202.
- [177] T. Bauza, A. Blaise, F. Daumas, J.C. Cabanis, *Journal of Chromatography A*, 707 (1995) 373-379.
- [178] G. Achilli, G.P. Cellerino, G.M. d'Eril, *Journal of Chromatography A*, 661 (1994) 201-205.
- [179] S. Moret, R. Bortolomeazzi, G. Lercker, *Journal of Chromatography*, 591 (1992) 175-180.

- [180] K. Takeba, T. Maruyama, M. Matsumoto, H. Nakazawa, *Journal of Chromatography*, 504 (1990) 441-444.
- [181] T.B.A. Reuvers, M. Martín de Pozuelo, M. Ramos, R. Jimenez, *Journal of Food Science*, 51 (1986) 84-86.
- [182] R.C. Causon, M.J. Brown, *Journal of Chromatography - Biomedical Applications*, 310 (1984) 11-17.
- [183] A. Peña-Gallego, P. Hernández-Orte, J. Cacho, V. Ferreira, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 3398-3401.
- [184] A. Önal, S.E.K. Tekkeli, C. Önal, *Food Chemistry*, 138 (2013) 509-515.
- [185] F.M. Abid, J.M. Salman, *Asian Journal of Chemistry*, 24 (2012) 5763-5765.
- [186] S. Jia, Y. Ryu, S.W. Kwon, J. Lee, *Journal of Chromatography A*, 1282 (2013) 1-10.
- [187] U.G. Spizzirri, D. Restuccia, M. Curcio, O.I. Parisi, F. Iemma, N. Picci, *Journal of Food Composition and Analysis*, 29 (2013) 43-51.
- [188] G. Sagratini, M. Fernández-Franzón, F. De Berardinis, G. Font, S. Vittori, J. Mañes, *Food Chemistry*, 132 (2012) 537-543.
- [189] J. Sun, H.X. Guo, D. Semin, J. Cheetham, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 4689-4697.
- [190] D. Restuccia, U.G. Spizzirri, F. Puoci, G. Cirillo, M. Curcio, O.I. Parisi, F. Iemma, N. Picci, *Talanta*, 85 (2011) 363-369.
- [191] L. Mureşan, R. Ronda Valera, I. Frébort, I.C. Popescu, E. Csöregi, M. Nistor, *Microchimica Acta*, 163 (2008) 219-225.
- [192] H. Yoshida, H. Nohta, Y. Harada, M. Yoshitake, K. Todoroki, K. Yamagata, M. Yamaguchi, *Journal of Chromatography B*, 821 (2005) 88-93.
- [193] M. Yigit, L. Ersoy, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 31 (2003) 1223-1238.
- [194] M.A. Campanero, A. López-Ocáriz, E. García-Quetglas, B. Sádaba, J.R. Azanza, *Chromatographia*, 49 (1999) 117-124.

- [195] S.R. Vale, M.B.A. Glória, *Journal of AOAC International*, 80 (1997) 1006-1012.
- [196] J. Kirschbaum, I. Busch, H. Brückner, *Chromatographia*, 45 (1997) 263-268.
- [197] O. Busto, J. Guasch, F. Borrull, *Journal of Chromatography A*, 718 (1995) 309-317.
- [198] M.T. Veciana-Nogues, T. Hernandez-Jover, A. Marine-Font, M.C. Vidal-Carou, *Journal of AOAC International*, 78 (1995) 1045-1050.
- [199] C. Almeida, J.O. Fernandes, S.C. Cunha, *Food Control*, 25 (2012) 380-388.
- [200] S.C. Cunha, M.A. Faria, J.O. Fernandes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (2011) 8742-8753.
- [201] J.O. Fernandes, M.A. Ferreira, *Journal of Chromatography A*, 886 (2000) 183-195.
- [202] S. Yamamoto, S. Wakabayashi, M. Makita, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28 (1980) 790-793.
- [203] A. Romano, H. Klebanowski, S. La Guerche, L. Beneduce, G. Spano, M.-L. Murat, P. Lucas, *Food Chemistry*, 135 (2012) 1392-1396.
- [204] E. García-Moruno, A.V. Carrascosa, R. Muñoz, *Journal of Food Protection*, 68 (2005) 625-629.
- [205] J. Lapa-Guimarães, J. Pickova, *Journal of Chromatography A*, 1045 (2004) 223-232.
- [206] A.R. Shalaby, *Food Chemistry*, 65 (1999) 117-121.
- [207] K. Naguib, A.M. Ayesh, A.R. Shalaby, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (1995) 134-139.
- [208] Y. Li, H. Yang, H. Liao, H. Fan, C. Liang, L. Deng, S. Jin, *Journal of Chromatography B*, 929 (2013) 33-39.
- [209] G. Fiechter, G. Sivec, H.K. Mayer, *Journal of Chromatography B*, 927 (2013) 191-200.
- [210] R.L. Self, W.-H. Wu, *Journal of Food Composition and Analysis*, 27 (2012) 169-173.

- [211] R. Romero-González, M.I. Alarcón-Flores, J.L.M. Vidal, A.G. Frenich, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (2012) 5324-5329.
- [212] S. Lee, H.S. Eom, M. Yoo, Y. Cho, D. Shin, *Food Sci Biotechnol*, 20 (2011) 123-129.
- [213] H.K. Mayer, G. Fiechter, E. Fischer, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 3251-3257.
- [214] M.L. Latorre-Moratalla, J. Bosch-Fusté, T. Lavizzari, S. Bover-Cid, M.T. Veciana-Nogués, M.C. Vidal-Carou, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 7715-7720.
- [215] E. Dadáková, M. Křížek, T. Pelikánová, *Food Chemistry*, 116 (2009) 365-370.
- [216] V. Gianotti, U. Chiuminatto, E. Mazzucco, F. Gosetti, M. Bottaro, P. Frascarolo, M.C. Gennaro, *Journal of Chromatography A*, 1185 (2008) 296-300.
- [217] M. Gil-Agustí, S. Carda-Broch, L. Monferrer-Pons, J. Esteve-Romero, *Journal of Chromatography A*, 1156 (2007) 288-295.
- [218] D. Bose, A. Durgbanshi, M.E. Capella-Peiró, M. Gil-Agustí, J. Esteve-Romero, S. Carda-Broch, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36 (2004) 357-363.
- [219] E.K. Paleologos, S.D. Chytiri, I.N. Savvaidis, M.G. Kontominas, *Journal of Chromatography A*, 1010 (2003) 217-224.
- [220] G. Favaro, P. Pastore, G. Saccani, S. Cavalli, *Food Chemistry*, 105 (2007) 1652-1658.
- [221] B.M. De Borba, J.S. Rohrer, *Journal of Chromatography A*, 1155 (2007) 22-30.
- [222] L. Hlabangana, S. Hernández-Cassou, J. Saurina, *Journal of Chromatography A*, 1130 (2006) 130-136.
- [223] P. Pastore, G. Favaro, D. Badocco, A. Tapparò, S. Cavalli, G. Saccani, *Journal of Chromatography A*, 1098 (2005) 111-115.
- [224] R. Draisci, G. Volpe, L. Lucentini, A. Cecilia, R. Federico, G. Palleschi, *Food Chemistry*, 62 (1998) 225-232.

- [225] R. Draisci, L. Giannetti, P. Boria, L. Lucentini, L. Palleschi, S. Cavalli, *Journal of Chromatography A*, 798 (1998) 109-116.
- [226] G. Saccani, E. Tanzi, P. Pastore, S. Cavalli, M. Rey, *Journal of Chromatography A*, 1082 (2005) 43-50.
- [227] A. Shukla, S.K. Sanghi, V.S. Gowri, V.K. Baderia, S. Lamba, D.K. Singh, *Journal of Analytical Chemistry*, 66 (2011) 296-300.
- [228] Q. Wang, H. Yu, H. Li, F. Ding, P. He, Y. Fang, *Food Chemistry*, 83 (2003) 311-317.
- [229] X. Liu, L.X. Yang, Y.T. Lu, *Journal of Chromatography A*, 998 (2003) 213-219.
- [230] G. Nouadje, N. Siméon, F. Dedieu, M. Nertz, P. Puig, F. Couderc, *Journal of Chromatography A*, 765 (1997) 337-343.
- [231] M. Saaid, B. Saad, A.S.M. Ali, M.I. Saleh, C. Basheer, H.K. Lee, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 5165-5170.
- [232] P. Ginterová, J. Marák, A. Staňová, V. Maier, J. Ševčík, D. Kaniansky, *Journal of Chromatography B*, 904 (2012) 135-139.
- [233] A. Jastrzębska, *European Food Research and Technology*, 235 (2012) 563-572.
- [234] W. Li, J. Ge, Y. Pan, Q. Chu, J. Ye, *Microchimica Acta*, 177 (2012) 75-80.
- [235] L.M. Swann, S.L. Forbes, S.W. Lewis, *Talanta*, 81 (2010) 1697-1702.
- [236] N.J. Kuklinski, E.C. Berglund, J. Engelbreksson, A.G. Ewing, *Electrophoresis*, 31 (2010) 1886-1893.
- [237] S. Zhao, Y. Huang, M. Shi, Y.M. Liu, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 5155-5159.
- [238] C. Simó, M.V. Moreno-Arribas, A. Cifuentes, *Journal of Chromatography A*, 1195 (2008) 150-156.
- [239] C.N. Jayarajah, A.M. Skelley, A.D. Fortner, R.A. Mathies, *Analytical Chemistry*, 79 (2007) 8162-8169.
- [240] N. García-Villar, J. Saurina, S. Hernández-Cassou, *Electrophoresis*, 27 (2006) 474-483.

- [241] F. Kvasnička, M. Voldřich, *Journal of Chromatography A*, 1103 (2006) 145-149.
- [242] B. Santos, B.M. Simonet, A. Ríos, M. Valcárcel, *Electrophoresis*, 25 (2004) 3427-3433.
- [243] A. Kovács, L. Simon-Sarkadi, K. Ganzler, *Journal of Chromatography A*, 836 (1999) 305-313.
- [244] I. Rodríguez, H.K. Lee, S.F.Y. Li, *Electrophoresis*, 20 (1999) 118-126.
- [245] M. Křížek, T. Pelikánová, *Journal of Chromatography A*, 815 (1998) 243-250.
- [246] S. Oguri, S. Watanabe, S. Abe, *Journal of Chromatography A*, 790 (1997) 177-183.
- [247] L. Arce, A. Ríos, M. Valcárcel, *Chromatographia*, 46 (1997) 170-176.
- [248] K. Punakivi, M. Smolander, M.L. Niku-Paavola, J. Mattinen, J. Buchert, *Talanta*, 68 (2006) 1040-1045.
- [249] B. Bóka, N. Adányi, D. Virág, M. Sebela, A. Kiss, *Electroanalysis*, 24 (2012) 181-186.
- [250] M. Niculescu, C. Nistor, I. Frébott, P. Peč, B. Mattiasson, E. Csöregi, *Analytical Chemistry*, 72 (2000) 1591-1597.
- [251] I.M. Apetrei, C. Apetrei, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 178 (2013) 40-46.
- [252] D. Telsnig, A.T. Krenn, V. Kassarnig, K. Kalcher, A. Ortner, *International Journal of Electrochemical Science*, 7 (2012) 6893-6903.
- [253] D. Telsnig, K. Kalcher, A. Leitner, A. Ortner, *Electroanalysis*, 25 (2013) 47-50.
- [254] S.R. Taylor, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 28 (1964) 1273-1285.
- [255] B.J. Alloway, *Heavy metals in soils*, 2nd ed ed., Blackie Academic & Professional, London [etc.], 1995.
- [256] Elementos de la tabla periódica y sus propiedades, <http://elementos.org.es/cromo>

- [257] N.N. Greenwood, A. Earnshaw, Chemistry of the elements, 2nd ed ed., Butterworth Heinemann, Oxford, 1997.
- [258] C.E. Housecroft, A.G. Sharpe, P. Gil Ruiz, Química inorgánica, 2a ed ed., Pearson Educacion, Madrid, 2006.
- [259] <http://tecnolowikia.wikispaces.com/Aplicaciones+del+Cromo>
- [260] Water treatment solutions,
<http://www.lenntech.com/periodic/elements/cr.htm>
- [261] PRTR- Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes,
<http://www.prtr-es.es/Cr-Cromo-y-compuestos,15606,11,2007.html>
- [262] G. Choppala, N. Bolan, D. Lamb, A. Kunhikrishnan, Water, Air and Soil Pollution, 224 (2013) 1-12.
- [263] Ciencia y desarrollo,
<http://www.cyd.conacyt.gob.mx/215/Articulos/Cromado/Cromado2.html>
- [264] Ecología hoy, el cromo como tóxico ambiental,
<http://www.ecologiahoy.com/el-cromo-como-toxico-ambiental>
- [265] EPA, <http://www.epa.gov/airtoxics/hlthef/chromium.html>
- [266] WHO : Organización mundial de la salud,
http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/es/
- [267] C. Cámara, C. Pérez-Conde, Análisis químico de trazas, Síntesis, Madrid, 2011.
- [268] V. Gomez, M.P. Callao, Trac-Trends in Analytical Chemistry, 25 (2006) 1006-1015.
- [269] R. Rakhunde, L. Deshpande, H.D. Juneja, Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 42 (2012) 776-810.
- [270] N. Unceta, F. Séby, J. Malherbe, O.F.X. Donard, Anal Bioanal Chem, 397 (2010) 1097-1111.
- [271] M. Zeeb, M.R. Ganjali, P. Norouzi, Food Analytical Methods, 6 (2013) 1398-1406.
- [272] S. Wen, J. Wu, X. Zhu, Journal of Molecular Liquids, 180 (2013) 59-64.

- [273] J.A. Baig, A. Hol, A. Akdogan, A.A. Kartal, U. Divrikli, T.G. Kazi, L. Elci, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27 (2012) 1509-1517.
- [274] P. Hemmatkhah, A. Bidari, S. Jafarvand, M.R.M. Hosseini, Y. Assadi, *Microchimica Acta*, 166 (2009) 69-75.
- [275] I. López-García, M. Briceño, Y. Vicente-Martínez, M. Hernández-Córdoba, *Talanta*, 115 (2013) 166-171.
- [276] M.D.M. Abadi, M. Chamsaz, M.H. Arbab-Zavar, F. Shemirani, *Analytical Methods*, 5 (2013) 2971-2977.
- [277] A.S. Amin, M.A. Kassem, *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 96 (2012) 541-547.
- [278] J. Chwastowska, W. Skwara, E. Sterlińska, L. Pszonicki, *Talanta*, 66 (2005) 1345-1349.
- [279] Ş. Saçmacı, Ş. Kartal, Y. Yılmaz, M. Saçmacı, C. Soykan, *Chemical Engineering Journal*, 181-182 (2012) 746-753.
- [280] S. Tokalioglu, S. Arsav, A. Delibas, C. Soykan, *Analytica Chimica Acta*, 645 (2009) 36-41.
- [281] K.O. Saygi, M. Tuzen, M. Soylak, L. Elci, *Journal of Hazardous Materials*, 153 (2008) 1009-1014.
- [282] Y. Wu, Y. Jiang, D. Han, F. Wang, J. Zhu, *Microchimica Acta*, 159 (2007) 333-339.
- [283] A.A. Ambushe, R.I. McCrindle, C.M.E. McCrindle, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 24 (2009) 502-507.
- [284] S. Chen, L. Zhu, D. Lu, X. Cheng, X. Zhou, *Microchimica Acta*, 169 (2010) 123-128.
- [285] Y.F. Huang, Y. Li, Y. Jiang, X.P. Yan, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 25 (2010) 1467-1474.
- [286] J. Lu, J. Tian, H. Wu, C. Zhao, *Analytical Letters*, 42 (2009) 1662-1677.
- [287] G.D. Matos, E.B. dos Reis, A.C.S. Costa, S.L.C. Ferreira, *Microchemical Journal*, 92 (2009) 135-139.

- [288] Z. Sun, P. Liang, *Microchimica Acta*, 162 (2008) 121-125.
- [289] K. Kiran, K.S. Kumar, B. Prasad, K. Suvardhan, R.B. Lekkala, K. Janardhanam, *Journal of Hazardous Materials*, 150 (2008) 582-586.
- [290] F. Shemirani, S.D. Abkenar, A.A. Mirroshandel, M.S. Niasari, R.R. Kozania, *Analytical Sciences*, 19 (2003) 1453-1456.
- [291] P. Liang, H. Sang, *Journal of Hazardous Materials*, 154 (2008) 1115-1119.
- [292] M. Hashemi, S.M. Daryanavard, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 92 (2012) 189-193.
- [293] L.-L. Wang, J.-Q. Wang, Z.-X. Zheng, P. Xiao, *Journal of Hazardous Materials*, 177 (2010) 114-118.
- [294] A.N. Tang, D.Q. Jiang, Y. Jiang, S.W. Wang, X.P. Yan, *Journal of Chromatography A*, 1036 (2004) 183-188.
- [295] L. Xing, D. Beauchemin, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 25 (2010) 1046-1055.
- [296] Z. Chen, M. Megharaj, R. Naidu, *Talanta*, 72 (2007) 394-400.
- [297] M. Patsar-Kallio, P.K.G. Manninen, *Journal of Chromatography A*, 750 (1996) 89-95.
- [298] M. Stanislawska, B. Janasik, W. Wasowicz, *Talanta*, 117 (2013) 14-19.
- [299] Y. Pang, M. Liu, S. Liu, Z. Dong, *Chinese Journal of Chromatography (Se Pu)*, 29 (2011) 1027-1030.
- [300] M. Mulugeta, G. Wibetoe, C.J. Engelsen, W. Lund, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 6186-6194.
- [301] H.-J. Wang, X.-M. Du, M. Wang, T.-C. Wang, H. Ou-Yang, B. Wang, M.-T. Zhu, Y. Wang, G. Jia, W.-Y. Feng, *Talanta*, 81 (2010) 1856-1860.
- [302] G.K. Zoorob, J.A. Caruso, *Journal of Chromatography A*, 773 (1997) 157-162.
- [303] D.Y. Sarica, A.R. Türker, E. Erol, *Journal of Separation Science*, 29 (2006) 1600-1606.

- [304] M. Bittner, J.A.C. Broekaert, *Analytica Chimica Acta*, 364 (1998) 31-40.
- [305] Sarenqiqige, M. Ashitomi, K. Yoshimura, *Analytical Sciences*, 29 (2013) 823-829.
- [306] M. Safari, S. Nojavan, S.S.H. Davarani, A. Morteza-Najarian, *Analytica Chimica Acta*, 789 (2013) 58-64.
- [307] H.M. Jiang, T. Yang, Y.H. Wang, H.Z. Lian, X. Hu, *Talanta*, 116 (2013) 361-367.
- [308] R. Karosi, K. Boruzs, Á. Béni, J. Posta, J. Balogh, V. Andruch, *Analytical Methods*, 4 (2012) 2361-2364.
- [309] Y. Gu, X. Zhu, *Microchimica Acta*, 173 (2011) 433-438.
- [310] M.R. Moghadam, S. Dadfarnia, A.M. Haji Shabani, *Journal of Hazardous Materials*, 186 (2011) 169-174.
- [311] S. Melaku, R. Cornelis, F. Vanhaecke, R. Dams, L. Moens, *Microchimica Acta*, 150 (2005) 225-231.
- [312] S. Sadeghi, A. Zeraatkar Moghaddam, *Talanta*, 99 (2012) 758-766.
- [313] B. Yang, Z. Fan, *Journal of Analytical Chemistry*, 67 (2012) 443-447.
- [314] M.E. Soares, E. Vieira, M. De Lourdes Bastos, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (2010) 1366-1370.
- [315] P. Wu, H. Chen, G. Cheng, X. Hou, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 24 (2009) 1098-1104.
- [316] C.F. Lee, B.H. Chen, Y.L. Huang, *Talanta*, 77 (2008) 546-550.
- [317] A.M. Zou, X.Y. Tang, M.L. Chen, J.H. Wang, *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 63 (2008) 607-611.
- [318] Y. Ren, Z. Fan, J. Wang, *Microchimica Acta*, 158 (2007) 227-231.
- [319] X. Zhu, B. Hu, Z. Jiang, M. Li, *Water Research*, 39 (2005) 589-595.
- [320] H. Tavallali, G. Deilamy-Rad, P. Peykarimah, *Environmental Monitoring and Assessment*, 185 (2013) 7723-7738.

- [321] H. Gitet, P.A. Subramanian, D. Minilu, T. Kiros, M. Hilawie, G. Gebremariam, K. Taye, *Talanta*, 116 (2013) 626-629.
- [322] H. Yu, W. Sun, X. Zhu, X. Zhu, J. Wei, *Analytical Sciences*, 28 (2012) 1219-1224.
- [323] C. Zeng, Y. Lin, N. Zhou, J. Zheng, W. Zhang, *Journal of Hazardous Materials*, 237-238 (2012) 365-370.
- [324] C.D. Pereira, J.G. Techy, E.M. Ganzarolli, S.P. Quináia, *Journal of Environmental Monitoring*, 14 (2012) 1559-1564.
- [325] M.A. Chamjangali, N. Goudarzi, M. Mirheidari, B. Bahramian, *Journal of Hazardous Materials*, 192 (2011) 813-821.
- [326] A. Duran, M. Tuzen, M. Soylak, *Food and Chemical Toxicology*, 49 (2011) 1633-1637.
- [327] O.D. Uluozlu, M. Tuzen, D. Mendil, B. Kahveci, M. Soylak, *Journal of Hazardous Materials*, 172 (2009) 395-399.
- [328] O.D. Uluozlu, M. Tuzen, M. Soylak, *Food and Chemical Toxicology*, 47 (2009) 2601-2605.
- [329] R.P. Monasterio, J.C. Altamirano, L.D. Martínez, R.G. Wuilloud, *Talanta*, 77 (2009) 1290-1294.
- [330] M.S. Hosseini, A.R.R. Sarab, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 87 (2007) 375-385.
- [331] A. Bazzi, B. Kreuz, J. Wuokila, A. Maqboul, *Journal of Chemical Education*, 82 (2005) 435-438.
- [332] M.V. Balarama Krishna, K. Chandrasekaran, S.V. Rao, D. Karunasagar, J. Arunachalam, *Talanta*, 65 (2005) 135-143.
- [333] A. Tunçeli, A.R. Türker, *Talanta*, 57 (2002) 1199-1204.
- [334] M.J. Marqués, A. Morales-Rubio, A. Salvador, M. De la Guardia, *Talanta*, 53 (2001) 1229-1239.
- [335] T. Prasada Rao, S. Karthikeyan, B. Vijayalekshmy, C.S.P. Iyer, *Analytica Chimica Acta*, 369 (1998) 69-77.
- [336] D. Barankiewicz, B. Pikosz, M. Belter, M. Marcinkowska, *Accreditation and Quality Assurance*, 18 (2013) 391-401.

- [337] K.C. Hsu, C.C. Sun, Y.C. Ling, S.J. Jiang, Y.L. Huang, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 28 (2013) 1320-1326.
- [338] S. Chen, S. Zhu, D. Lu, *Atomic Spectroscopy*, 33 (2012) 153-157.
- [339] M.M.L. Guerrero, E.V. Alonso, J.M.C. Pavón, M.T.S. Cordero, A.G. De Torres, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27 (2012) 682-688.
- [340] S. Chen, S. Zhu, D. Lu, *Microchemical Journal*, 97 (2011) 196-200.
- [341] D.A. Rogers, S.J. Ray, G.M. Hieftje, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 25 (2010) 62-73.
- [342] J.P. Lafleur, E.D. Salin, *Analytical Chemistry*, 80 (2008) 6821-6823.
- [343] M.K. Donais, R. Henry, T. Rettberg, *Talanta*, 49 (1999) 1045-1050.
- [344] M. Pantsar-Kallio, P.K.G. Manninen, *Analytica Chimica Acta*, 318 (1996) 335-343.
- [345] Y. Inoue, T. Sakai, H. Kumagai, *Journal of Chromatography A*, 706 (1995) 127-136.
- [346] H.R. Badiei, J. McEnaney, V. Karanassios, *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 78 (2012) 42-49.
- [347] O. Ozay, N. Aktas, N. Sahiner, *Separation Science and Technology*, 46 (2011) 1450-1461.
- [348] T. Sumida, A. Sabarudin, M. Oshima, S. Motomizu, *Analytical Sciences*, 22 (2006) 161-164.
- [349] T. Sumida, T. Ikenoue, K. Hamada, A. Sabarudin, M. Oshima, S. Motomizu, *Talanta*, 68 (2005) 388-393.
- [350] X. Zhu, B. Hu, Z. Jiang, Y. Wu, S. Xiong, *Analytica Chimica Acta*, 471 (2002) 121-126.
- [351] N.N. Meeravali, K. Madhavi, S.J. Kumar, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 26 (2011) 214-219.
- [352] Y. Li, B. Hu, Z. Jiang, Y. Wu, *Analytical Letters*, 39 (2006) 809-822.

- [353] S.M. Yousefi, F. Shemirani, *Journal of Hazardous Materials*, 254-255 (2013) 134-140.
- [354] M.S. El-Shahawi, A.S. Bashammakh, M. Abdelmageed, *Analytical Sciences*, 27 (2011) 757-763.
- [355] L.V. Mulaudzi, J.F. Van Staden, R.I. Stefan, *Analytica Chimica Acta*, 467 (2002) 51-60.
- [356] E.K. Paleologos, S.I. Lafis, S.M. Tzouwara-Karayanni, M.I. Karayannis, *Analyst*, 123 (1998) 1005-1009.
- [357] M.S. El-Shahawi, H.M. Al-Saidi, A.S. Bashammakh, A.A. Al-Sibaai, M.A. Abdelfadeel, *Talanta*, 84 (2011) 175-179.
- [358] M.S. Hosseini, F. Belador, *Journal of Hazardous Materials*, 165 (2009) 1062-1067.
- [359] W.P. Yang, Z.J. Zhang, W. Deng, *Journal of Chromatography A*, 1014 (2003) 203-214.
- [360] W.P. Yang, Z.J. Zhang, W. Deng, *Analytica Chimica Acta*, 485 (2003) 169-177.
- [361] A. Bobrowski, A. Królicka, J. Zarębski, *Electroanalysis*, 21 (2009) 1449-1458.
- [362] E.O. Jorge, M.M. Rocha, I.T.E. Fonseca, M.M.M. Neto, *Talanta*, 81 (2010) 556-564.
- [363] V. Arancibia, E. Nagles, M. Gómez, C. Rojas, *International Journal of Electrochemical Science*, 7 (2012) 11444-11455.
- [364] M. Grabarczyk, *Electroanalysis*, 20 (2008) 2217-2222.
- [365] A. Bobrowski, B. Baś, J. Dominik, E. Niewiara, E. Szalińska, D. Vignati, J. Zarębski, *Talanta*, 63 (2004) 1003-1012.
- [366] O. Domínguez, M.J. Arcos, *Analytica Chimica Acta*, 470 (2002) 241-252.
- [367] Y. Li, H. Xue, *Analytica Chimica Acta*, 448 (2001) 121-134.
- [368] O. Domínguez, M.J. Arcos, *Electroanalysis*, 12 (2000) 449-458.

- [369] M. Boussemart, C.M.G. Van den Berg, M. Ghaddaf, *Analytica Chimica Acta*, 262 (1992) 103-115.
- [370] D.V. Vukomanovic, G.W. vanloon, K. Nakatsu, D.E. Zoutman, *Microchemical Journal*, 57 (1997) 86-95.
- [371] O. Domínguez, M. Asunción Alonso, M.J. Arcos, *Electroanalysis*, 14 (2002) 1083-1089.
- [372] R.A. Sanchez-Moreno, M. Jesus Gismera, M. Teresa Sevilla, J.R. Procopio, *Electroanalysis*, 23 (2011) 287-294.
- [373] M.F. Bergamini, D.P. dos Santos, M.V. Boldrin Zanoni, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 123 (2007) 902-908.
- [374] J.P. Metters, R.O. Kadara, C.E. Banks, *Analyst*, 137 (2012) 896-902.
- [375] P.M. Hallam, D.K. Kampouris, R.O. Kadara, C.E. Banks, *Analyst*, 135 (2010) 1947-1952.
- [376] O. Domínguez-Renedo, L. Ruiz-Espelt, N. García-Astorgano, M. Julia Arcos-Martínez, *Talanta*, 76 (2008) 854-858.
- [377] S. Sadeghi, A. Garmroodi, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 33 (2013) 4972-4977.
- [378] S. Banerjee, P. Sarkar, *Sensor Letters*, 9 (2011) 1370-1375.

**3. BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO BASADO EN EL
ENZIMA PAO PARA LA DETERMINACIÓN DE TIRAMINA**

3.1. Introducción

Tal y como se ha descrito en el capítulo anterior la Tyr es una de las BAs que se encuentra con mayor frecuencia en productos alimentarios y cuya determinación resulta interesante desde el punto de vista analítico debido a sus importantes efectos tóxicos para el ser humano.

En este capítulo se describe la puesta a punto de un método para la determinación electroquímica de Tyr utilizando un biosensor amperométrico basado en SPCEs modificados con el enzima PAO. La inmovilización del enzima en el biosensor se realiza mediante entrecruzamiento utilizando GA y BSA. Con el objetivo de obtener una respuesta amperométrica con la mejor calidad analítica posible, se lleva a cabo una etapa de optimización de la concentración empleada de los agentes de entrecruzamiento, así como de

las unidades enzimáticas finalmente inmovilizadas sobre la superficie electródica.

Los factores experimentales que afectan a la variable respuesta en amperometría son el potencial aplicado (E_{ap}) y el pH de la disolución de medida. No obstante, en este trabajo, se emplea además un mediador electroquímico, concretamente el HOMeFc. La utilización de dicho mediador tiene como objetivo reducir el valor del potencial de trabajo utilizado en la determinación de Tyr. Por lo tanto, las variables experimentales a optimizar son el E_{ap} , el pH y [HOMeFc]. Este proceso de optimización se lleva a cabo empleando la metodología del diseño de experimentos.

El método analítico desarrollado se valida en términos de precisión y exactitud, analizando los valores de reproducibilidad y repetibilidad del mismo. Por otra parte, a la hora de caracterizar un procedimiento analítico es esencial establecer el valor de la capacidad de detección del mismo. En este caso dicho valor se establece teniendo en cuenta la probabilidad de falso negativo y falso positivo.

Debido a que la Tyr no es la única BA que puede encontrarse frecuentemente en productos alimentarios, es necesario analizar la posible interferencia que pudiera causar la presencia de otras BAs como son: His, Put, Cad, Tryp, Spm y Spd.

Con el objetivo de comprobar la aplicabilidad del método desarrollado, se lleva a cabo la determinación de Tyr en una muestra real concretamente, una muestra de queso brie comercial. Esta muestra fue seleccionada para su análisis debido a su mayor contenido en Tyr respecto al resto de BAs. Para realizar dicha determinación fue necesaria una extracción previa del analito. Finalmente, la eficacia del método de análisis en muestras complejas se verifica mediante el análisis de una muestra de queso brie enriquecida con una cantidad conocida de Tyr.

El trabajo experimental desarrollado en este capítulo ha dado lugar a una publicación científica titulada: “*Disposable amperometric biosensor for the determination of tyramine using plasma amine oxidase*” (Microchimica Acta 180 (2013) 253-259). Además, ha sido presentado en forma de comunicación oral en la XXXIII Reunión del Grupo de Electroquímica de la Real Sociedad Española de Química, celebrada en Miraflores de la sierra (Madrid) del 1 al 4 de Julio de 2012.

3.2. Disposable amperometric biosensor for the determination of tyramine using PAO

3.2.1. Abstract

We have developed SPCEs for the determination of Tyr via PAO. The enzyme was immobilized on the carbon working electrode by cross-linking it with BSA using GA. The employment of the mediator HOMeFc lowers the working potential to +260 mV (vs. a screen-printed Ag/AgCl reference electrode). The effects of pH, potential and mediator concentration were optimized and resulted in reproducibility and repeatability values of 8.6% and 8.7%, respectively. Response is linear in the range from 2 to 164 μM , and the capability of detection is $2.0 \pm 0.2 \mu\text{M}$. The effects of potentially interfering BAs such as Put, Cad, His, Spm, Spd and Tryp were also

evaluated. The biosensor was successfully applied to the determination of Tyr in cheese.

3.2.2. Introduction

BAs are organic bases with aliphatic (Put, Cad, Spm, Spd), aromatic (Tyr) or heterocyclic (His, Tryp) structures that can be found in several food products, in which they are mainly produced by microbial decarboxylation of amino acids. BAs have an important role as chemical indicators of microbial contamination and processing conditions in fresh and processed food. In fact, it is very frequent the presence of these compounds in products such as meat, fish, cheese, beer, wine or milk [1-6], being Tyr (4-(2-aminoethyl) phenol) one of the most common BAs found in these systems.

Ingested Tyr does not normally cause any direct hazard to human health due to its metabolization to p-hydroxyl-phenylacetic acid under MAO enzyme catalytic action. However, patients under treatment with MAO inhibitors, such as antidepressants or antitubercular drugs, can suffer a serious hypertensive reaction if they take large amounts of this amine. This well-known hypertensive reaction is named “cheese effect” or “cheese reaction” due to the high significant amounts of Tyr found in different varieties of cheese [7].

Therefore, several methods have been developed for the quantitative determination of Tyr in cheese and other foods, including capillary electrophoresis [8, 9] and chromatographic techniques [10-12]. The above-cited techniques require in most cases tedious pre-treatment and derivation steps of the sample, as well as expensive and complex instrumentation. Consequently, these techniques result not suitable for in situ analysis.

Sensors based on optical methods (fluorescence or UV-Vis spectroscopy) have been also used for the analysis of different BAs including Tyr. These optical sensors are based on the synthesis of complex molecules which react with BAs giving an optical signal (generally a colour change) [13-16]. These last sensors lack of the advantages of simplicity of instrumentation and procedure, as well as the applicability features of other analytical systems such as electrochemical biosensors.

Amperometric biosensors, based on enzyme modified electrodes using AOs enzymes, have been developed as very interesting systems for BAs determination. These analytical devices combine the selectivity of the enzymes for its natural substrate with the sensitivity of the electrochemical detection. In this way, Tyr has been analyzed by electrochemical biosensors based on the immobilization of MAO [17-19] or DAO [6, 17] on the surface of different working electrodes. The performance of these biosensors can be improved by the employment of SPEs. SPEs allow the sensitive in situ determination of different substances thanks to their reduced dimensions and disposable characteristics. Moreover, it should be highlighted the great diversity of possible modifications of their working electrode, including the immobilization of enzymes for biosensor development.

The analysis of BAs using SPEs modified with different AO enzymes has been described by different authors (Table 3.1.). Most of these methods are based on the electrochemical detection of the hydrogen peroxide generated by the enzyme-catalysed oxidation of the BA at potentials around +600 mV. The application of high potentials increases the possibility of interference in the electrochemical measurement of the target analyte. This lack of sensitivity can be overcome by using different mediators, which reduce the applied potential. Thus, HOMeFc [20] has been used in a bienzymatic system that combines MAO and HRP enzymes.

Table 3.1: Determination of BAs using enzymatic biosensors based on SPES

Ref	BA	Enzymes	Electrode	Immobilization	Electrode area	Mode of operation	Mediator	Concentration range	Capability of detection	Sensitivity	Real sample
[18]	His	PAO						10-200 mg kg ⁻¹ (His)	10 mg kg ⁻¹ (His)	0.7 mg kg ⁻¹ (His)	
	Tyr	TAO	SPPtE	Cross-linking with GA and BSA	3 mm ²	Amp E _{ap} = 700mV		10-200 mg kg ⁻¹ (Tyr)	5 mg kg ⁻¹ (Tyr)	1.0 mg kg ⁻¹ (Tyr)	Fish
	Put	DAO						5-100 mg kg ⁻¹ (Put)	5 mg kg ⁻¹ (Put)	2.8 mg kg ⁻¹ (Put)	
[22]	Put, Cad, Spd	PUO						0.06-200 μM (Put)		2.4 nA μM ⁻¹ (Put)	
								0.1-14 μM (Cad)		2.7 nA μM ⁻¹ (Cad)	
			SPPtE	Cross-linking with GA and BSA		Amp E _{ap} = 600mV		0.1-20 μM (Spd)		2.1 nA μM ⁻¹ (Spd)	Fish
	His, Tyr	MAO						0.17-20 μM (His)		0.9 nA μM ⁻¹ (His)	
								0.1-6 μM (Tyr)		3.9 nA μM ⁻¹ (Tyr)	
[23]	Overall BAs content	DAO	SPAuE	Entrapment in a Polyazetidine prepolymer membrane		Amp E _{ap} = 600mV		0.7-20 mg L ⁻¹ (Put)	0.2 mg L ⁻¹ (Put)	11.2 nA mg ⁻¹ (Put)	Wine, beer
[20]	Overall BAs content	MAO/HRP	SPCE	Covalent link (diazonium salt)	4 mm ²	Amp E _{ap} = 250mV	HOMeFc	0.4-2.4 μM (His)	0.40 ± 0.04 μM (His)	34.2 nA μM ⁻¹ (His)	Fish
		DAO/HRP						0.2-1.6 μM (His)	0.18 ± 0.01 μM (His)	17.5 nA μM ⁻¹ (His)	
[21]	Put, Cad, Spm, Spd, His	DAO	Prussian blue-SPE	Cross-linking with GA and BSA	7 mm ²	Amp E _{ap} = -50mV	PB	20-300 μM (Put)	10 μM (Put)		Saliva
[24]	Put	PUO	SPPtE	Cross-linking	1.77 mm ²	Amp. E _{ap} = 600mV			50 nM (Put)	0.57 nA μM ⁻¹ (Put)	Blood
This work	Tyr	PAO	SPCE	Cross-linking with GA and BSA	15.9 mm ²	Amp. E _{ap} = 260mV	HOMeFc	2-164 μM	2.02 ± 0.18 μM	2.31 nA μM ⁻¹	Cheese

Prussian Blue has also been used as a mediator in the determination of BAs, using a DAO based biosensor involving a complex and time consuming modification procedure [21].

This work shows an easier of use, sensitive and disposable amperometric biosensor for the determination of Tyr content in cheese samples using H₂OMEFc as a redox mediator. The immobilization of PAO enzyme on SPCEs has been carried out by cross-linking using GA as a bifunctional cross-linker agent in presence of BSA.

3.2.3. Experimental

3.2.3.1. Reagents

SPEs were fabricated using different commercial inks. C10903P14 (carbon ink) and D2071120D1 (dielectric ink) were purchased from Gwent Electronic Materials (Torfaen, U.K). Electrodag 6037 SS (Ag/AgCl ink) and Electrodag 418 (Ag ink) were supplied by Acheson Colloiden (Scheemda, The Netherlands).

Milli Q (Millipore, Bedford, USA) water was employed for preparing all solutions. All the reagents used were of analytical grade without further purification. Stock standard solutions of Tyr were prepared by dissolving the adequate amount of Tyr 97% (Across organics, Geel, Belgium, www.acros.be) in water. Cad, Put and His were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany, www.sigmaaldrich.com). Solutions of these compounds were prepared in water. Spm and Spd solutions were prepared by dissolving the adequate amount of Acros Organics (Geel, Belgium, www.acros.be) products in water. Tryp solutions were prepared by dissolving the adequate amount of Tryp 98% (Acros Organics, Geel, Belgium, www.acros.be) in 10% ethanol (Merck, Darmstadt, Germany, www.merck.com) solution.

The enzyme PAO was obtained from Worthington Biochemical (New Jersey, USA). BSA and GA used in the immobilization of the enzyme were both purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany, www.sigmaaldrich.com). BSA solutions were prepared in 50 mM phosphate pH 6 buffer solution and GA solutions were prepared in water.

Electrochemical measurements were carried out using a 50 mM phosphate buffer (KH_2PO_4 , Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany, www.sigmaaldrich.com) and 0.1 M KCl solution (Merck, Darmstadt, Germany, www.merck.com) as supporting electrolyte. From this, solutions of different pH values were prepared by addition of a 1 M sodium hydroxide solution (J.T. Baker, Deventer, The Netherlands, www.jtbaker.nl).

HClO_4 (Panreac, Barcelona, Spain), NH_3 (Merck, Darmstadt, Germany), ethyl acetate (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany, www.sigmaaldrich.com), acetone (Merck, Darmstadt, Germany, www.merck.com) and anhydrous sodium sulphate (Merck, Darmstadt, Germany, www.merck.com) were used for the Tyr extraction process from a commercial cheese samples.

3.2.3.2. Apparatus

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

Electrochemical measurements were made with a μ Autolab with GPES software (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands, www.ecochemie.nl) and a PalmSens (PalmSens, The Netherlands, www.palmsens.com) electrochemical systems. The pH of the solution was measured with a Hanna instruments HI 221 pH meter (www.hannainst.es). Centrifugation of the samples was carried out in a J P Selecta Angular 6 centrifuge (The Netherlands).

3.2.3.3. Construction of SPCEs and SPCEs surface modification

A three-electrode configuration was used, consisting of a carbon working electrode, an Ag/AgCl reference electrode and a carbon auxiliary electrode (Figure 3.1.).

PAO was immobilized onto the working SPCE surface using GA and BSA. It is well known that GA reacts with lysine residues on the exterior of the proteins and the addition of BSA accelerates the cross-linking process creating a friendly environment for enzyme immobilization. The cross-linking process does not significantly affect the enzyme molecules maintaining its catalytic sites more accessible for redox reactions, which leads to more efficient catalysis than with direct enzyme immobilization [22].

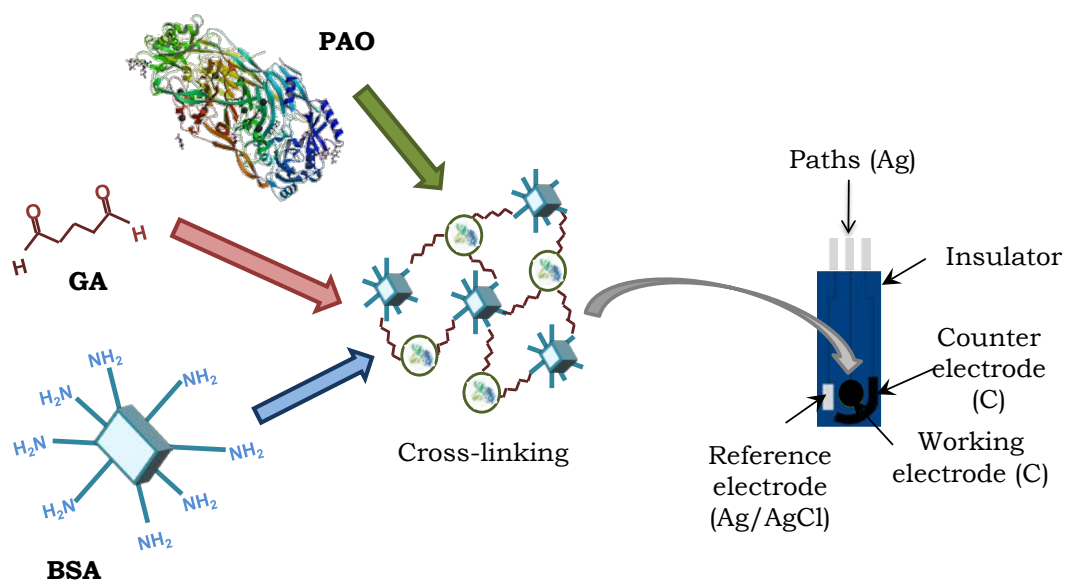


Figure 3.1.: Immobilization of PAO by crosslinking on SPCE.

Therefore, in this work a mixture of 1 μL of BSA (3%, w/v), 1 μL of GA (2.5%, v/v) and 3 μL of PAO (6%, w/v) solutions onto the surface of the working electrode. Then, it was left to react for 90 minutes at 4°C.

3.2.3.4. Measuring procedure of the enzyme SPCEs sensors

Electrochemical measurements were carried out by amperometry, using PAO modified SPCEs (PAO/SPCEs). All measurements were made at room temperature in an electrochemical cell containing 5 mL of supporting electrolyte and 22 μM of a HOMEFc solution, under constant stirring.

The working electrode operated at +260 mV vs screen-printed Ag/AgCl reference electrode, except for the experimental variables optimization process. Once a stable baseline was recorded, defined amounts of Tyr stock solution were added to the measuring cell. A cathodic current was observed after each addition reaching a plateau each time (Figure 3.2(a)).

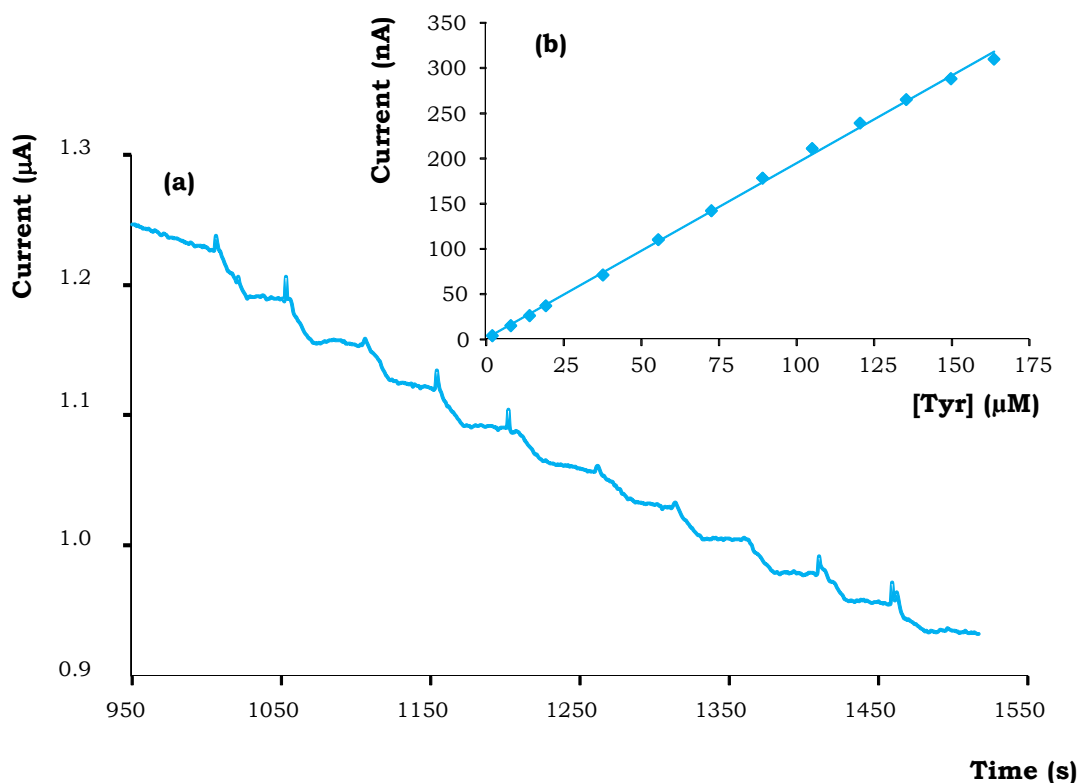


Figure 3.2.: (a) Chronoamperogram recorded on PAO/SPCEs for successive additions of 100 μL of a 1 mM Tyr solution. (b) Relation between amperometric current intensity vs concentration of Tyr in PAO/SPCEs biosensors (pH, 6.65; E_{ap} , +260 mV vs Ag/AgCl SPE; [HOMEFc], 22 μM).

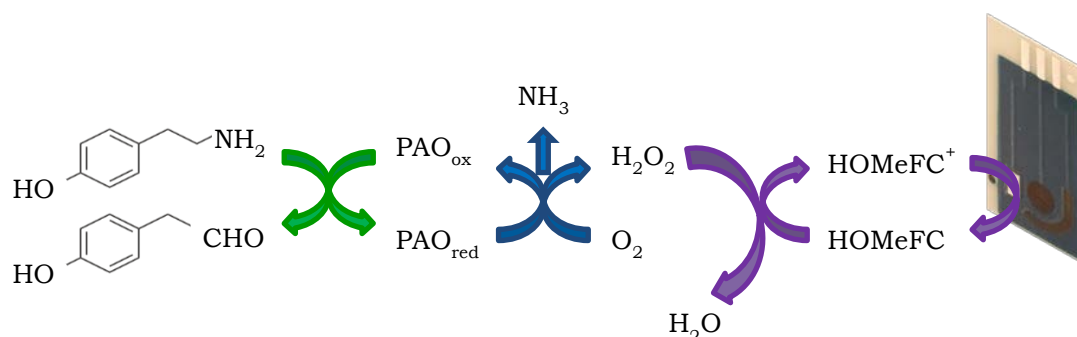
3.2.3.5. Real sample preparation

Brie cheese was obtained from a local market. A previous extraction process of Tyr was carried out according to the procedure described by Yigit et al. [7]. Thus, 3 g of the cheese sample were homogenized with 10 mL of 5% HClO₄ solution and mixed using a vortex mixer for 2 min. Next, the mixture was centrifuged for 10 min at 9000 rpm. The supernatant was then recovered and neutralized by addition of a 3% ammonia solution (saturated with NaCl). Subsequently, a new extraction process was performed using 25 mL of ethyl acetate-acetone (2:1) solvent on a vortex mixer for 2 min. Then, the mixture was centrifuged for 10 min at 9000 rpm, and the organic phase was separated and dried with anhydrous Na₂SO₄. The extract was evaporated to dryness. The solid obtained was finally dissolved in a known volume of Milli-Q water.

3.2.4. Results and discussion

3.2.4.1. Optimization and characterization of PAO/SPCEs biosensors

The PAO/SPCEs biosensor developed in this work produced an amperometric signal related to the mediator reduction (Fig. 3.2(a)), which can be associated to the concentration of added Tyr according to scheme 3.1.



Scheme 3.1.: Enzymatic mechanism of PAO/SPCEs biosensors.

The chronoamperometric determination of Tyr using the developed PAO/SPCEs biosensors involves the optimization of the experimental variables that can define the sensitivity and the selectivity of these systems. The most influence experimental factors are pH value of the buffer solution, E_{ap} and HOMeFc concentration. These factors were optimized by means of a 2^3 central composite design [23], taking as response the amperometric current obtained for a concentration of $19.2 \mu\text{M}$ of Tyr.

The experimental domain was defined by the values corresponding to the high (+) and low (-) levels, and to the central point (0) for each factor,

pH(+) = 8.0	$E_{ap}(+) = +300 \text{ mV}$	[HOMeFc] (+) = $30 \mu\text{M}$
pH(-) = 6.0	$E_{ap}(-) = +200 \text{ mV}$	[HOMeFc] (-) = $10 \mu\text{M}$
pH (0) = 7.0	$E_{ap} (0) = +250 \text{ mV}$	[HOMeFc] (0) = $20 \mu\text{M}$

Then 17 experiments derived from all the possible combinations of each factor were carried out and evaluated in terms of analysis of variance. The combination of factors levels that maximizes the response over the experimental region was (Figure 3.3.),

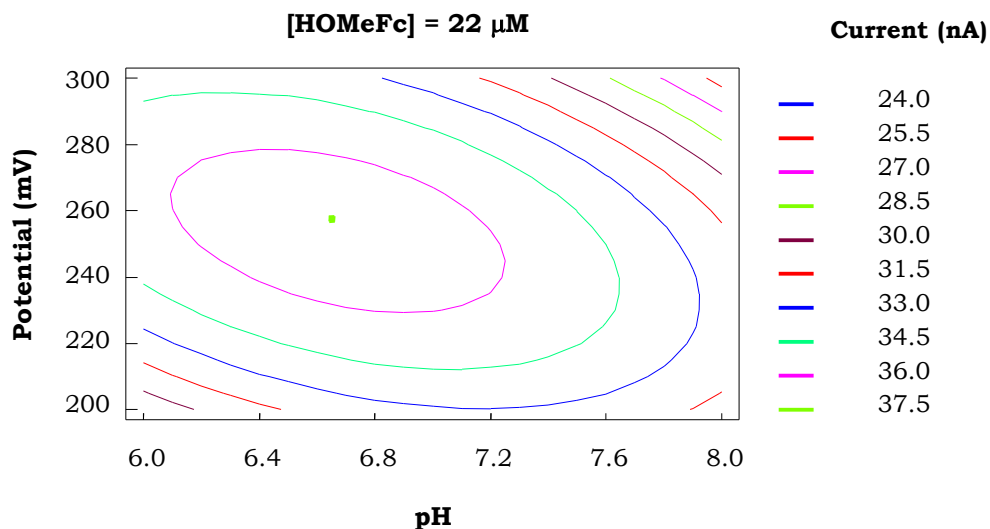


Figure 3.3.: Contours of estimated response surface for the 2^3 central composite design performed for the optimization of the experimental parameters in the determination of Tyr using PAO/SPCEs.

The optimized conditions were:

$$\text{pH, 6.65; } E_{\text{ap}}, +260 \text{ mV; [HOMeFc], 22 } \mu\text{M}$$

Control experiments were carried out under the optimum conditions using bare SPCEs, as well as SPCEs modified with GA and BSA but without enzyme according to the described procedure. No analytical signal was obtained in any case. Under the optimum conditions, the developed biosensor showed a linear range for Tyr concentration from 2 μM up to 164 μM (Fig. 3.2(b)). Several calibration curves were carried out in this linear range in order to check the biosensor performance. Then, precision, in terms of reproducibility and repeatability, and capability of detection were calculated.

The existence of anomalous points would lead to incorrect adjustments, altering the precision and the capability of detection of the developed method. Thus, robust regressions were then performed using the Progress program [24] which allows the detection of anomalous points and make it possible to identify a linear range with the remaining data. The results obtained for the different calibration sets are shown in Table 3.2. The variability of the slopes of the calibration curves recorded using different electrode surfaces in the same operational conditions (Table 3.2.) achieved a relative standard deviation (RSD) value of to 8.6% ($n = 5$, $\alpha = 0.05$). These results indicate a very good reproducibility in the biosensors development. Similarly, repeatability was determined by performing successive calibration curves, in the same operational conditions, using the same PAO/SPCE based biosensor. The value of repeatability obtained, 8.7% ($n = 3$, $\alpha = 0.05$), allows to conclude that the biosensor constructed presents a high precision in the analysis of Tyr.

The PAO/SPCE biosensor developed for Tyr determination has also been characterized by the calculation of its capability of detection for a

given probability of false positive (α) and negative (β) according to [25, 26] . The average capability of detection obtained for these probability levels was $2.0 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ($n = 3$).

Table 3.2.: Parameters of the regressions performed without anomalous points obtained in the determination of Tyr using PAO/SPCEs based biosensors, under the optimized conditions.

	Intercept (nA)	Sensitivity (nA μM^{-1})	S_{yx}	Coefficient of determination (R^2)
CALIBRATIONS PERFORMED WITH DIFFERENT PAO/SPCES				
CALIBRATION I	-33.65	2.22	0.97	0.99
CALIBRATION II	-7.74	2.37	3.83	0.99
CALIBRATION III	-8.61	2.44	4.50	0.99
CALIBRATION IV	2.24	2.01	0.99	0.99
CALIBRATION V	-21.14	2.51	4.26	0.99
CALIBRATIONS PERFORMED WITH THE SAME PAO/SPCE				
CALIBRATION I	-21.14	2.51	4.26	0.99
CALIBRATION II	-7.07	2.48	2.54	0.99
CALIBRATION III	-8.38	2.14	0.99	0.99

3.3.4.2. Selectivity analysis of PAO/SPCEs biosensors

Due to the similarity of the redox groups in BAs, their amperometric response using PAO/SPCEs based biosensors was evaluated. Thus, the response of Put, Cad, His, Tryp, Spm and Spd was analysed using the developed biosensor. In this way, several calibration curves were carried out in the concentration range from 2 up to 160 μM for each BA, under the optimized conditions for Tyr. The highest sensitivity was obtained for Cad.

The obtained sensitivities were then normalized to 100 for Cad. Thus, 100%, 87% and 84% values were achieved for Cad, Put and Tyr, respectively. The normalized sensitivity values obtained for the rest of the BAs analyzed were: His (74%), Spm (55%), Spd (36%) and Tryp (31%).

3.2.4.3. Analytical application

The PAO/SPCEs based biosensors developed were applied to the determination of Tyr in brie cheese samples. The extraction of this BA was attempted according to the procedure described in Section 3.2.3.5, which minimized sample pre-treatment.

The total amine content of the sample was analyzed using chronoamperograms recorded under the above-described optimum conditions and the standard addition method. A volume of 100 μL of the extracted BA was placed into the electrochemical cell, containing 5 mL of a 22 μM HOMeFc solution in buffer pH 6.6, and following by successive additions of 100 μL of a 1 mM Tyr solution. Current vs concentration regression parameters were optimally evaluated as it has been mentioned above, using the Progress program [24].

The concentration of Tyr found was $[273 \pm 2]$ mg kg^{-1} ($n = 6$, $\alpha = 0.05$), with a RSD value of 4.0%. To test the viability of this procedure in the determination of Tyr in cheese samples, recovery studies were also performed.

The total amount of Tyr in a spiked sample, 550 mg kg^{-1} , was determined by standard addition in triplicate. The concentration of Tyr found was $[555 \pm 18]$ mg kg^{-1} ($n=3$, $\alpha= 0.05$, RSD = 1.3%), On the basis of these data the method can be considered suitable to the determination of Tyr in this kind of samples.

3.2.5. Conclusions

This study reports a simple and rapid disposable enzymatic biosensor for BAs determination using SPCEs modified with PAO enzyme. This enzyme is immobilized on the working electrode surface by cross-linking technique, using BSA and GA as binding agents. The application of a potential of +260 mV has been found out as the optimum value of this experimental variable. This fact represents an important advantage from the previously described methods based on different electrochemical biosensors, which used potentials higher than +600 mV. Moreover, the described enzyme immobilization procedure together with the used mediator resulted also simpler than other previously described process being comparable in sensitivity. In addition, the minimal sample pre-treatment and the simple instrumentation needed make this approach a viable alternative as an analytical method to in situ determination of BAs content in complex matrices, such as commercial cheese samples.

3.2.6. Acknowledgements

Authors would like to acknowledge funding via Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN) (TEC2009-12029, CENIT-E 2009-INFINITEX and INNPACTO SERIBIO 20011). A. Calvo-Pérez is funded by the Junta de Castilla y León and the European Social Found.

3.2.7. References

- [1] E. Standarova, I. Borkovcova, M. Duskova, L. Vorlova, *Journal of Food and Nutrition Research*, 48 (2009) 189-194.
- [2] T. Tang, T. Shi, K. Qian, P. Li, J. Li, Y. Cao, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877 (2009) 507-512.

- [3] H.S. Marks, C.R. Anderson, *Journal of Chromatography A*, 1094 (2005) 60-69.
- [4] S. Bomke, B. Seiwert, L. Dudek, S. Effkemann, U. Karst, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393 (2009) 247-256.
- [5] D. Restuccia, U.G. Spizzirri, F. Puoci, G. Cirillo, M. Curcio, O.I. Parisi, F. Iemma, N. Picci, *Talanta*, 85 (2011) 363-369.
- [6] D. Compagnone, G. Isoldi, D. Moscone, G. Palleschi, *Analytical Letters*, 34 (2001) 841-854.
- [7] M. Yigit, L. Ersoy, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31 (2003) 1223-1228.
- [8] M.S. Steiner, R.J. Meier, C. Spangler, A. Duerkop, O.S. Wolfbeis, *Microchimica Acta*, 167 (2009) 259-266.
- [9] W. Li, J. Ge, Y. Pan, Q. Chu, J. Ye, *Microchimica Acta*, 177 (2012) 75-80.
- [10] S. Hernandez-Cassou, J. Saurina, *Journal of Chromatography B- Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879 (2011) 1270-1281.
- [11] R. Gatti, C. Lotti, R. Morigi, A. Andreani, *Journal of Chromatography A*, 1220 (2012) 92-100.
- [12] A. Peña-Gallego, P. Hernandez-Orte, J. Cacho, V. Ferreira, *Food Reviews International*, 28 (2012) 71-96.
- [13] L. Elisa, F. Baldini, A. Giannetti, C. Trono, T. Carofiglio, *Chemical Communications*, 46 (2010) 3678-3680.
- [14] H.A. Azab, S.A. El-Korashy, Z.M. Anwar, G.M. Khairy, M.S. Steiner, A. Duerkop, *Analyst*, 136 (2011) 4492-4499.

- [15] C.F. Chow, H.K. Kong, S.W. Leung, B.K. Chiu, C.K. Koo, E.N. Lei, M.H. Lam, W.T. Wong, W.Y. Wong, *Analytical Chemistry*, 83 (2011) 289-296.
- [16] B. Lee, R. Scopelliti, K. Severin, *Chemical Communications*, 47 (2011) 9639-9641.
- [17] K. Kivirand, T. Rincken, *Analytical Letters*, 44 (2011) 2821-2833.
- [18] J. Lange, C. Wittmann, *Anal Bioanal Chem*, 372 (2002) 276-283.
- [19] M. Niculescu, C. Nistor, I. Frébott, P. Peč, B. Mattiasson, E. Csöregi, *Analytical Chemistry*, 72 (2000) 1591-1597.
- [20] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, P. Matos, M.J. Arcos-Martínez, *Analytica Chimica Acta*, 665 (2010) 26-31.
- [21] S. Piermarini, G. Volpe, R. Federico, D. Moscone, G. Palleschi, *Analytical Letters*, 43 (2010) 1310-1316.
- [22] F.N. Crespilho, M. Emilia Ghica, M. Florescu, F.C. Nart, O.N. Oliveira Jr, C.M.A. Brett, *Electrochemistry Communications*, 8 (2006) 1665-1670.
- [23] E. Morgan, *Chemometrics: Experimental Design*, Wiley, New York, 1991.
- [24] P.J. Rousseeuw, *Robust Regression and Outlier Detection*, John Wiley and sons, New York, 1989.
- [25] ISO11843, *Capability of detection, Part I, 1997 and Part II (2000)*, Genève, Switzerland.
- [26] J. Inczédy, T. Lengyel, A.M. Ure, A. Gelencsér, A. Hulanicki, *Compendium of analytical nomenclature*, Port city press Inc, Baltimore, 2000.

**4. BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO BASADO EN EL
ENZIMA HRP PARA LA DETERMINACIÓN DE TIRAMINA**

4.1. Introducción

En el capítulo anterior, se ha demostrado que es posible llevar a cabo la determinación de Tyr mediante técnicas electroquímicas, teniendo en cuenta las propiedades redox que presenta la molécula. En este sentido los biosensores desarrollados basados en la utilización de SPCEs modificados con PAO han dado lugar a buenos resultados en la determinación analítica de esta sustancia. El inconveniente encontrado en el método desarrollado para la determinación de Tyr es la baja selectividad del mismo con respecto a otras BAs presentes en la misma muestra. Esto es debido a la utilización como elemento biológico de un enzima poco selectivo, como la PAO, para el que la práctica totalidad de las BAs actúan como sustrato. Por este motivo, en este capítulo, se ha seleccionado otro tipo de enzima para la construcción de un biosensor amperométrico que permita una determinación más selectiva de Tyr. El enzima escogido ha sido HRP, un

enzima específico para compuestos que contienen grupos hidroxilo. Esta característica confiere selectividad hacia la Tyr, ya que la Tyr es la única BA que contiene dichos grupos en su estructura.

La incorporación del enzima HRP al electrodo serigrafiado se realiza empleando dos métodos de inmovilización diferentes: inmovilización mediante entrecruzamiento, e inmovilización mediante serigrafiado de la misma durante el propio proceso de fabricación del dispositivo electródico. En el primer caso, la inmovilización del enzima en el dispositivo desechable se realiza mediante entrecruzamiento utilizando GA y BSA como agentes de entrecruzamiento (HRP/SPCEs). En este caso, también es necesario llevar a cabo una etapa de optimización de la concentración de reactivos de entrecruzamiento empleada, así como de las unidades enzimáticas inmovilizadas con el objetivo de desarrollar el biosensor de mayor capacidad analítica. En el caso del biosensor generado mediante el serigrafiado del enzima HRP (SPC_{HRP}Es), también es llevada a cabo una etapa previa de optimización de la cantidad de enzima impresa para lograr respuestas electroquímicas sensibles.

Para ambos tipos de electrodos, la determinación de Tyr se ha realizado mediante cronoamperometría, siendo por tanto los factores experimentales a optimizar: E_{ap} , y el pH de la disolución de medida. El enzima HRP requiere la presencia en el medio de peróxido de hidrógeno, para activarse. Por tanto, la concentración de H_2O_2 es otro de los factores experimentales a optimizar. La optimización se efectúa empleando la metodología del diseño de experimentos.

Una vez construidos los biosensores, se caracterizan mediante la determinación de los valores de reproducibilidad y repetibilidad de los mismos, así como, de su capacidad de detección.

Con el objetivo de estimar el grado de selectividad hacia la determinación de Tyr de los biosensores desarrollados se analiza la posible

interferencia que pudiera causar la presencia de otras BAs como: His, Put, Cad, Tryp, Spm y Spd.

Comparando los resultados obtenidos con los diferentes biosensores desechables desarrollados, se concluye que la determinación de Tyr utilizando el biosensor basado en $\text{SPC}_{\text{HRP}}\text{Es}$, aporta como gran ventaja un menor tiempo de fabricación del dispositivo, generando valores similares de reproducibilidad, repetibilidad, y sensibilidad en comparación con el biosensor basado en HRP/SPCEs.

Debido a la simplicidad en la fabricación del biosensor $\text{SPC}_{\text{HRP}}\text{E}$ en comparación con el biosensor HRP/SPCE, se elige como el dispositivo más adecuado para llevar a cabo la determinación de Tyr en una muestra real. Así, una muestra de queso brie comercial, con un alto contenido en Tyr respecto al resto de BAs, es analizada empleando $\text{SPC}_{\text{HRP}}\text{Es}$. Al igual que en el capítulo anterior se escogió este tipo de muestra debido a su alto contenido en Tyr respecto al resto de BAs. Para llevar a cabo la determinación de Tyr es necesaria una extracción previa del analito. La viabilidad del biosensor construido en la determinación de Tyr en muestras complejas se comprueba mediante el análisis de una muestra de queso brie enriquecida con una cantidad conocida de Tyr, obteniéndose resultados satisfactorios.

Este trabajo ha dado lugar a una publicación científica en la revista *Electroanalysis*: “*Disposable Horseradish peroxidase biosensors for the selective determination of tyramine*” (*Electroanalysis* 25 (2013) 1316-1322). Igualmente, parte de este trabajo ha sido presentado en forma de comunicación oral en la XXXVI Reunión del Grupo de Electroquímica de la Real Sociedad Española de Química, celebrada en Valencia del 15 al 17 de Julio de 2013.

4.2. Disposable Horseradish Peroxidase Biosensors for the Selective Determination of Tyramine

4.2.1. Abstract

This work reports the development of HRP based biosensors using SPCEs for the determination of Tyr. A novel procedure based on the insertion of the enzyme in the screen-printed process (SPC_{HRP}Es) has been compared to the cross-linked immobilization into the carbon working electrode (HRP/SPCEs). Both biosensors were characterized obtaining good capability of detection ($2.1 \pm 0.2 \mu\text{M}$ and $200 \pm 10 \text{ nM}$ for SPC_{HRP}Es and HRP/SPCEs, respectively). The reproducibility was 3.4% and 6.8% for SPC_{HRP}Es and HRP/SPCEs, respectively. The repeatability was 2.2% and

7.1% for $\text{SPC}_{\text{HRP}}\text{Es}$ and HRP/SPCEs, respectively. The specificity towards different BAs was analyzed. The developed biosensors were applied to the determination of the Tyr content in cheese samples.

4.2.2. Introduction

As it has been previously described, there is an increasing interest in the control of the state of preservation of different kinds of food. In this way, BAs content can be considered as an indicator of freshness and quality of a wide variety of food products [1-11]. Like this, one of the most important BAs implied in contamination processes in spoiled food is Tyr.

As it has been described in the previous chapter, SPEs have been successfully used in the construction of amperometric biosensors for the determination of BAs, including Tyr [12-17]. This interesting approach for BAs determination has been developed owing to the selectivity of AOs, including PAO for its natural substrate. Their main drawback of AOs based amperometric biosensors is the low specificity obtained to a particular BA, which led to develop biosensors to estimate the total content of BAs in a sample (Table 4.1.). A possible solution to this analytical problem has been the development of bienzymatic amperometric biosensors combining AOs with HRP [15]. The use of HRP allows working at a lower potential, which results in an increase in the selectivity of the biosensor. However, this kind of biosensors still failed in the selectivity analysis of a single BA in the presence of others.

HRP has been often used in the development of biosensors for the electrochemical determination of different kind of analytes [15, 18-24]. However, HRP has been never used as a selective enzyme in the determination of Tyr. The molecular structure of Tyr includes an OH group, which is susceptible of being oxidized by HRP in presence of hydrogen peroxide. Thus, a HRP based biosensor can be selective for the analysis of

Tyr in presence of BAs, such as Put, Cad, His, Tryp, Spm or Spdm. Therefore, in one hand, a disposable biosensor based on the use of SPCEs, in which HRP enzyme was immobilized by cross-linking (HRP/SPCEs), has been developed in this work. On the other hand, the special physical properties of HRP allow the possibility of screen-printing the enzyme directly into a disposable electrode [25, 26]. The development of SPEs by this simple process represents an easier and minor cost procedure in the fabrication of proper disposable biosensors for the determination of a target analyte.

This manufacture process highly increases the durability and robustness of the developed biosensors, being even less time consuming. Thus, it avoids contamination and manipulation processes, which can lead to false analytical results. Consequently, a novel disposable biosensor based on the use of SPCEs, in which the HRP enzyme was screen-printed, has been also developed (SPC_{HRP}Es).

4.2.3. Experimental

4.2.3.1. Reagents

Milli Q (Millipore, Bedford, USA) water was employed for preparing all solutions. Electrochemical measurements were carried out using a 50 mM phosphate buffer (KH₂PO₄, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and 100 mM KCl solution (Merck, Darmstadt, Germany) as supporting electrolyte. From this, solutions of different pH values were prepared by addition of a 1 M sodium hydroxide solution (J.T. Baker, Deventer, The Netherlands).

All the reagents used were of analytical grade, without further purification. Stock standard solutions of Tyr were prepared by dissolving the adequate amount of Tyr 97% (Acros organics, Geel, Belgium) in buffer solution. Cad, Put and His (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), as well as

Table 4.1.: Enzymatic biosensors based on disposable SPEs for the determination of BAs.

Ref	BA	Enzymes	Electrode	Immobilization procedure	Technique	Concentration range	Capability of detection
[22]	His, Tyr, Put	PAO TAO DAO	SPE	Cross-linking GA and BSA	Amp. $E_{ap}=700\text{mV}$	10-200 mg kg ⁻¹ (His) 10-200 mg kg ⁻¹ (Tyr) 5-100 mg kg ⁻¹ (Put)	10 mg kg ⁻¹ (His) 5 mg kg ⁻¹ (Tyr) 5 mg kg ⁻¹ (Put)
[23]	Put, Cad, Spd	PUO	SPPtE	Cross-linking GA and BSA	Amp. $E_{ap}=600\text{mV}$	0.06-200 μM (Put) 0.1-14 μM (Cad) 0.1-20 μM (Spd)	
	His, Tyr	MAO				0.17-20 μM (His) 0.1-6 μM (Tyr)	
[24]	Overall Bas content	DAO	SPAuE	Entrapment in a Polyazetidine prepolymer membrane	Amp. $E_{ap}=600\text{mV}$	0.7-20mg L ⁻¹ (Put)	0.2 mg L ⁻¹ (Put)
[25]	Overall Bas content	MAO/HRP DAO/HRP	SPCE	Covalent link (diazonium salt)	Amp. $E_{ap}=250\text{mV}$	0.4-2.4 mM (His) 0.2-1.6 mM (His)	0.40 \pm 0.04 mM 0.18 \pm 0.01 mM
[26]	Put, Cad, Spm, Spd, His	DAO	Prussian blue-SPE	Cross-linking GA and BSA	Amp. $E_{ap}= -50\text{mV}$	20-300 mM	10 mM
[17]	Put	PUO	SPPtE	Cross-linking	Amp. $E_{ap}=600\text{mV}$		50 nM
Cap.3	Overall Bas content	PAO	SPCE	Cross-linking	Amp. $E_{ap}=260\text{mV}$	2-164 μM (Tyr)	2.0 \pm 0.18 μM (Tyr)

Spm and Spd solutions (Acros Organics, Geel, Belgium) were prepared by dissolving the products in supporting electrolyte solution. Tryp solutions were prepared by dissolving the adequate amount of Tryp 98% (Acros Organics, Geel, Belgium) in 10% ethanol (Merck, Darmstadt, Germany).

H₂O₂ 30%, HRP (173 units/mg), BSA and GA were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). BSA and HRP were both dissolved in 50 mM phosphate pH 6 buffer solution.

HClO₄ (Panreac, Barcelona, Spain), NH₃ (Merck, Darmstadt, Germany), ethyl acetate (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), acetone (Merck, Darmstadt, Germany) and anhydrous sodium sulphate (Merck, Darmstadt, Germany) were used for the Tyr extraction process from a commercial cheese sample.

SPEs were fabricated using different commercial inks. C10903P14 (carbon ink) and D2071120D1 (dielectric ink) were purchased from Gwent Electronic Materials (Torfaen, U.K). Electrodag 6037 SS (Ag/AgCl ink) and Electrodag 418 (Ag ink) were supplied by Acheson Colloiden (Scheemda, The Netherlands).

4.2.3.2. Apparatus

SPEs were produced on a DEK 248 printing machine (DEK, Weymouth, UK) using polyester screens with appropriate stencil designs.

Electrochemical measurements were made using a PalmSens Interface with PalmSensPC software (Palm Instruments BV, Houten, The Netherlands). The pH of solutions was measured with a Hanna instruments

HI 221 pH meter (USA). Centrifugation of the samples was carried out in a J P Selecta Angular 6 centrifuge (The Netherlands).

4.2.3.3. Biosensors manufacturing

In the case of HRP/SPCEs biosensors, a three-electrode configuration was used, consisting of a carbon working electrode (15.9 mm²), a Ag/AgCl reference electrode and a carbon auxiliary electrode (Figure 4.1.). The cross-linking immobilization of the HRP enzyme was carried out by dropping on the surface of the working electrode 5 μ L of a mixture containing GA (2.5% v/v):BSA (3% w/v):HRP (6% w/v) in the volume ratio 3:1:6. Then, it was left to react for 90 minutes at 4 °C.

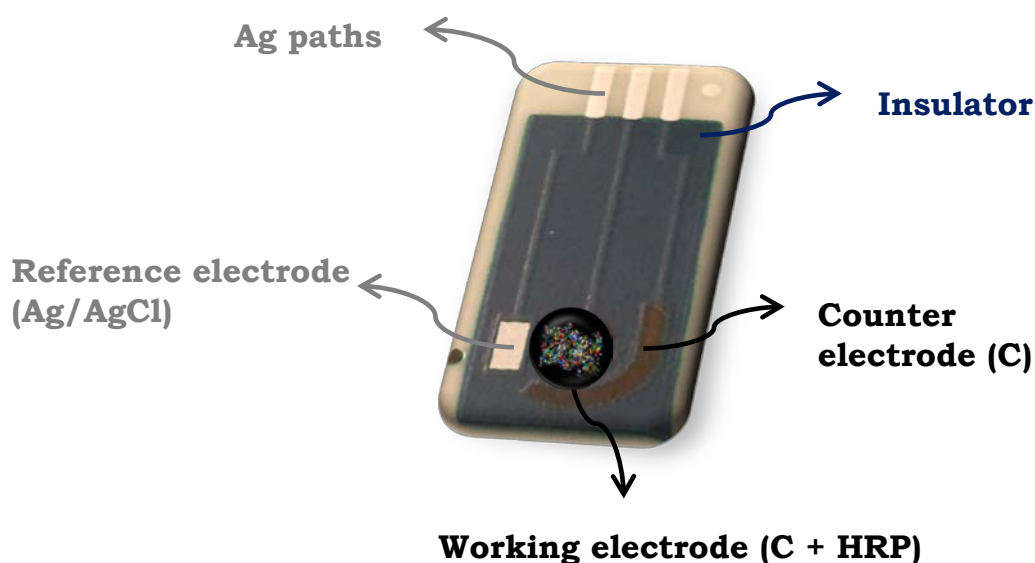


Figure 4.1.: Scheme of a SPCE used for the construction of HRP based biosensors.

In the case of SPC_{HRP}Es, the same three-electrode configuration was employed but using a carbon working electrode based on HRP containing ink. This ink was prepared by thoroughly mixing the carbon ink with HRP.

The mixture was sonicated for 20 min and directly screen-printed onto the working electrodes. The resulting biosensors were cured at 40 °C for 1 h (Figure 4.2.). The biosensors were kept at 4 °C when not in use.

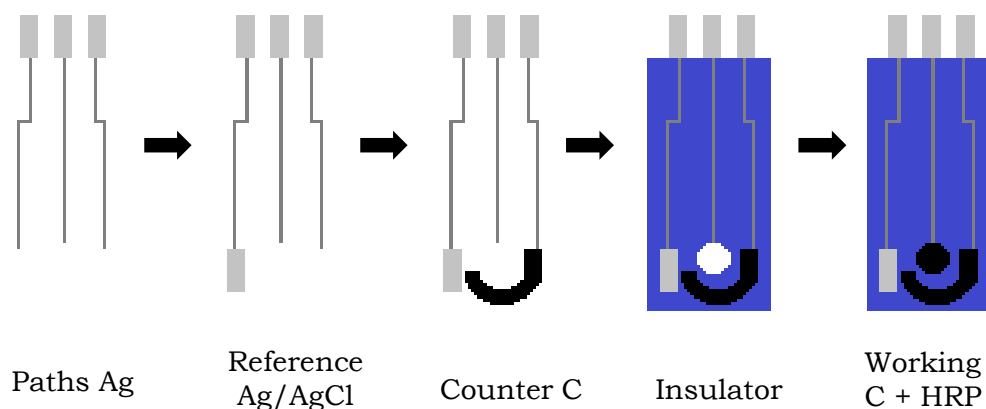


Figure 4.2.: Schematic diagram of the $SPC_{HRP/Es}$ biosensors preparation procedure.

4.2.3.4. Measuring procedure of the HRP/SPCEs biosensors

All measurements were made at room temperature. The developed biosensors were placed in an electrochemical cell containing 5 mL of supporting electrolyte at pH 9. The working electrode operated at 0 mV vs screen-printed Ag/AgCl reference electrode, except for the experimental variables optimization process.

Once the baseline was established, a defined amount of H_2O_2 stock solution was added to the measuring cell and a large reduction signal was observed. Then, when a steady-state response was observed, fixed portions of the Tyr stock solution were consequently added reaching a plateau each time (Figure 4.3.).

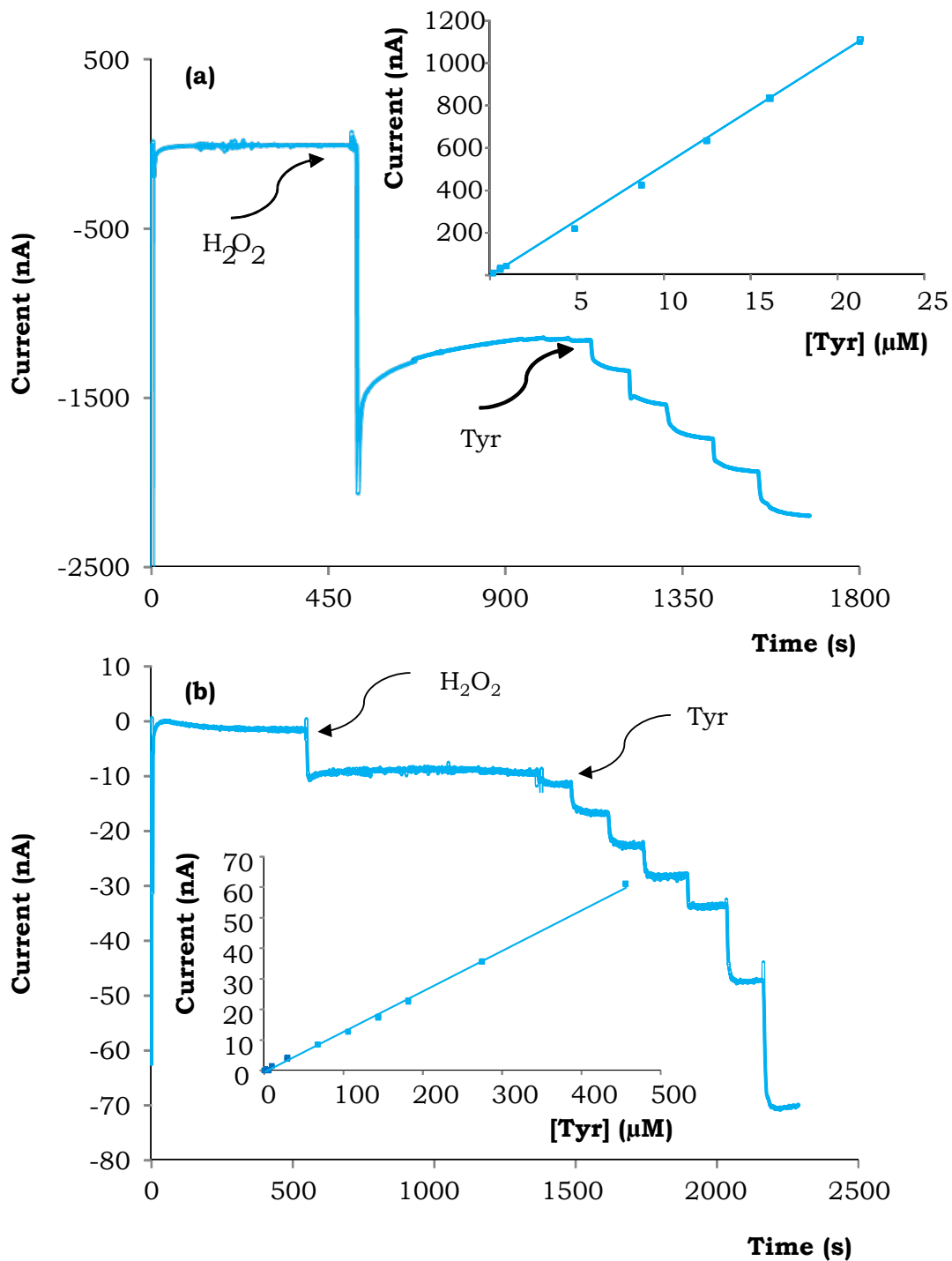


Figure 4.3. Chronoamperograms and calibration plots (insets) recorded on (a) HRP/SPCEs for successive additions of a Tyr solution in a range from 0.2 to 21.4 μM and (b) $SPC_{HRP/Es}$ for successive additions of a Tyr solution in a range from 2 to 456 μM . Operational conditions: pH 9; $[H_2O_2]$, 0.5 mM; E_{ap} , 0 mV vs Ag/AgCl SPE.

4.2.3.5. Real sample preparation

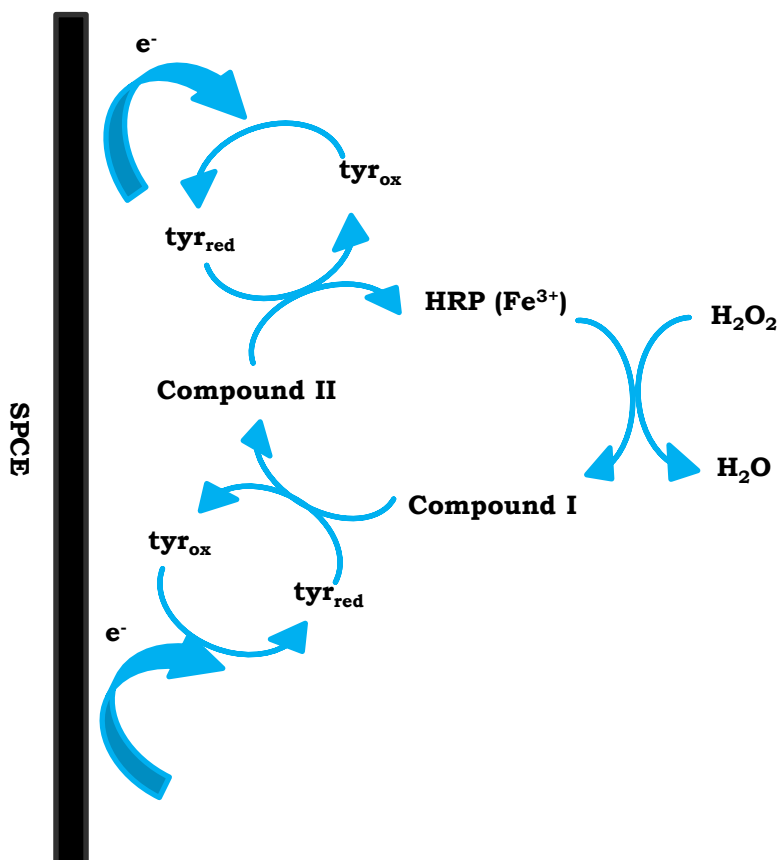
Brie cheese was obtained from a local market. A previous extraction process of Tyr was carried out according to the procedure described by Yigit and Ersoy [27]. Thus, 6 g of cheese sample were homogenized with 30 mL of 5% HClO₄ solution, mixed with a vortex mixer for 2 min and centrifuged for 10 min at 9000 rpm. The supernatant was then recovered and neutralized with 3% ammonia solution (saturated with NaCl). Subsequently an extraction process was performed using 60 mL of ethyl acetate-acetone (2:1) solvent on a vortex mixer for 2 min. Then, the mixture was briefly centrifuged for 10 min at 9000 rpm, and the organic phase was separated and dried with anhydrous Na₂SO₄. The extract was evaporated to dryness. The solid obtained was finally dissolved in a known volume of buffer.

4.2.4. Results and discussion

The different biosensors constructed using the above-described models produce an amperometric signal that is sensitive to the concentration of Tyr, as it is shown in Figure 4.3.

The response of the developed HRP biosensors to Tyr is based on the so-called double displacement or “ping-pong” mechanism in which two substrates, a peroxide (H₂O₂ in this case) and Tyr are involved. This mechanism has been previously described for other phenolic compounds [28, 29] and it is shown in Scheme 4.1.

Briefly, it consists of the oxidation of HRP by H₂O₂ followed with its reduction by Tyr. Tyr is converted to a quinone or free radical which is electroactive and can be electrochemically reduced on the SPCE surface [29]. The reduction current obtained is proportional to the concentration of Tyr allowing its quantitative determination.



Scheme 4.1.: Scheme of the reaction occurring at the surface of the HRP/SPCEs and SPC_{HRPES} biosensors in the determination of Tyr.

4.2.4.1. Optimization of the biosensor working conditions

The amperometric response obtained for the different biosensors depends on several experimental parameters, which should be optimized in order to ensure the quality of the results.

Two different optimization procedures were necessary. In a first step, the influential variables in the cross-linking immobilization and screen-printing process were optimized. Secondly, an optimization stage of the influence experimental variables in the amperometric response was also performed.

The main influential factors in the cross-linking immobilization process of HRP enzyme onto the SPCEs are HRP, GA and BSA amounts. To carry out the optimization of these variables, a volume of HRP enzyme was kept fixed, varying GA and BSA volume. The highest electroanalytical response was obtained for 35 units of HRP, and a volume ratio (V_{GA}/V_{BSA}) value of 3.

In the case of $SPC_{HRP}Es$, the amount of HRP screen-printed was also optimized. Biosensors containing 0.5%, 1% and 2% of HRP were studied. A higher level of sensitivity for the biosensors constructed using 1% of HRP was obtained. In fact, no results were obtained for a 0.5% content and a decrease in the electroactive area of the electrode was found by chronocoulometry when more than 1% of HRP was screen-printed. This decrease in the electroactive area results in a decrease in sensitivity of ten times.

Then, the optimization of the influential experimental variables in the chronoamperometric determination of Tyr was performed. pH of the buffer solution, E_{ap} and H_2O_2 concentration were optimized by means of a 2^3 central composite design, taken as response the current corresponding to a 20 mM Tyr solution. In this step, the experimental domain was defined by the following values:

pH (-)	=	7	E_{ap} (-)	=	0 mV	$[H_2O_2]$ (-)	=	0.5 mM
pH (+)	=	9	E_{ap} (+)	=	300 mV	$[H_2O_2]$ (+)	=	1.5 mM
pH (0)	=	8	E_{ap} (0)	=	150 mV	$[H_2O_2]$ (0)	=	1.0 mM

The optimum values obtained for the experimental variables by means of this methodology were (Figure 4.4.):

$$\text{pH, 9; } E_{ap}, 0 \text{ mV; } [H_2O_2], 0.5 \text{ mM}$$

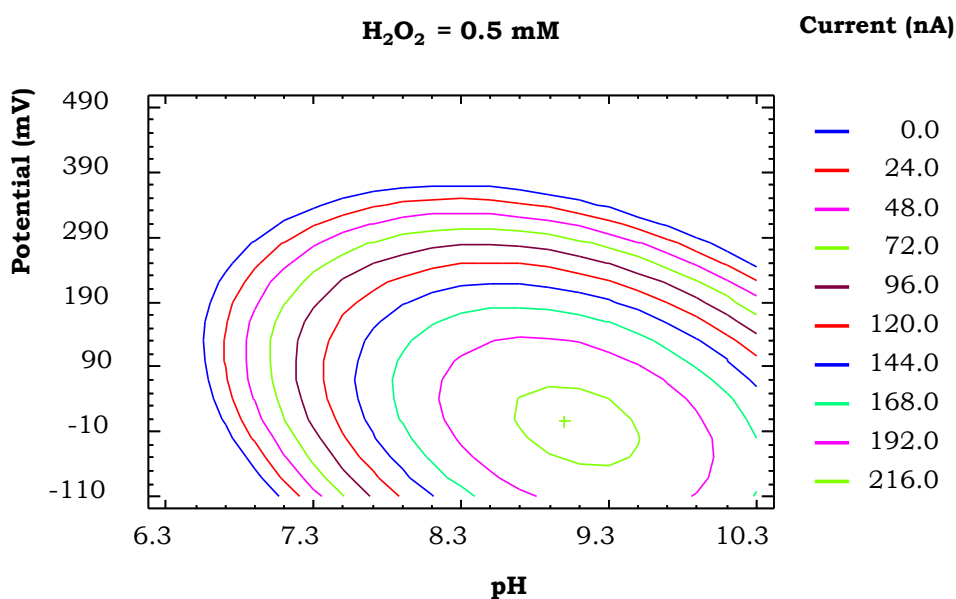


Figure 4.4.: *Contours of estimated response surface for the 2^3 central composite design performed for the optimization of the experimental parameters in the determination of Tyr using HRP/SPCEs.*

The same optimum experimental variables (pH, E_{ap} and $[\text{H}_2\text{O}_2]$) were obtained for $\text{SPC}_{\text{HRP}}\text{Es}$ biosensors, using the same methodology.

4.2.4.2. Biosensors characterization

Once the optimum parameters for the analysis of Tyr were chosen, the linear range for each biosensor was determined. The relation between oxidation current and Tyr concentration showed a linear behavior from 2 up to 456 μM , for the $\text{SPC}_{\text{HRP}}\text{Es}$, and 0.2 up to 21.4 μM , in the case of HRP/SPCEs. The calibration equations obtained were $I = 0.13 \cdot C - 0.58$ and $I = 52.1 \cdot C - 14.4$ for $\text{SPC}_{\text{HRP}}\text{Es}$ and HRP/SPCEs, respectively.

Precision, in terms of reproducibility and repeatability, and capability of detection were also estimated. Current vs concentration regression parameters were optimally evaluated. In order to detect the anomalous points that would alter intercept and slope values, the progress program

was implemented [30]. These points were eliminated from the calibration set and an ordinary least squares (OLS) regression was carried out with the remaining data. Then, reproducibility of the biosensors was calculated in terms of RSD of the slopes of the calibration curves recorded using different biosensors in the same operational conditions. The reproducibility values were 3.4% and 6.8% for $\text{SPC}_{\text{HRP}}\text{Es}$ and HRP/SPCEs, respectively. These results indicate a very good reproducibility in the case of the different constructed biosensors, being $\text{SPC}_{\text{HRP}}\text{Es}$ more reproducible than HRP/SPCEs.

Likewise, repeatability was estimated by recording successive calibration curves, in the same operational conditions, using the same electrode. Figure 4.5. shows the loss in sensitivity obtained for the different biosensors. It can be seen that the sensitivity of $\text{SPC}_{\text{HRP}}\text{Es}$ was kept at 96% level after the third calibration curve. In the case of HRP/SPCEs, the sensitivity was kept at 91% level after the third calibration curve. Thus, it can be summarized that the developed biosensors are precise and suitable for the determination of Tyr.

The values of repeatability were also estimated in terms of RSD (2.2% and 7.1% for $\text{SPC}_{\text{HRP}}\text{Es}$ and HRP/SPCEs, respectively). Therefore, the screen-printed of the enzyme process results more precise in terms of reproducibility and repeatability than the cross-linking immobilization method.

This analytical procedure for Tyr determination has been also characterized by the calculation of the capability of detection for a given probability of false positive (α) and negative (β). Validated linear regressions between the concentration and the analytical signal were used to calculate this parameter, according to ISO [31, 32]. The average capabilities of detection obtained were $2.1 \pm 0.2 \mu\text{M}$ and $200 \pm 10 \text{ nM}$ ($\alpha = 0.05$ and $\beta = 0.05$) in the case of $\text{SPC}_{\text{HRP}}\text{Es}$ and HRP/SPCEs biosensors, respectively. The higher sensitivity obtained for HRP/SPCEs biosensors can be explained

by the higher amount of HRP that can be immobilized by means of the cross-linking method. Although HRP/SPCEs biosensors resulted more sensitive, their reproducibility and repeatability gave slightly poorer results than $\text{SPC}_{\text{HRPEs}}$. Taking into account also the easier procedure of fabrication of these screen-printed biosensors, $\text{SPC}_{\text{HRPEs}}$ were selected for the next experiments related to the selectivity and complex samples analysis.

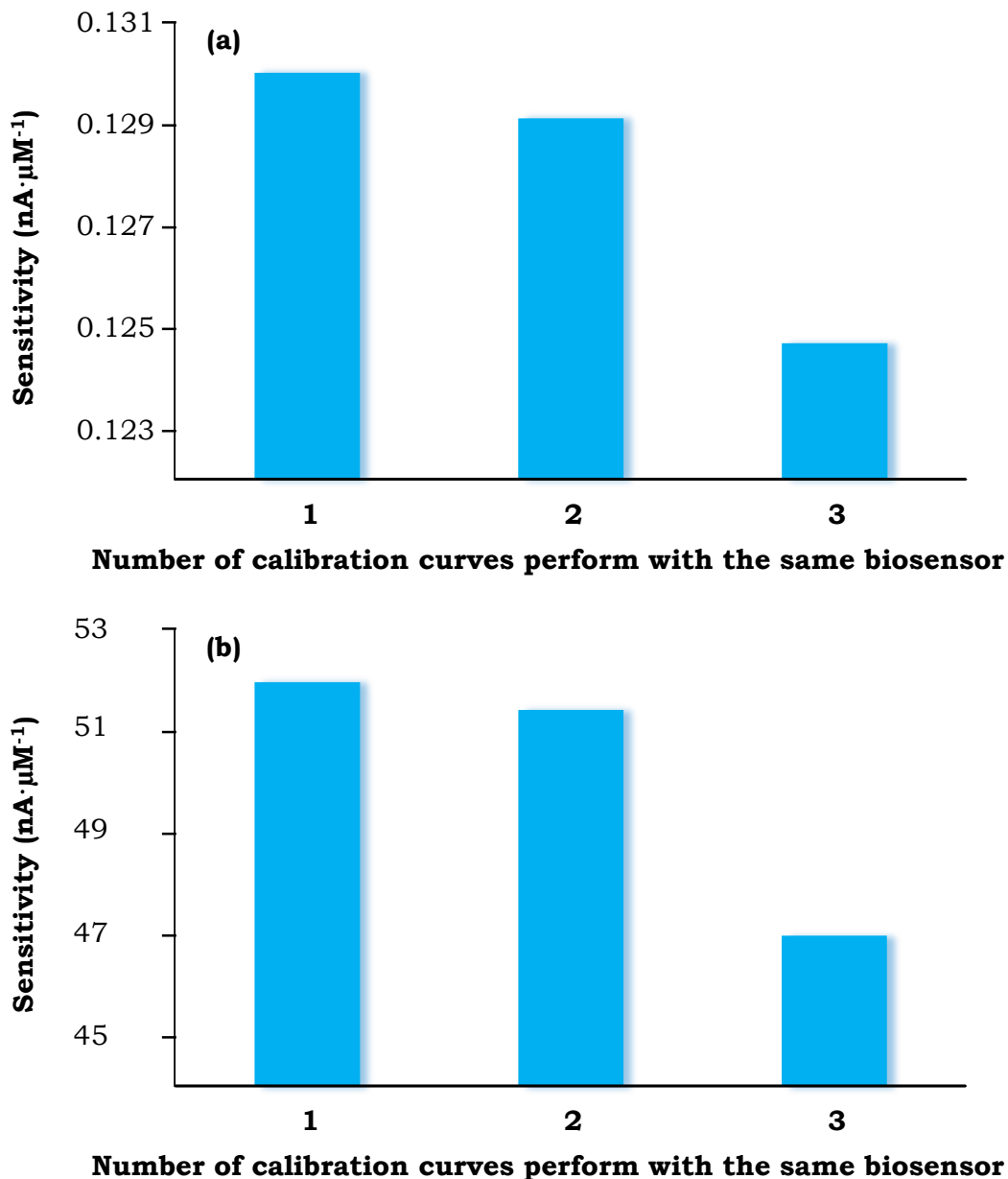


Figure 4.5.: Repeatability in terms of sensitivity for the different disposable biosensors developed: (a) SPC_{HRPE} and (b) HRP/SPCE.

4.2.4.3. Substrate specificity determination

The most important interferences in the determination of any BA are mainly the rest of BAs. In order to check the selectivity of the method in the determination of Tyr, different calibration curves were carried out in the same concentration range (from 0.2 to 456 mM) and under the same experimental conditions for other BAs (Put, Cad, His, Tryp, Spm and Spd) using both developed biosensors. From the analysis of the results, it can be said that no response was obtained for any BA in any case. Tyr was the only BA to give a proper and quantifiable analytical response. Thus, it can be affirmed that the analytical method developed in this work is completely selective for the determination of Tyr, obtaining an identical response in presence as well as in absence of the rest of the tested BAs.

4.2.4.4. Application in cheese samples

In order to check the performance of the developed SPC_{HRPE} biosensor for Tyr determination, a cheese sample was analyzed using the standard addition method. Chronoamperograms were recorded under the optimum conditions.

The extraction of Tyr was attempted according to the procedure described in Section 4.2.3.5. Then, Tyr content of the sample, expressed in mg of Tyr per kg of cheese, was analyzed. A volume of 100 μL of the cheese extracted was placed into the electrochemical cell, containing 5 mL of buffer solution pH 9 and H_2O_2 in a final concentration of 0.5 mM, following by successive additions of 100 μL of a 2.5 mM Tyr solution. Current vs concentration regression parameters were optimally evaluated. The concentration of Tyr found was $28.5 \pm 0.8 \text{ mg kg}^{-1}$ (n (number of different cheese extracts) = 3, $\alpha = 0.05$), with a RSD of 1.6%. This result is in good agreement with the values found in the literature for Tyr content in cheese samples [33, 34].

In order to check the viability of this procedure in the determination of Tyr in cheese samples, recovery studies were also performed with this sample. Cheese sample was spiked with an amount of 30 mg Tyr kg⁻¹ of cheese. Then, 100 µL of spiked cheese was placed into the electrochemical cell, containing 5 mL of buffer solution and 0.5 mM of H₂O₂, followed by successive additions of 100 µL of a 2.5 mM Tyr solution. Current vs concentration regression parameters were optimally evaluated.

The concentration of Tyr found was 58.8 ± 0.7 mg kg⁻¹ (n (number of aliquots) = 3, α = 0.05), with an average recovery of 99.2 ± 1.6% with a RSD of 0.7%). On the basis of these data the method can be considered appropriate to be applied to Tyr determination in these samples.

4.2.5. Conclusions

This work reports for the first time disposable enzymatic biosensors for Tyr selective determination, using the enzyme HRP. Two different HRP based biosensors were tested. In one hand, the direct screen-printing of modified ink with the enzyme represents an easy and low cost procedure in the development of suitable biosensors for the determination of Tyr, being also more precise than the cross-linking immobilization procedure. On the other hand, biosensor immobilized with the enzyme HRP by cross-linking presents a very low capability of detection of this BA.

Moreover, the application of a potential of 0 mV has been found out as the optimum value of this experimental value. This fact adds an important advantage from previously described methods, since the number of possible interferences may be potentially reduced. The fittingness of the chronoamperometric method for monitoring Tyr content in cheese samples has been demonstrated.

Simple instrumentation of the analytical system makes this approach a viable alternative as analytical method to determine the Tyr content in complex samples.

4.2.5. Acknowledgements

Authors would like to acknowledge funding via Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN) (TEC2009-12029, CENIT-E 2009-INFINITEX and INNPACTO SERIBIO 2011) and Junta de Castilla y León (BU212A12-2). A. Calvo-Pérez is funded by the Junta de Castilla y León and the European Social Found.

4.2.6. References

- [1] A. Naila, S. Flint, G. Fletcher, P. Bremer, G. Meerdink, *Journal of Food Science*, 75 (2010) R139-R150.
- [2] G. Favaro, P. Pastore, G. Sacconi, S. Cavalli, *Food Chemistry*, 105 (2007) 1652-1658.
- [3] L. Bunková, F. Bunka, G. Mantlová, A. Cablová, I. Sedláček, P. Svec, V. Pachlová, S. Krácmár, *Food Microbiology*, 27 (2010) 880-888.
- [4] A.L. Cinquina, A. Cali, F. Longo, L. De Santis, A. Severoni, F. Abballe, *Journal of Chromatography A*, 1032 (2004) 73-77.
- [5] F. Galgano, F. Favati, M. Bonadio, V. Lorusso, P. Romano, *Food Research International*, 42 (2009) 1147-1152.
- [6] F. Kvasnicka, M. Voldrich, *Journal of Chromatography A*, 1103 (2006) 145-149.

- [7] D.M. Linares, M.C. Martin, V. Ladero, M.A. Alvarez, M. Fernandez, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51 (2011) 691-703.
- [8] A. Önal, *Food Chemistry*, 103 (2007) 1475-1486.
- [9] P. Pastore, G. Favaro, D. Badocco, A. Tapparo, S. Cavalli, G. Saccani, *Journal of Chromatography A*, 1098 (2005) 111-115.
- [10] I. Al Bulushi, S. Poole, H.C. Deeth, G.A. Dykes, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49 (2009) 369-377.
- [11] P. Paulsen, F. Bauer, S. Vali, *Fleischwirtschaft*, 77 (1997) 450-452.
- [12] J. Lange, C. Wittmann, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372 (2002) 276-283.
- [13] G.C. Chemnitius, U. Bilitewski, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 32 (1996) 107-113.
- [14] M. Di Fusco, R. Federico, A. Boffi, A. MacOne, G. Favero, F. Mazzei, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401 (2011) 707-716.
- [15] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, P. Matos, M.J. Arcos-Martínez, *Analytica Chimica Acta*, 665 (2010) 26-31.
- [16] S. Piermarini, G. Volpe, R. Federico, D. Moscone, G. Palleschi, *Analytical Letters*, 43 (2010) 1310-1316.
- [17] L. Nagy, G. Nagy, R.E. Gyurcsányi, M.R. Neuman, E. Lindner, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 53 (2002) 165-175.
- [18] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, *Enzyme modified screen printed electrodes, Biosensors: Properties, Materials and Applications*, Nova Publishers, Hauppauge NY, 2009, pp. 1-52.

- [19] M.A. Alonso-Lomillo, J.M. Kauffmann, M.J. Arcos Martínez, *Biosensors and Bioelectronics*, 18 (2003) 1165-1171.
- [20] C. Petit, K. Murakami, A. Erdem, E. Kilinc, G.O. Borondo, J.F. Liegeois, J.M. Kauffmann, *Electroanalysis*, 10 (1998) 1241-1248.
- [21] S.S. Razola, B.L. Ruiz, N.M. Diez, H.B. Mark, J.M. Kauffmann, *Biosensors and Bioelectronics*, 17 (2002) 921-928.
- [22] D.H. Yu, B. Blankert, E. Bodoki, S. Bollo, J.C. Vire, R. Sandulescu, A. Nomura, J.M. Kauffmann, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 113 (2006) 749-754.
- [23] C. Saby, T.V. Nguyen, J.H.T. Luong, *Electroanalysis*, 16 (2004) 260-267.
- [24] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, L. Ferreira-Gonçalves, M.J. Arcos-Martínez, *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (2010) 1333-1337.
- [25] S. Ledru, N. Ruillé, M. Boujtita, *Biosensors and Bioelectronics*, 21 (2006) 1591-1598.
- [26] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, L. del Torno-de Román, M.J. Arcos-Martínez, *Analytica Chimica Acta*, 688 (2010) 49-53.
- [27] M. Yigit, L. Ersoy, *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 31 (2003) 1223-1238.
- [28] X. Liu, L. Luo, Y. Ding, Y. Xu, *Analyst*, 136 (2011) 696-701.
- [29] S. Yang, Z. Chen, X. Jin, X. Lin, *Electrochimica Acta*, 52 (2006) 200-205.
- [30] P.J. Rousseeuw, *Robust Regression and Outlier Detection*, John Wiley and sons, New York, 1989.

- [31] ISO 11843-2, Capability of Detection, Geneve, Switzerland, 2000.
- [32] J. Inczédy, T. Lengyel, A.M. Ure, A. Gelencsér, A. Hulanicki, Compendium of analytical nomenclature, Port city press Inc, Baltimore, 2000.
- [33] U.G. Spizzirri, D. Restuccia, M. Curcio, O.I. Parisi, F. Iemma, N. Picci, Journal of Food Composition and Analysis, 29 (2013) 43-51.
- [34] M. Schirone, R. Tofalo, G. Mazzone, A. Corsetti, G. Suzzi, Food Microbiology, 28 (2011) 128-136.

5. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE CR(III) Y
CR(VI) MEDIANTE DPV EMPLEANDO SPCES

5.1. Introducción

En este capítulo se describe a cabo el desarrollo de un método electroquímico para la determinación simultánea de Cr(III) y Cr(VI) en una misma muestra, utilizando SPCEs y DPV. Para lograr la determinación simultánea de cromo en ambos estados de oxidación, fue necesario primero el desarrollo de un procedimiento selectivo para cada una de las especies de cromo. En este sentido, para la determinación electroquímica de Cr(III), se lleva a cabo la modificación del electrodo de trabajo empleando diferentes procedimientos. Esta modificación del dispositivo desechable es necesaria puesto que no se obtiene respuesta electroanalítica para este analito empleando SPCEs. Los mejores resultados se obtienen para aquellos electrodos modificados con una película de mercurio (Hg/SPCEs). Una vez seleccionado el método de modificación del electrodo de trabajo más adecuado, se lleva a cabo una etapa de optimización de las condiciones experimentales siendo en este caso los factores a optimizar el medio

tamponado y su pH. Optimizadas las condiciones experimentales que permiten obtener la mejor señal electroanalítica, se analiza la reproducibilidad y la capacidad de detección del método. Es importante analizar además la posible interferencia de la presencia de Cr(VI) en este sensor, para evitar errores en la futura determinación simultánea de ambos. Se comprueba que el Cr(VI) no ofrece respuesta electroanalítica en estas condiciones, y que además su presencia no varía la respuesta obtenida por el Cr(III).

Por otro lado, en este capítulo se describe también el proceso de fabricación de un sensor específico para la determinación de Cr(VI). Diversas experiencias llevadas a cabo con anterioridad en el grupo de investigación pusieron de manifiesto la posibilidad de fabricar sensores sensibles a la concentración de Cr(VI) empleando SPCEs modificados con AuNPs. Teniendo en cuenta dichas experiencias se plantean diferentes sensores: AuNPs-SPCEs, SPAuEs y SPAuEs modificados a su vez con AuNPs (AuNPs-SPAuEs). Con los sensores basados en la utilización de SPAuEs y AuNPs-SPCEs se obtienen buenas señales analíticas aunque, analizando y comparando las respuestas obtenidas en ambos sensores, se concluye que los AuNPs-SPCEs constituyen el mejor método para la determinación de Cr(VI). Una vez seleccionado el sensor más adecuado para la determinación de Cr(VI) se lleva a cabo la optimización de las condiciones experimentales: el medio tamponado y el pH del mismo. Una vez optimizadas las condiciones experimentales, se analiza el sistema en términos de reproducibilidad, repetibilidad y capacidad de detección. Finalmente, se estudia la posible influencia en la señal electroquímica de altas concentraciones de Cr(III), observando que dicha señal no es modificada por la presencia de dicha especie de cromo en las condiciones de medida. Por lo tanto el sensor desarrollado resulta selectivo para la determinación de Cr(VI) incluso en presencia de elevadas concentraciones de Cr(III).

Una vez desarrollados ambos sensores por separado, el siguiente paso es la puesta a punto de sensores mediante la modificación de diferentes electrodos de trabajo dispuestos en modo “array” en dispositivos desechables fabricados en el laboratorio. Para ello es necesario determinar las condiciones experimentales más adecuadas, teniendo en cuenta que las condiciones experimentales encontradas como óptimas para la determinación de Cr(III) empleando Hg/SPCEs resultan muy diferentes de las adecuadas para el análisis selectivo de Cr(VI) con AuNPs-SPCEs. Una vez optimizadas dichas condiciones experimentales cada una en su correspondiente electrodo de trabajo, se estudiaron los valores de reproducibilidad, repetibilidad y capacidad de detección obtenidos para cada una de las especies en presencia de la otra. La posible interferencia causada por la presencia de otros metales es también analizada, en la determinación de cada una de las especies de cromo, identificándose que especies metálicas, y en qué valor de concentración, ofrecen respuesta electroanalítica en el mismo rango de potenciales y en las mismas condiciones experimentales que los utilizados en la determinación del cromo.

Por último, se lleva a cabo la determinación del contenido en Cr(III) y Cr(VI) de una muestra de agua residual obtenida de una industria peletera. La determinación simultánea de ambas especies se realiza mediante adición estándar y, los resultados obtenidos en el análisis de la muestra real son validados mediante el análisis de dicha muestra empleando como método de referencia ICP-MS.

Este trabajo ha dado lugar a una publicación científica titulada: “*Simultaneous Determination of Cr(III) and Cr(VI) by Differential Pulse Voltammetry Using Modified Screen-Printed Carbon Electrodes in Array Mode*” (Electroanalysis 22 (2010) 2924-2930) y a una patente de invención (P201000737). Igualmente, parte de este trabajo ha sido presentado en forma de póster en el II International Workshop on Analytical Miniaturization, celebrado en Oviedo del 7 al 8 de Junio de 2010.

5.2. Simultaneous determination of Cr(III) and Cr(VI) by differential pulse voltammetry using modified screen-printed carbon electrodes in array mode

5.2.1. Abstract

A new procedure for the speciation of chromium by means of DPV using SPCEs has been proposed. Two different modified carbon working, a Ag/AgCl reference and a carbon counter screen-printed electrodes have been connected in array mode for the simultaneous determination of Cr(III) and Cr(VI). Mercury films or AuNPs have been ground onto the SPCEs in order to improve their selectivity to each chromium species. The quantification of the peak currents observed at -1.25 V in Hg-SPCE and -0.1 V in AuNPs-SPCE were carried out. The method has been applied to the speciation of chromium in waste water from a tannery factory.

5.2.2. Introduction

The demand for rapid and sensitive analytical methods for the determination of the different chemical forms of diverse toxic elements in environmental samples is increasing [1]. Among them, chromium is extensively used in numerous industrial processes, such as tanning, electroplating, metallurgy or textile fabrication, which leads to the presence of this metal in waste water [2-4].

Chromium may appear in solution in the form of Cr(III) and Cr(VI). The properties of these two species differ considerably. On the one hand, Cr(VI) is toxic due to its highly oxidising effect and the ease with which it penetrates biological membranes. Indeed, Cr(VI) has been considered to be a probable carcinogenic agent responsible of lung cancer, chronic ulcers and dermatitis [5]. On the other hand, Cr(III) is in certain doses essentially for human life, maintaining the metabolism of lipids and glucose [6]. Thus, the separately determination of both species of chromium is highly recommended.

Many instrumental techniques have been used for the determination of the total content of chromium, such as ultraviolet-visible spectrophotometry [7], ETAAS, FAAS [3, 7, 8], ICP-MS [9], ICP-AES [7] and electrochemical techniques including anodic stripping voltammetry (ASV) [10, 11], AdSV [12] and catalytic adsorptive stripping voltammetry (CAAdSV) [13-15]. These methods involve the determination of chromium after tedious separation steps.

The speciation of chromium species in environmental samples has been also attempted by different techniques. HPLC [16-19], ETAAS [20, 21] and luminescence quenching [22] have been employed. As it has been mentioned, this kind of procedures involves laborious prior extraction processes, which increase work time and manipulation of the sample, leading to possible sources of error and contamination.

Electrochemical techniques are a clear alternative for the determination of metals at trace level. Chromium can be determined directly with no pretreatment in real samples using electrochemical techniques, particularly AdSV, using different complexing agents such as PCV and DTPA. However, the speciation of chromium by these techniques usually requires several stages. First, Cr(VI) concentration is calculated directly. After subjecting the sample to an oxidization process, by means of UV-visible, the total concentration of chromium is determined and, finally, the concentration of Cr(III) is calculated by subtraction [23, 24].

The electrochemical speciation in a single step has been also reported by using a HMDE, but involving mathematical procedures such as multivariate regression [25, 26]. The unfriendly environmental effects of HMDE can be reduced by using disposable electrodes, such as SPEs. In addition, SPEs present many other advantages, such as the possibility of analysis *in situ* and facility of use, emphasizing the great variety of possible modifications [27, 28]. In this way, different procedures for the selective determination of Cr(VI) using SPCEs modified by AuNPs (AuNPs-SPCEs) have been reported [29, 30].

In this work, it is also presented the development of a procedure for the selective determination of Cr(III) using mercury film modified SPCEs (Hg-SPCEs). Its combination with the previous one described for Cr(VI) has been the main objective of the work in order to carry out the electrochemical speciation of chromium.

5.2.3. Experimental

5.2.3.1. Reagents

All solutions were prepared with high purity water obtained with a Barnstead NANO Pure II system. Nitrogen (99.99%) was used to remove

dissolved oxygen. All the reagents used were of analytical grade. Stock standard solutions ranging from 0.1 to 10 mM of Cr(VI) were daily prepared by dissolving the adequate amount of $K_2Cr_2O_7$ (Merck, Darmstadt, Germany) in water. Cr(III) solutions from 0.1 to 10 mM were daily obtained from $Cr(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ (Panreac, Barcelona, Spain) in water.

800 mg L^{-1} Hg (II) solutions were prepared by dissolving the appropriate amount of mercury nitrate (Panreac, Barcelona, Spain) in 1.3 M hydrochloric acid (Merck, Darmstadt, Germany). 0.1 mM Au (III) solutions were prepared by dissolving the appropriate amount of hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) in 500 mM sulphuric acid (Merck, Darmstadt, Germany).

40 mM stock Britton-Robinson buffer solutions with respect to o-boric, o-phosphoric and acetic acid was prepared using Merck analytical grade reagents. From this, solutions of different pH values were prepared by additions of 200 mM sodium hydroxide (Merck, Darmstadt, Germany). 100 mM acetic-acetate solutions were used as buffers. These solutions were prepared by dissolving the appropriate amount of sodium acetate (Merck, Darmstadt, Germany) in water.

Electrodag PF-407 A (carbon ink), Electrodag 418 SS (silver ink), Electrodag 6037 SS (silver/silverchloride ink) and Electrodag 452 SS (dielectric ink) were supplied by Acheson Colloiden (Scheemda, The Netherlands).

5.2.3.2. Apparatus

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

An Autolab PGSTAT 128N (EcoChemie) bipotentiostat with data acquisition software made available by the manufacturer (GPES 4.9 version) was used for electrochemical measurements.

The pH of the solution was measured with a Crison Model 2002 pH meter (Barcelona, Spain).

5.2.3.3. Software

Data analysis was performed using the Statgraphics statistical software package [31] for the linear regression, Progress [32] for the robust regression and Detarchi [33] in the case of the capability of detection calculation.

5.2.3.4. Construction of SPEs

In this study, two different home-made electrodic systems, including one or two working electrodes, have been used.

The optimization of experimental variables in the determination of Cr(III) and Cr(VI) were separately made using a single working electrode system. This device consists of three electrodes: a Ag/AgCl reference electrode, a carbon counter electrode and a working electrode (15.9 mm²).

Electrodic system with two carbon working electrodes, a Ag/AgCl reference electrode and a carbon auxiliary electrode were connected in array mode for the simultaneous determination of Cr(III) and Cr(VI) (Figure 5.1.). Figure 5.2. shows the schematic procedure for the electrodic system preparation.

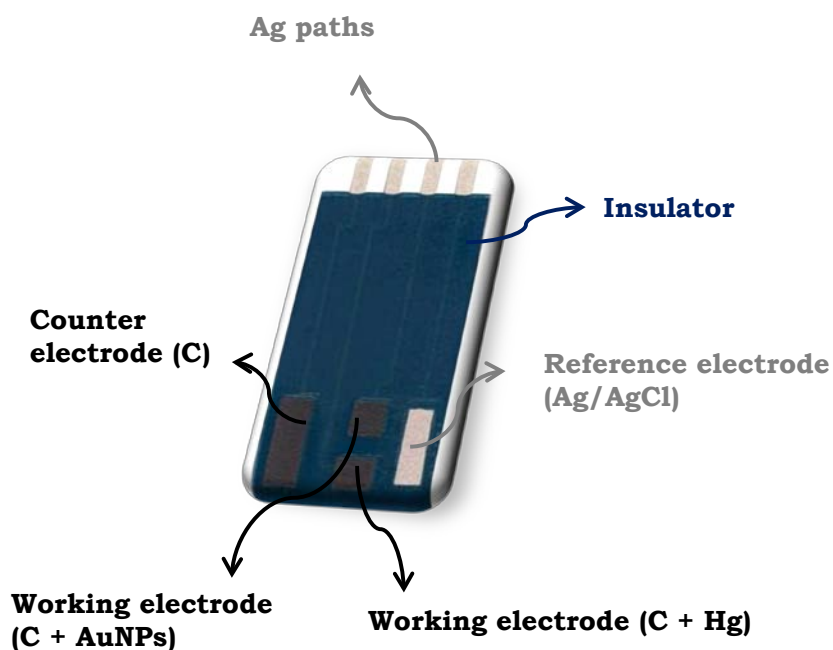


Figure 5.1.: Scheme of a SPCE used for the determination of chromium in array mode.

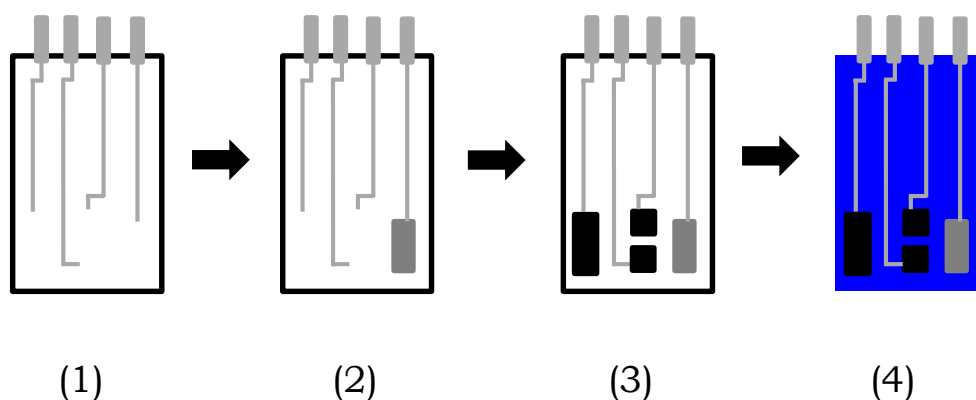


Figure 5.2.: Schematic diagram of the electrochemical system preparation procedure: (1) Silver-base paths, (2) reference electrode (Ag/AgCl), (3) counter electrode + working electrodes (carbon ink) and (4) insulator layer.

One of the working SPCEs was modified by depositing a Hg film on its surface (Hg-SPCEs). This deposition was performed by applying a potential of -900 mV during 600 s under stirring using a hydrochloric acid solution of

800 mg L⁻¹ of Hg (II) [34]. This modified electrode was used for Cr(III) determination.

The second working SPCE was modified with AuNPs in a next step. This modification was made by means of the electrochemical deposition of AuNPs on the screen-printed working electrode surface, using a 0.1 mM HAuCl₄ solution in a 500 mM sulphuric acid medium. The time and the potential of deposition applied were 200 s and +180 mV, respectively [35].

5.2.3.5. Differential pulse voltammetry measurement procedure

Differential pulse voltammetric measurements were taken using the following procedures.

5.2.3.5.1. Determination of Cr(III)

Cr(III) determination was carried out by means of DPV using Hg-SPCEs. All measurements were made at room temperature in a cell containing 5 mL of a Britton-Robinson pH 6 solution. Once the buffer solution had been deoxygenated during 10 minutes, successive additions of 100 µL of a 1 mM Cr(III) stock solution were made. The voltammogram was then recorded by making a cathodic sweep from -700 to -1500 mV.

5.2.3.5.2. Determination of Cr(VI)

Analogously, Cr(VI) analysis was performed using AuNPs-SPCEs by means of DPV. All measurements were made at room temperature in a cell containing 5 mL of an acetic-acetate buffer pH 4 solution. Once the buffer solution had been deoxygenated during 10 minutes, successive additions of

100 μL of a 10 μM Cr(VI) stock solution were made. The voltammogram was then recorded by making a cathodic sweep from +100 to -400 mV.

5.2.3.5.3. Simultaneous determination of both species of chromium

The simultaneous determination of Cr(III) and Cr(VI) was carried by means of DPV using a Hg-SCPE and a AuNPs-SPCE connected in array mode.

All measurements were made at room temperature in a cell containing 5 mL of an acetic-acetate buffer pH 4 solution as supporting electrolyte. Once the buffer solution had been deoxygenated, successive additions of 100 μL of a 10 mM Cr(III) solution and 100 μL of a 0.1 mM Cr(VI) solution were made. The voltammogram was recorded by making a cathodic sweep from +300 to -400 mV and from -700 to -1500 mV for AuNPs-SPCEs and Hg-SPCEs, respectively.

5.2.4. Results and discussion

In a previous work [30], authors described the determination of Cr(VI) using AuNPs-SPCEs. The analysis of Cr(VI) by this method was not affected by the presence of Cr(III). Furthermore, several experiences involving the analysis of Cr(III) using a Hg-SCPE, have demonstrated the viability of its determination even in presence of a high concentration of Cr(VI).

Bearing in mind these results, two working electrodes adequately modified, as it has been described above, were connected in array mode for the analysis of Cr(III) and Cr(VI), for achieving the chromium speciation in a single step.

With the aim of finding the optimal conditions for the simultaneous determination of both chromium species, previous detailed studies of each system were independently carried out.

5.2.4.1. Determination of chromium (III) using metal modified SPCEs

The DPV response of Cr(III) in different metallic films modified SPEs was studied. Tin, bismuth and mercury films were electrodeposited on the SPCE surface according to previous described procedures [34, 36-38]. No analytical signal for Cr(VI) was obtained in any case and only with Hg-SPCEs an adequate analytical reduction signal for Cr(III) determination was registered at a potential of -1.25 V. For this reason, this modified SPCE was selected as working electrode for the analysis of Cr(III). The influence of the experimental variables in the electrochemical response of this electrode was studied. Different buffer solutions and pH values were analyzed. In Figure 5.3., it can be seen that the highest currents for Cr(III) determination were recorded at pH 6 in Britton-Robinson and at pH 4 in acetic-acetate. Under these conditions, a well-defined DPV reduction peak at -1.25 V is obtained (Figure 5.4.). This peak can be attributed to the reduction of Cr(III) to Cr(II). As it can be seen in this figure, the DPV peak of Cr(III) is not influenced by the presence of a high content of Cr(VI). Therefore, the developed procedure is shown to be selective in the analysis of Cr(III).

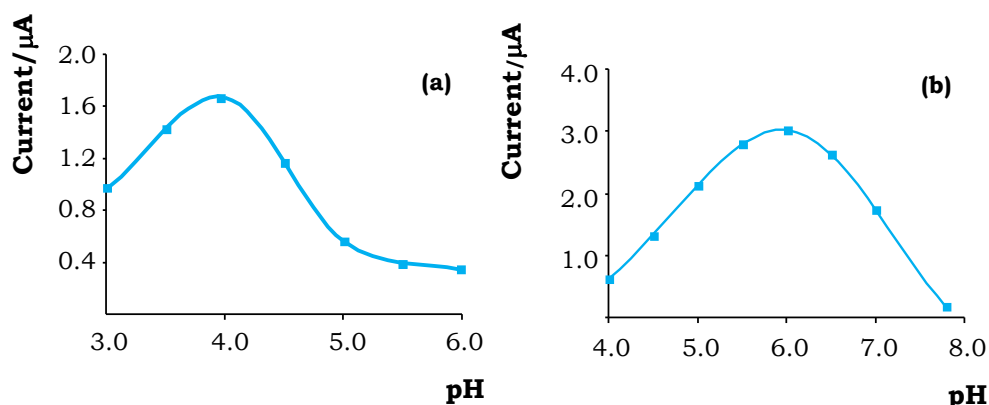


Figure 5.3.: Effect of pH in the DPV determination of Cr (III) using Hg-SPCEs in (a) acetic-acetate and in (b) Britton-Robinson buffer solutions.

[Cr(III)], 0.2 mM

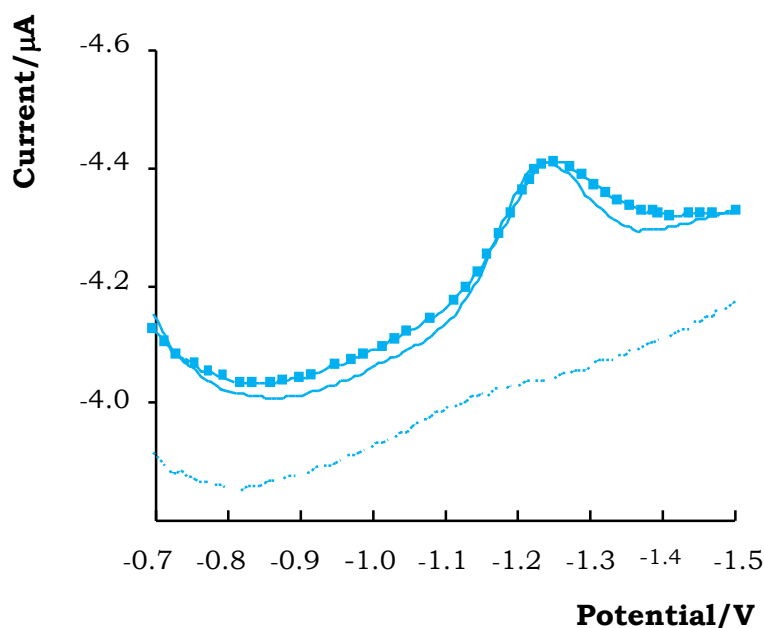


Figure 5.4.: Differential pulse voltammograms using Hg-SPCEs in acetic-acetate pH 4: (····) blank solution, (—) 0.1 mM Cr(III) solution, (■) 0.1 mM Cr(III) and 1 mM Cr(VI) solution. Potentials given versus an Ag/AgCl reference SPE.

The capability of detection of the developed method was calculated according to ISO 11843-2 [39] in the concentration range from 30 to 300 μM . A value of 39 μM was yielded for a probability of false positive and false negative equal to 0.05. The precision of the method was calculated in terms of the reproducibility. Three different Hg-SPCEs were used for the analysis of a 40 μM Cr(III) concentration sample. A 3.0% value for the percentage of RSD was achieved.

5.2.4.2. Determination of Chromium (VI) using AuNPs-SPEs

The DPV response of Cr(VI) was studied in different electrodes. SPCEs, SPAuEs, AuNPs-SPCEs and AuNPs-SPAuEs were considered. No analytical signal was obtained for Cr(VI) in the case of SPCEs. However, the modification of this electrode with AuNPs gave rise to a high analytical signal for this chromium species at -0.1 V. For SPAuEs, a good quality

analytical signal is obtained for Cr(VI). Nevertheless, the modification of this electrode with AuNPs led to less reproducible results in the analysis of this species. Reproducibility, repeatability and capability of detection values obtained with AuNPs-SPCEs and SPAuEs are shown in Table 5.1.

Table 5.1.: Characterization parameters obtained for different SPEs in the determination of Cr(VI) by DPV.

	Capability of detection (μM)	Repeatability (%RSD)	Reproducibility (%RSD)
SPAuE	20	6.9	9.9
AuNPs-SPCE	0.5	1.4	1.5

The analysis of Table 5.1. highlights the highest sensitivity and precision of AuNPs-SPCEs. For this reason, a AuNPs-SPCE was selected as working electrode for Cr(VI) determination.

Experimental conditions were optimized for the analysis of Cr(VI) with this electrode. It was found that the best results were obtained in acetic-acetate pH 4 [30]. Under these conditions, in Figure 5.5. it can be observed a high intensity reduction peak at -0.1 V which can be related to the reduction of Cr(VI) to Cr(III). In this figure, it is also shown that the presence of a high content of Cr(III) does not influence the peak intensity obtained for Cr(VI). Thus, this sensor resulted to be selective for the determination of Cr(VI).

5.2.4.3. Simultaneous determination of both species of chromium

According to the above described results, the simultaneous analysis of Cr(III) and Cr(VI) in one step has been performed by using the two different working SPCEs connected in array mode.

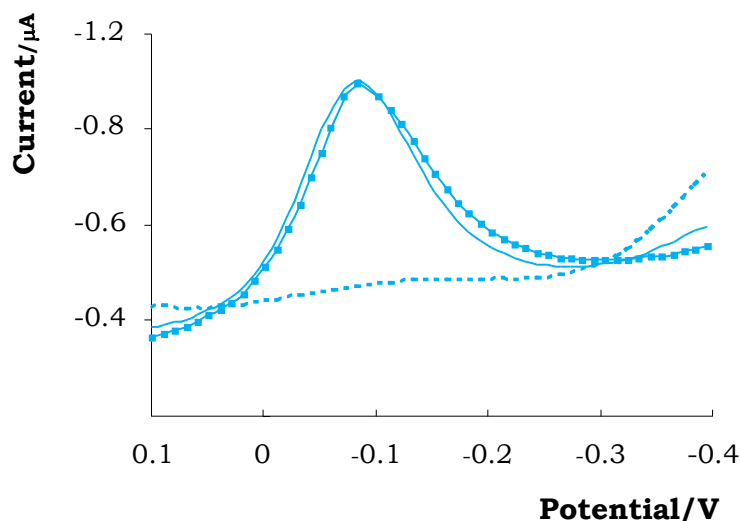


Figure 5.5.: Differential pulse voltammograms using AuNPs-SPCEs in acetic-acetate pH 4: (····) blank solution, (—) 0.1 mM Cr(VI) solution, (■) 0.1 mM Cr(VI) and 1 mM Cr(III) solution. Potentials given versus a Ag/AgCl reference SPE.

Due to the low response of Cr(VI) at pH 6 [30], acetic-acetate pH 4 buffer was selected for the joint determination of both species. Figure 5.6. shows the characteristic DPV voltammograms recorded under these conditions.

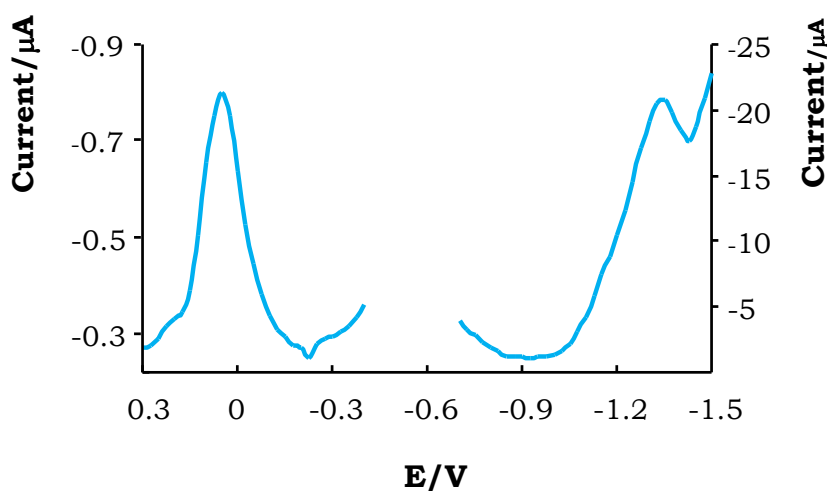


Figure 5.6.: Differential pulse voltammograms for the simultaneous determination of Cr(III) and Cr(VI) using a Hg-SPCE (right side) and a AuNPs-SPCE (left side). Acetic-acetate pH 4, [Cr(III)], 730 µM; [Cr(VI)], 18 µM. Potentials given versus a Ag/AgCl reference SPE.

Calibrations for Cr(III) and Cr(VI) were performed in acetic-acetate pH 4 by using least median squares (LMS) regression to detect the existence of anomalous points [32]. The criterion employed in LMS regression was to minimize the median of squares of the differences between the experimental and the calculated values. LMS regression has the advantage of being able to detect anomalous points regardless of whether they are “outliers” or “leverage” points, seeking a linear range in which at least 50% of the data are aligned. The strategy followed consisted of two steps. In the first, the LMS regression was used to detect anomalous points, taking “outliers” to be points where the absolute value of the standardized residual was greater than 2.5 and “leverage” points as those where the absolute value of their resistant diagnostic was greater than 2.5. When both of these parameters were above 2.5, the point was considered as an “outlier-leverage” point. In the second step, the anomalous points detected in this way were eliminated and a regression based on OLS criterion was carried out, to obtain optimal precision and accuracy of both slope and intercept.

The calibrations parameters obtained by DPV for standard solutions containing Cr(III) concentrations from 0.2 up to 1.5 mM can be shown in Table 5.2. Analogously, Table 5.3. shows the calibrations parameters for standard solutions of Cr(VI) concentrations in the calibration range from 4.9 up to 40 μM .

Table 5.2.: Calibration parameters obtained for the determination of Cr(III) in presence of Cr(VI) by DPV.

	1 st Calibration	2 nd Calibration	3 rd Calibration
Sensitivity (A mM⁻¹)	3.9	3.6	3.8
Intercept (μA)	-0.5	2.0	2.0
Residual standard deviation x 10⁻⁷	1.2	0.6	0.4
Coefficient of determination (R²)	0.99	0.99	0.99
Number of points	8	9	8

Table 5.3.: Calibration parameters obtained for the determination of Cr(VI) in presence of Cr(III) by DPV.

	1 st Calibration	2 nd Calibration	3 rd Calibration
Sensitivity (A mM⁻¹)	2.8	2.8	2.7
Intercept (μA)	-0.3	0.1	2.0
Residual standard deviation x 10⁻⁸	0.9	1.3	1.3
Coefficient of determination (R²)	0.99	0.99	0.99
Number of points	9	10	8

The precision of the method was calculated in terms of reproducibility. The slopes of the three calibration curves, constructed with three different working electrodes were analyzed for each chromium species. The %RSD obtained for the slopes was 4.0% and 1.5% for Cr(III) and Cr(VI), respectively. The minimal detectable quantity of Cr(III) and Cr(VI) has been calculated one in the presence of each other. This quantification has been performed according to ISO 11843-2 [39]. At the chosen probability level of 5% ($\alpha=\beta=0.05$), the capabilities of detection were 190 μM and 4.8 μM obtained for Cr(III) and Cr(VI), respectively.

5.2.4.4. Interferences

An analysis of any possible effects caused by the presence of foreign ions in the electrochemical speciation of chromium using modified SPEs was carried out. None of the following metallic ions analyzed – Ni(II), Pb(II), Zn(II), Sn(II), Sb(III), Sb(V), As(III), As(V) and Co(II) – produced an interfering electrochemical signal in the range of concentrations between 0.1 and 100 μM.

In the case of Cr(VI) determination using AuNPs-SPCEs, Cu(II) and Fe(III) gave rise to peaks in the same zone of potentials as Cr(VI) at a concentration level of 10 μM and 100 μM, respectively. Both ions also

interfered in the analytical determination of Cr(III) using Hg-SPCEs at a concentration level of 100 μM . In this case, Cd(II) can be also considered as an interferent at a concentration level of 100 μM . The influence of the interfering ions in the electrochemical response of Cr(III) and Cr(VI) can be seen in Figure 5.7.

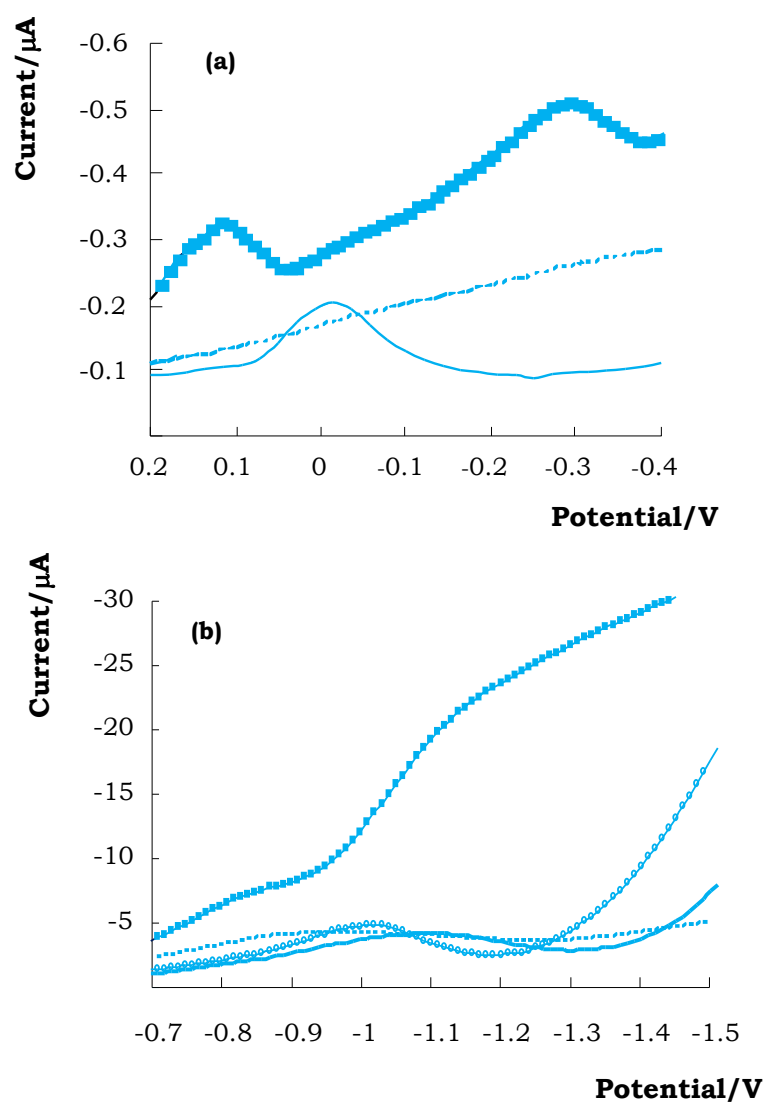


Figure 5.7.: Differential pulse voltammograms obtained in the presence and the absence of interfering ions in Cr(VI) determination (a) and in Cr(III) determination (b). (a) (—) [Cr(VI)], 5 μM ; (■) [Cr(VI)], 5 μM and [Cu (II)], 10 μM ; (--) [Cr(VI)], 5 μM and [Fe (III)], 100 μM . (b) (—) [Cr(III)], 200 μM ; (■) [Cr(III)], 200 μM and [Cu (II)], 100 μM ; (--) [Cr(III)], 200 μM and [Fe (III)], 100 μM ; (o) [Cr(III)], 200 μM and [Cd (II)], 100 μM . Acetic-acetate pH 4. Potentials given versus a Ag/AgCl reference SPE.

5.2.4.5. Analytical application

The sewage dumped by many tanning factories is known to have a high concentration of chromium. Due to the different toxic character of Cr(III) and Cr(VI) species it is necessary the speciation of this metal in this type of waste water. The electrochemical response obtained for this sample can be seen in Figure 5.8.

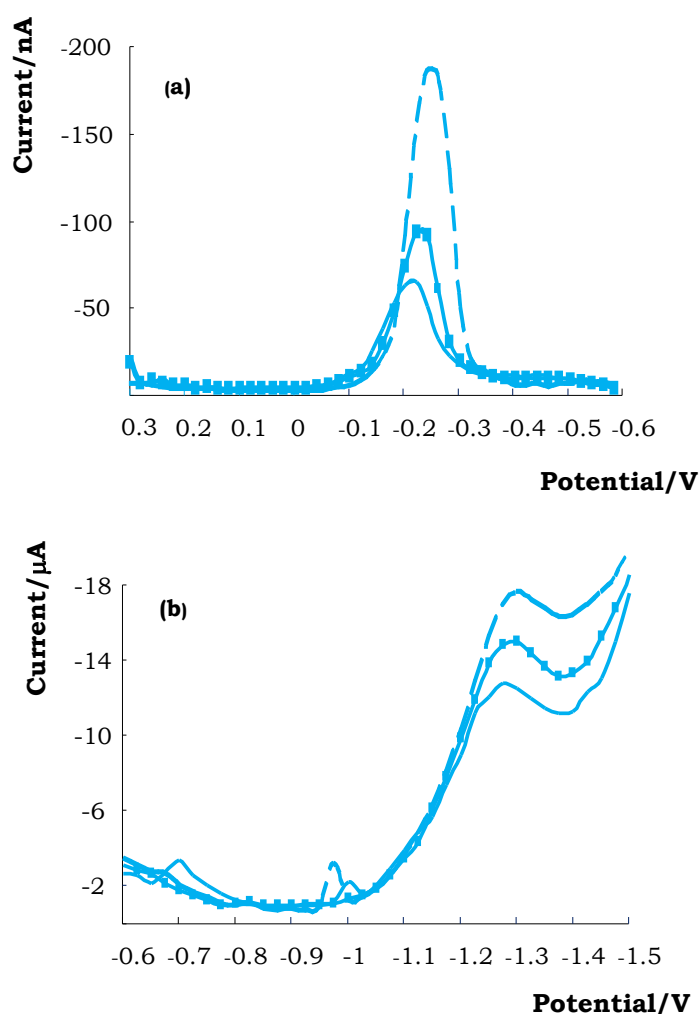


Figure 5.8.: Differential pulse voltammograms obtained for the simultaneous determination of Cr(III) and Cr(VI) in a residue sample from a tanning industry using a AuNP-SPCE (a) and a Hg-SPCE (b):

(a) Cr(VI) concentration added: (—) 0; (■) 1.9 μM; (---) 3.8 μM;

(b) Cr(III) concentration added: (—) 0; (■) 490 μM; (---) 980 μM. Acetic-acetate pH 4. Potentials given versus a Ag/AgCl reference SPE.

The analysis of a sample obtained as residue of a tanning industry, was made by standard addition. The concentrations of Cr(III) and Cr(VI) obtained by the proposed method were $440 \pm 0.7 \mu\text{M}$ ($n=3$, $\alpha=0.05$) and $1.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ($n=3$, $\alpha=0.05$), respectively. These results were checked using an electrochemical reference method. This method was based on DPAdSV using PCV as complexing agent and multivariate calibration [25].

The concentrations of Cr(III) and Cr(VI) found, $470 \pm 0.6 \mu\text{M}$ ($n=3$, $\alpha=0.05$) and $1.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ($n=3$, $\alpha=0.05$), agree with the ones obtained by the new proposed method. The analysis of the total chromium content in the waste water from a tannery has also been carried out by means of ICP-MS. The value yielded by this reference technique, $460 \pm 0.6 \mu\text{M}$ ($n=3$, $\alpha=0.05$), agrees with the result obtained by the proposed method.

5.2.5. Conclusions

The viability of the determination of Cr(III) in presence of Cr(VI) using Hg-SPCEs has been successfully demonstrated for the first time. The developed electrode can also be used together with a AuNPs-SPCE connected in array mode for the simultaneous analysis of Cr(III) and Cr(VI).

This procedure requires no previous pretreatment steps of the sample. Therefore, analysis time and the possibility of sample contamination are considerably reduced. Moreover, the developed method involves no tedious mathematical procedures which points out the very easy way for carrying out the speciation of chromium. The described method also adds the advantages of the electrochemical techniques such as simplicity and low cost together with the employ of disposable SPEs. Finally, the described method resulted to be applicable to the speciation of chromium in complex matrices such as waste water from a tannery.

5.2.6. Acknowledgements

Authors would like to acknowledge funding via Junta de Castilla y León (GR177) and Ministerio de Ciencia e Innovación (TEC2009-12029). A. Calvo-Pérez is funded by a Junta de Castilla y León and the European Social Found grant and M.A. Alonso-Lomillo is funded by a Ramón y Cajal fellowship from the Spanish Ministry of Science and Innovation and the European Social found.

5.2.7. References

- [1] S.D. Jadhav, Z.R. Turel, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry-Articles*, 177 (1994) 185-191.
- [2] Y.S. Fung, W.C. Sham, *Analyst*, 119 (1994) 1029-1032.
- [3] M. Sperling, S.K. Xu, B. Welz, *Analytical Chemistry*, 64 (1992) 3101-3108.
- [4] M.J. Powell, D.W. Boomer, D.R. Wiederin, *Analytical Chemistry*, 67 (1995) 2474-2478.
- [5] R. Cornelis, *Trace Element Analysis in Biological Specimens*, Elsevier, The Netherlands, 1994.
- [6] V. Volkovic, *Trace Elements Analysis*, London, 1975.
- [7] P. Pazos-Capeáns, M.C. Barciela-Alonso, A. Bermejo-Barrera, P. Bermejo-Barrera, *Analytica Chimica Acta*, 524 (2004) 121-126.
- [8] J. Lameiras, *Analyst*, 123 (1998) 2091-2095.
- [9] J.P. Lafleur, E.D. Salin, *Analytical Chemistry*, 80 (2008) 6821-6823.

- [10] C. Locatelli, G. Torsi, *Microchemical Journal*, 78 (2004) 175-180.
- [11] W.W. Zhu, N.B. Li, H.Q. Luo, *Talanta*, 72 (2007) 1733-1737.
- [12] J. Golimowski, P. Valenta, H.W. Nurnberg, *Fresenius Zeitschrift fur Analytische Chemie*, 322 (1985) 315-322.
- [13] M. Paneli, A.V. Voulgaropoulos, K. Kalcher, *Mikrochimica Acta*, 110 (1993) 205-215.
- [14] Z. Gao, K.S. Siow, *Electroanalysis*, 8 (1996) 602-606.
- [15] A. Bobrowski, A. Królicka, J. Zarębski, *Electroanalysis*, 21 (2009) 1449-1458.
- [16] L.L. Wang, Wang, J.Q., Zheng, Z.X., Xiao, P., *Journal of Hazardous Materials*, 175 (2010) 146-150.
- [17] C.Y. Kuo, S.J. Jiang, A.C. Sahayam, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22 (2007) 636-641.
- [18] J.S. Wang, K. Chiu, *Analytical Sciences*, 20 (2004) 841-846.
- [19] A.A. Ambushe, R.I. McCrindle, C.M.E. McCrindle, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 24 (2009) 502-507.
- [20] H.F. Maltez, E. Carasek, *Talanta*, 65 (2005) 537-542.
- [21] M.T.S. Cordero, E.I.V. Alonso, A. García De Torres, J.M.C. Pavón, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19 (2004) 398-403.
- [22] M.S. Hosseini, F. Belador, *Journal of Hazardous Materials*, 165 (2009) 1062-1067.
- [23] D.V. Vukomanovic, G.W. vanLoon, K. Nakatsu, D.E. Zoutman, *Microchemical Journal*, 57 (1997) 86-95.

- [24] M. Boussemart, C.M.G. Vandenberg, M. Ghaddaf, *Analytica Chimica Acta*, 262 (1992) 103-115.
- [25] O. Domínguez, M.J. Arcos, *Electroanalysis*, 12 (2000) 449-458.
- [26] O. Domínguez, M.J. Arcos, *Analytica Chimica Acta*, 470 (2002) 241-252.
- [27] M. Starowicz, B. Stypula, J. Banas, *Electrochemistry Communications*, 8 (2006) 227-230.
- [28] O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, *Talanta*, 73 (2007) 202-219.
- [29] G.D. Liu, Y.Y. Lin, H. Wu, Y. Lin, *Environmental Science & Technology*, 41 (2007) 8129-8134.
- [30] O. Domínguez-Renedo, L. Ruiz-Espelt, N. García-Astorgano, M.J. Arcos-Martínez, *Talanta*, 76 (2008) 854-858.
- [31] Statgraphics, *Statgraphics Plus for Windows*, Copy 1994-2001.
- [32] P.J. Rousseeuw, *Robust Regression and Outlier Detection*, John Wiley and sons, New York, 1989.
- [33] L. Sarabia, M.C. Ortiz, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 13 (1994) 1-6.
- [34] O. Domínguez-Renedo, M.J.G. Gonzalez, M.J. Arcos-Martínez, *Sensors*, 9 (2009) 219-231.
- [35] O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, *Analytica Chimica Acta*, 589 (2007) 255-260.
- [36] W.W. Zhu, N. Bing, H.Q. Luo, *Talanta*, 72 (2007) 1733-1737.

-
- [37] G.H. Hwang, W.K. Han, J.S. Park, S.G. Kang, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 135 (2008) 309-316.
- [38] A. Alberich, N. Serrano, C. Arino, J.M. Diaz-Cruz, M. Esteban, *Talanta*, 78 (2009) 1017-1022.
- [39] I. 11843-2, *Capability of Detection*, Geneva, Switzerland, 2000.

7. CONCLUSIONES

Los resultados experimentales de los capítulos anteriores se pueden resumir en las siguientes conclusiones:

1. La gran versatilidad de los electrodos serigrafiados para construir sensores y biosensores específicos para diferentes tipos de contaminantes ha sido demostrada.
2. Contaminantes como la Tyr y el cromo son compuestos susceptibles de sufrir procesos redox, y por este motivo, pueden ser determinados mediante técnicas electroanalíticas.
3. Los biosensores desechables basados en la inmovilización por entrecruzamiento del enzima PAO en la superficie electródica del electrodo de trabajo (PAO/SPCEs), permiten la determinación de Tyr.
4. En la determinación de Tyr mediante amperometría utilizando PAO/SPCEs, la respuesta amperométrica está influenciada por aquellos parámetros que afectan al proceso de inmovilización del enzima. La optimización de estos factores permite fijar como valores adecuados para la determinación de Tyr una relación de los reactivos entrecruzantes ($V_{GA\ 2.5\%}/V_{BSA\ 3\%}$) y un número de unidades de PAO, de 1 y 3.5, respectivamente.
5. En la determinación de Tyr empleando PAO como elemento biológico, es necesario emplear HOMeFc como mediador electroquímico, para reducir el potencial de trabajo y con ello, las posibles interferencias por parte de otros compuestos presentes en la muestra real. Los factores experimentales influyentes en la señal amperométrica han sido optimizados con un diseño experimental central compuesto 2^3 , obteniendo como valores óptimos: pH (Tampón fosfato), 6.6; E_{ap} , +260 mV; [HOMeFc], 22 μ M.

6. La reproducibilidad y repetibilidad del biosensor es 8.6% y 8.7% respectivamente. El valor de capacidad de detección obtenido en la determinación de Tyr es $2.0 \pm 0.2 \mu\text{M}$.
7. Los biosensores PAO/SPCEs desarrollados son adecuados para el análisis de Tyr en una muestra de queso brie. El análisis de este tipo de muestras requiere una etapa previa de extracción selectiva de compuestos del tipo BAs.
8. Las BAs analizadas interfieren en el biosensor desarrollado, siendo Cad y Put las que presentan mayor respuesta electroanalítica junto con Tyr.
9. Los biosensores desechables basados en la utilización del enzima HRP permiten la determinación cronoamperométrica de Tyr. Estos biosensores pueden ser construidos mediante la inmovilización por entrecruzamiento del enzima sobre la superficie electródica (HRP/SPCEs) o mediante el serigrafiado del mismo durante el propio proceso de fabricación del sistema electródico (SPC_{HRP}Es).
10. En los biosensores HRP/SPCEs, la respuesta cronoamperométrica obtenida en presencia de Tyr está influenciada por varios factores, que incluyen aquellos que afectan al proceso de inmovilización del enzima, y los que influyen de manera más directa en el proceso de medida cronoamperométrico.
11. Las condiciones de inmovilización óptimas para la elaboración de los biosensores HRP/SPCEs son: 35 unidades de HRP y una relación V_{GA}/V_{BSA} igual a 3. Los factores experimentales que influyen de manera directa en la señal cronoamperométrica son: pH, potencial de trabajo y concentración de H_2O_2 . Dichos factores se han optimizado

mediante un diseño de experimentos central compuesto 2^3 , obteniéndose como valores óptimos: Tampón fosfato pH, 9; E_{ap} , 0 mV y $[H_2O_2]$, 0.5 mM.

12. El valor de capacidad de detección obtenido en la determinación de Tyr empleando el biosensor HRP/SPCEs es $0.2 \pm 0.01 \mu\text{M}$, con una reproducibilidad del 6.8% y una repetibilidad del 7.1%.
13. La cantidad óptima de HRP para la fabricación de los biosensores $\text{SPC}_{\text{HRP}}\text{Es}$ es 1%.
14. En el biosensor $\text{SPC}_{\text{HRP}}\text{Es}$, la respuesta cronoamperométrica se ve influenciada por los factores experimentales: pH, E_{ap} y $[H_2O_2]$. Las condiciones experimentales optimizadas mediante un diseño de experimentos central compuesto son las mismas que las obtenidas para el biosensor HRP/SPCEs.
15. El biosensor $\text{SPC}_{\text{HRP}}\text{Es}$ muestra una reproducibilidad del 3.4% y una repetibilidad del 2.2%. El valor de capacidad de detección obtenido en la determinación de Tyr, empleando el biosensor $\text{SPC}_{\text{HRP}}\text{Es}$, es $2.1 \pm 0.2 \mu\text{M}$.
16. El biosensor $\text{SPC}_{\text{HRP}}\text{Es}$ permite determinar Tyr con una buena sensibilidad, reproducibilidad y repetibilidad, evitando el proceso de inmovilización del enzima en el dispositivo desechable, lo que reduce aún más el tiempo de análisis.
17. No se obtiene interferencias de otras BAs, en la determinación de Tyr con $\text{SPC}_{\text{HRP}}\text{Es}$, debido a que sólo Tyr presenta grupos hidroxilo en su estructura.

18. El biosensor $\text{SPC}_{\text{HRPEs}}$ se ha aplicado con éxito al análisis del contenido en Tyr de una muestra de queso brie.
19. El biosensor $\text{SPC}_{\text{HRPEs}}$ permite determinar Tyr con una sensibilidad de orden micromolar, con valores muy adecuados de reproducibilidad y repetibilidad, sin interferencias de otras BAs y evitando el proceso de inmovilización del enzima, lo que reduce el tiempo de análisis.
20. Los SPCEs modificados con AuNPs permiten la determinación selectiva de Cr(VI) en presencia de Cr(III) mediante DPV en el rango de potenciales comprendido entre 0.1 y -0.4 V en tampón acético-acetato pH 4.
21. Las mejores condiciones para obtener nanopartículas de oro sobre la superficie electrodo son las siguientes: E_{dep} , +180 mV; t_{dep} , 200 s y $[\text{HAuCl}_4]$, 0.1 mM en 0.5 M H_2SO_4 .
22. El sensor muestra una reproducibilidad del 1.5% y una repetibilidad del 1.4 %. El valor de capacidad de detección obtenido con AuNPs-SPCEs en la determinación selectiva de Cr(VI) es 0.5 μM .
23. Los SPCEs modificados con una película de mercurio permiten la determinación selectiva de Cr(III) en presencia de Cr(VI) mediante DPV en el rango de potenciales comprendido entre -0.7 y -1.5 V en tampón Britton-Robinson pH 6.
24. Las mejores condiciones para depositar la película de mercurio sobre la superficie electrodo son las siguientes: E_{dep} , -900 mV; t_{dep} , 600 s y $[\text{Hg(II)}]$, 800 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en HCl.

25. El sensor Hg-SPCEs muestra una reproducibilidad del 3% y una capacidad de detección 39 μM en la determinación selectiva de Cr(III).
26. Ni(II), Pb(II), Zn(II), Sn(II), Sb(III), Sb(V), As (III), As(V) y Co (II) no presentan interferencias en las determinación de Cr(III) y Cr(VI), empleando Hg-SPCEs y AuNPs-SPCEs, respectivamente. Cu(II) y Fe(III) presentan señal electroquímica en el mismo rango de potenciales utilizado en la determinación de Cr(VI) con AuNPs-SPCEs a partir de concentraciones 10 μM . Valores de concentración de Cd(II) superiores a 100 μM presentan interferencia en la determinación de Cr(III) con Hg-SPCEs.
27. La utilización de dispositivos serigrafados con una configuración de cuatro electrodos empleando dos electrodos de trabajo, uno de ellos modificado con nanopartículas de oro (AuNPs-SPCEs) y el otro con película de mercurio (Hg-SPCEs), permite la especiación electroquímica de cromo en una sola etapa en muestras complejas como el agua residual de peletera.
28. Los biosensores desechables basados en la utilización del enzima tirosinasa permiten la determinación cronoamperométrica de Cr(III). Estos biosensores pueden ser construidos mediante la inmovilización por entrecruzamiento del enzima sobre la superficie electródica de electrodos modificados con el mediador electroquímico TTF (tirosinasa/SPC_{TTF}Es).
29. La presencia de Cr(III) produce la inhibición de la actividad enzimática provocando la disminución de la señal cronoamperométrica del sustrato pirocatecol.

30. Las condiciones experimentales óptimas para el proceso de inmovilización del enzima son: 154.8 unidades de tirosinasa y $V_{GA} 2.5\%/V_{BSA} 3\%$, 1.
31. En la determinación de Cr (III) mediante cronoamperometría con tirosinasa/SPC_{TTF}Es, la intensidad de la señal está influenciada por diversos factores como el pH, [pirocatecol] y E_{ap} . El potencial viene predefinido por el mediador electroquímico utilizado, TTF, y los otros dos factores son optimizados mediante un diseño central compuesto ²². Las condiciones óptimas son las siguientes: pH, 5; [pirocatecol], 2.8 mM, E_{ap} , +250 mV.
32. El biosensor tirosinasa/SPC_{TTF}Es, permite la determinación de Cr(III) con una capacidad de detección de $2.0 \pm 0.2 \mu\text{M}$ y una reproducibilidad del 5.5%.
33. Cu(II), Pb(II), Co(II), Zn(II), Sb(III), As(III), As(V) y Hg(II) no presentan interferencias en la determinación de Cr(III) con tirosinasa/SPC_{TTF}Es. Ni(II), Fe(II), Fe(III), Sn(II) y Sb(V) presentan señales de inhibición en concentraciones de orden $1 \mu\text{M}$. Cd(II) presenta señal de inhibición a concentraciones del orden de $10 \mu\text{M}$. El Cr(VI) no interfiere en la determinación electroquímica de Cr(III).
34. Los biosensores desechables basados en la utilización del enzima GOx permiten la determinación cronoamperométrica de Cr(VI). Estos biosensores pueden ser construidos mediante la inmovilización por entrecruzamiento del enzima sobre la superficie electródica de SPC_{Pt}Es (GOx/SPC_{Pt}Es).

35. La presencia de Cr(VI) produce la inhibición de la actividad enzimática provocando la disminución de la señal cronoamperométrica del sustrato glucosa.
36. En la determinación cronoamperométrica de Cr(VI) con GOx/SPC_{Pt}Es el ferricianuro presenta excelentes propiedades como mediador electroquímico.
37. Las condiciones experimentales óptimas del proceso de inmovilización son: 1.95 unidades de GOx y V_{GA} 2.5%/V_{BSA} 3%, 1.
38. En la determinación de Cr(VI) mediante cronoamperometría con GOx/SPC_{Pt}Es, la intensidad de la señal está influenciada por diversos factores como el pH, [glucosa], [ferricianuro] y E_{ap}. El potencial viene predefinido por el mediador electroquímico utilizado, ferricianuro, y los otros tres factores son optimizados mediante un diseño central compuesto 2³. Las condiciones óptimas encontradas son las siguientes: pH, 4; [glucosa], 36 mM; [ferricianuro], 1 mM y E_{ap}, +200 mV.
39. El biosensor GOx/SPC_{Pt}Es, basado en la inmovilización mediante entrecruzamiento del enzima GOx sobre la superficie de un electrodo de carbono platinizado, permite la determinación de Cr(VI) con un capacidad de detección de 90.5 ± 7.6 nM y una reproducibilidad del 6.2 %.
40. En la determinación de Cr(VI) con GOx/SPC_{Pt}Es, Cu(II), Ni(II), Pb(II), Cd(II), Fe(II), Fe(III), Zn(II), Sn(II), Sb(III), Sb(V), As(III) y Co(II) no presentan señal electroquímica en el rango de concentraciones comprendido entre 0.1 y 100 μM. Sin embargo, As(V) y Hg(II) presentan señal de inhibición en una concentración mayor de 10 μM,

y por tanto podrán interferir en el análisis de Cr(VI). Cr(III) no interfiere en la determinación analítica de Cr(VI).

41. La utilización de dispositivos serigrafiados con una configuración de cuatro electrodos empleando dos electrodos de trabajo, de carbono modificado con TTF (SPC_{TTF}E) y de carbono platinizado (SPC_{Pt}E) permite la especiación electroquímica de cromo en una sola etapa en muestras complejas como el agua de grifo. Dicha especiación requiere la inmovilización del enzima tirosinasa sobre el SPC_{TTF}E y, del enzima GOx sobre el SPC_{Pt}E.
42. Las condiciones utilizadas en la determinación simultánea de ambas especies de cromo son las siguientes: pH, 4; [pirocatecol], 2.8 mM; [glucosa], 36 mM; [ferricianuro], 1 mM; E_{ap} (Tirosinasa/SPC_{TTF}E), +250 mV y E_{ap} (GOx/SPC_{Pt}E), +200 mV.
43. Comparando los métodos desarrollados para la especiación electroquímica de cromo, se concluye que los biosensores basados en los enzimas GOx y tirosinasa, ofrecen sensibilidades mejores para la especiación de cromo.

ANEXO I: PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF Cr(III) AND Cr(VI) BY DIFFERENTIAL PULSE VOLTAMMETRY USING MODIFIED SCREEN-PRINTED CARBON ELECTRODES IN ARRAY MODE.

Ana Calvo Pérez, Olga Domínguez Renedo, M. Asunción Alonso Lomillo and M. Julia Arcos Martínez.

ELECTROANALYSIS

22, 2924 – 2930, 2010.

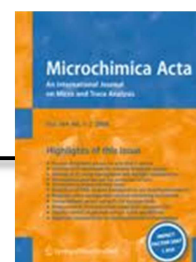


DISPOSABLE AMPEROMETRIC BIOSENSOR FOR THE DETERMINATION OF TYRAMINE USING PLASMA AMINO OXIDASE.

Ana Calvo Pérez, Olga Domínguez Renedo, M. Asunción Alonso Lomillo and M. Julia Arcos Martínez.

MICROCHIMICA ACTA

180, 253 – 259, 2013.



DISPOSABLE HORSE RADISH PEROXIDASE BIOSENSORS FOR THE SELECTIVE DETERMINATION OF TYRAMINE.

Ana Calvo Pérez, Olga Domínguez Renedo, M. Asunción Alonso Lomillo and M. Julia Arcos Martínez.

ELECTROANALYSIS

25, 1316 – 1322, 2013.



ANEXO II: COMUNICACIONES A CONGRESOS

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF Cr(III) AND Cr(VI) USING SCREEN-PRINTED ELECTRODES IN ARRAY MODE.

Ana Calvo Pérez, Olga Domínguez Renedo, M. Asunción Alonso Lomillo and M. Julia Arcos Martínez.



SIMULTANEOUS DETERMINATION OF Cr(III) AND Cr(VI) USING SCREEN-PRINTED ELECTRODES IN ARRAY MODE

Ang Calvo-Pérez, Olga Domínguez-Renedo, M. Asunción Alonso-Lomillo and M. Julia Arcos-Martínez
 Departamento de Química, Área de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Burgos, Plaza Misael Bañuelos s/n, E-09001 Burgos, Spain.
 Telephone: 947258818. Fax: 947258831. E-mail: anacp@ubu.es, olgado@ubu.es, malomillo@ubu.es, jarcos@ubu.es.

Introduction

- Chromium is present in the environment, in two forms of oxidation Cr(III) and Cr(VI). The toxicity of these two forms differs considerably. While Cr(III) is considered to be essential for mammals, Cr(VI) presents high levels of toxicity, and has been considered as a carcinogenic agent. Thus, the separately determination of both species of chromium is highly recommended.
- Electrochemical techniques are a clear alternative for the determination of metals at trace level. Chromium can be determined directly with no pretreatment in real samples using electrochemical techniques.
- The advent of screen-printed (thick-film) technology has made it possible to mass-produce inexpensive disposable electrodes for use with electrochemical instruments [1].
- The design of new nanoscale materials has acquired ever-greater importance in recent years due to their wide-ranging applications in various fields. Among these materials, metallic nanoparticles are of great interest due to their important properties and their numerous possible applications.
- In this work an method for the speciation of chromium has been developed using carbon screen-printed electrodes (SPCE) modified with gold nanoparticles (AuNPs) and mercury film.

Experimental

Voltammetric measurements were taken using a μ Autolab electrochemical system with GPES Software (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands).

Construction of the electrodes

Screen-printed electrodes were produced on a DEK 248 printing machine using polyester screens with appropriate stencil designs mounted at 45° to the printer stroke.



Modification of the electrodes

Gold nanoparticles and mercury film were electrochemically deposited onto the working electrode surface in the following conditions:

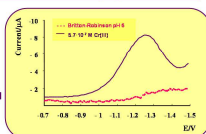
$C_{AuCl_4^-} = 10^{-3} M$ $E = 0.18 V$
 $0.5 M H_2SO_4$ $t = 200 s$

$C_{Hg} = 800 ppm$ $E = -0.9 V$
 $1.5 M HCl$ $t = 600 s$

Voltammetric Determination of Cr(III)

Differential pulse voltammograms for Cr(III) using Hg-SPCEs in Britton-Robinson pH 6.

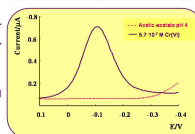
Potentials given versus a Ag/AgCl reference SPE.



Voltammetric Determination of Cr(VI)

Differential pulse voltammograms for Cr(VI) using AuNPs-SPCEs in acetic-acetate pH 4.

Potentials given versus a Ag/AgCl reference SPE.

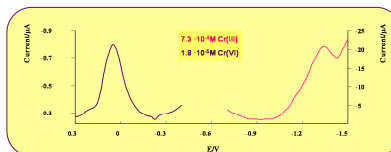
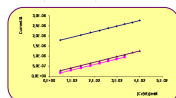
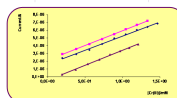


Electrochemical speciation of Chromium

Calibration

To carry out the speciation of chromium, calibration curves for Cr(III) and Cr(VI) were made. A least-squares regression (LMS) [2] was used to detect the existence of anomalous points.

	Calibration range	Sensitivity (A·M ⁻¹)	RSD (%)	Capability of detection
Cr(III)	1.9·10 ⁻⁴ M – 1.5·10 ⁻² M	3.77 ± 0.46	4	1.9·10 ⁻⁴ M
Cr(VI)	4.9·10 ⁻⁴ M – 4.0·10 ⁻² M	2.77 ± 0.17	1.5	4.9·10 ⁻⁴ M



Differential pulse voltammograms for Cr(VI) using AuNPs-SPCEs and for chromium(III) using Hg-SPCEs in acetic-acetate pH 4.

Analysis of Interferences

> Analysis of the possible effect of the presence of foreign ions in the solution was performed. The metallic ions analysed were Zn(II), Cd(II), Cu(II), Sn(II), Co(II), Pb(II), Fe(III), Ni(II), As(III), As(V), Sb(III) and Sb(V).

> The determination of Cr(VI) was affected by the addition of up to 10⁻⁴ M of Cu(II) and addition of up to 10⁻⁴ M of Fe(III).

> The determination of Cr(III) was affected by the addition of up to 10⁻⁴ M of Cu(II), addition of up to 10⁻⁴ M of Fe(III) and addition of up to 10⁻⁴ M of Cd(II).

References

- [1] J. Wang, J. Lu, B. Tian, C. Yamitzky, J. Electroanal. Chem. 361 (1993) 77.
 [2] Rousseeuw, P.J.; Leroy, A.M. Robust Regression and Outlier Detection; John Wiley and sons: New York, 1989.

Real Sample

The proposed method was used to determine the concentration of Cr(III) and Cr(VI) in a water sample obtained as residue of a tanning industry. The analysis was made by standard addition. These results were also checked using differential pulse adsorptive stripping voltammetry using pyrocatechol violet as complexing agent and multivariate calibration.

	Cr(III)	Cr(VI)	
Hg-SPCE	4.4·10 ⁻⁴ ± 5.6·10 ⁻⁴ M (n=3, n=0.05)	AuNPs-SPCE	1.1·10 ⁻⁴ ± 1.4·10 ⁻⁴ M (n=3, n=0.05)
Reference method	4.7·10 ⁻⁴ ± 6.3·10 ⁻⁴ M	Reference method	1.2·10 ⁻⁴ ± 1.3·10 ⁻⁴ M

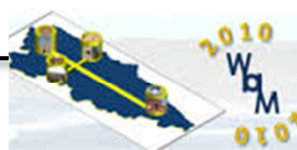
Acknowledgements

Authors would like to acknowledge funding via Junta de Castilla y León (GR177) and the Spanish Ministry of Science and Innovation (TEC2009-12029). A. Calvo-Pérez is funded by a Junta de Castilla y León and the European Social Found grant and M.A. Alonso-Lomillo is funded by a Ramón y Cajal fellowship from the Spanish Ministry of Science and Innovation and the European Social found.

II INTERNATIONAL WORKSHOP ON ANALYTICAL MINIATURIZATION

Oviedo (España)

7-8 de Junio de 2010



DETERMINACIÓN DE TIRAMINA EMPLEANDO UN BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO MODIFICADO CON NANOPARTÍCULAS DE ORO

Ana Calvo Pérez, Olga Domínguez Renedo, M. Asunción Alonso Lomillo and M. Julia Arcos Martínez.



UNIVERSIDAD DE BURGOS

DETERMINACIÓN DE TIRAMINA EMPLEANDO UN BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO MODIFICADO CON NANOPARTÍCULAS DE ORO

Ana Calvo-Pérez, Olga Domínguez-Renedo, M. Asunción Alonso-Lomillo y M. Julia Arcos-Martínez
Departamento de Química, Área de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Burgos, Plaza Misael Bañuelos s/n, E-09001 Burgos, España.
Teléfono: 947258818. Fax: 947258831. E-mail: anacp@ubu.es, olgado@ubu.es, malomillo@ubu.es, jarcos@ubu.es.

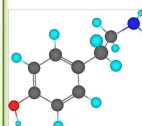
INTRODUCCIÓN

La tiramina (Tyr) es una amina biogénica que se obtiene como producto de la descarboxilación de la L-Tirosina por acción de la tirosina descarboxilasa. Se encuentra presente de forma natural en algunos alimentos fermentados, bebidas, carne, pescado y productos lácteos, pudiendo presentar riesgos toxicológicos y originar defectos organolépticos. Se la ha relacionado con algunas enfermedades generales como la migraña y la hipertensión, debido a su poder como vaso-activo. La determinación de esta sustancia es de gran interés para evaluar, a través de su concentración, el estado de conservación de diversos productos de interés alimentario.

Los métodos analíticos utilizados hasta el momento para su determinación se basan fundamentalmente en procedimientos cromatográficos, implicando tediosos labores de derivatización. Las técnicas electroquímicas son una clara alternativa para la determinación de estas moléculas teniendo en cuenta sus propiedades redox.

Un problema común en las técnicas electroquímicas que emplean electrodos sólidos convencionales es la falta de reproducibilidad de los resultados. Este problema se evita mediante el empleo de electrodos serigrafados. La modificación de estos dispositivos desechables con enzimas y/o nanomateriales aporta grandes ventajas en la investigación, como pueden ser el aumento de la selectividad y de la sensibilidad gracias al incremento de la reactividad y de la velocidad de transferencia electrónica [1].

En este trabajo se han desarrollado biosensores para la determinación selectiva de tiramina basados en la modificación de electrodos serigrafados de carbono (SPCEs) con nanopartículas de Au (AuNPs), superficie sobre la cual se inmoviliza posteriormente el enzima plásmo amino oxidasa (PAO), mediante entrecruzamiento, empleando glutaraldehído (GA) y seroalbúmina bovina (BSA).



PARTE EXPERIMENTAL

- Las medidas amperométricas se han llevado a cabo utilizando un potencióstato µAUTOLAB con GPES como software (Eco Chemie, Utrecht, Holanda).
- SPES se han producido en un DEK 248 utilizando pantallas de poliéster con diferentes diseños de plantilla.
- El electrodo de referencia se ha construido empleando una tinta basada en Ag, el contraelectrodo y el electrodo de trabajo con una tinta basada en C y las vías conductoras con una tinta basada en Ag.



MODIFICACIÓN DE ELECTRODOS

DEPOSICIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE Au

Las nanopartículas de Au se depositan electroquímicamente sobre la superficie del electrodo de trabajo empleando una disolución de HAuCl₄.

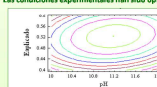
[HAuCl₄] = 0.1mM en H₂SO₄ 0.5M
E_{app} = 0.18 V
T_{dep} = 20 s

INMOVILIZACIÓN CON PAO

El enzima PAO es inmovilizado sobre la superficie del electrodo de trabajo o sobre las propias nanopartículas de Au mediante entrecruzamiento. Para ello se depositan 5µL de una mezcla a partes iguales de GA al 2,5% en H₂O, BSA al 3% en C₁₂H₂₅N₅O₂M a pH6 y PAO al 6% en el mismo tampón. Dejando actuar la mezcla a 4°C durante 90 minutos.

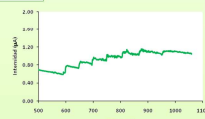
AuNPs-SPCEs

Las condiciones experimentales han sido optimizadas mediante la técnica del diseño de experimentos:

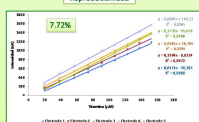


Explicado = 0,5V
C_{tiramina} 50mM (0.1M KCl) pH 11

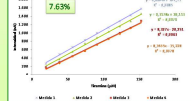
Se han registrado amperogramas como el siguiente, realizando adiciones de 100µL de Tyr 10⁻⁶M:



Reproducibilidad



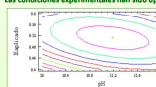
Repetibilidad



La capacidad de detección se ha calculado de acuerdo con ISO 11843-2, considerando n = 8, α = β = 5%
Capacidad de detección = 20 ± 0.17 µM

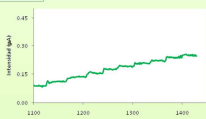
PAO-AuNPs-SPCEs

Las condiciones experimentales han sido optimizadas mediante la técnica del diseño de experimentos:

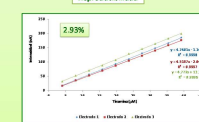


Explicado = 0,5V
C_{tiramina} 50mM (0.1M KCl) pH 11

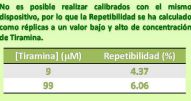
Se han registrado amperogramas como el siguiente, realizando adiciones de 10µL de Tyr 10⁻⁶M:



Reproducibilidad



Repetibilidad



No es posible realizar calibrados con el mismo dispositivo, por lo que la Repetibilidad se ha calculado como réplicas a un valor bajo y alto de concentración de Tiramina.

[Tiramina] (µM)	Repetibilidad (%)
9	4.37
99	6.06

La capacidad de detección se ha calculado de acuerdo con ISO 11843-2, considerando n = 8, α = β = 5%
Capacidad de detección = 2 ± 0.35µM

REFERENCIAS

[1] O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M. J. Arcos-Martínez, Talanta, 73 (2007) 202-219

Los autores agradecen la financiación obtenida a través de la Junta de Castilla y León (GR177) y del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) (TEC2009-12029 and CENIT-E 2009-INFINITEK). De igual manera M.A. Alonso Lomillo agradece la financiación del MICINN y del Fondo Social Europeo concedida a través del contrato Ramón y Cajal. Finalmente, Ana Calvo Pérez agradece su contrato de investigación a la Junta de Castilla y León.

XXXII REUNIÓN DEL GRUPO DE ELECTROQUÍMICA DE LA REAL SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA Y XIII ENCONTRO IBÉRICO DE ELECTROQUÍMICA

Murcia (España)

6-9 de Septiembre de 2011



BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO DESECHABLE PARA LA DETERMINACIÓN DE TIRAMINA EN MUESTRAS COMPLEJAS.

Ana Calvo Pérez, Olga Domínguez Renedo, M. Asunción Alonso Lomillo y M. Julia Arcos Martínez.

BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO DESECHABLE PARA LA DETERMINACIÓN DE TIRAMINA EN MUESTRAS COMPLEJAS

Ana Calvo Pérez, Olga Domínguez Renedo, M. Asunción Alonso Lomillo y M. Julia Arcos Martínez

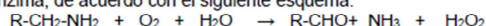
Área de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Burgos, Burgos, España.

La tiramina es una amina biógena que se obtiene como producto de descarboxilación de la L-tirosina por acción de la tirosina descarboxilasa. Se encuentra presente de forma natural en algunos alimentos fermentados, algunos tipos de vinos y en ciertos pescados, pudiendo presentar riesgos toxicológicos y originar defectos organolépticos. La determinación de la concentración de esta sustancia es de gran interés para evaluar el estado de conservación de diversos productos de interés alimentario.

Los métodos analíticos utilizados hasta el momento para la determinación de aminas biógenas se basan fundamentalmente en procedimientos cromatográficos, aunque la ausencia de cromóforos en estas moléculas implica tediosas labores de derivatización. Las técnicas electroquímicas pueden ser una alternativa interesante para la determinación de estas moléculas, teniendo en cuenta sus propiedades redox.

Un problema común en las técnicas electroquímicas que emplean electrodos sólidos convencionales es la falta de reproducibilidad de los resultados, lo que fundamentalmente se debe a la dificultad de tener superficies electródicas exactamente iguales para cada medida. Este problema se evita mediante el empleo de electrodos serigrafiados. La modificación de estos dispositivos desechables con enzimas y/o nanomateriales aporta grandes ventajas en la investigación, como pueden ser el aumento de la selectividad y de la sensibilidad gracias al incremento de la reactividad y de la velocidad de transferencia electrónica [1].

La determinación electroquímica de tiramina se puede llevar a cabo en un electrodo serigrafiado modificado con una enzima, de acuerdo con el siguiente esquema:



siendo el producto de la reacción, en este caso el H_2O_2 , quién proporciona la señal amperométrica a través de la cual se cuantifica la tiramina. Para determinar amperométricamente H_2O_2 es necesario emplear potenciales muy elevados. El uso de mediadores [2], como ferrocenometanol o tetratíofulvaleno, permite reducir este potencial de medida.

En este trabajo se han desarrollado biosensores para la determinación selectiva de tiramina basados en la modificación de electrodos serigrafiados de carbono, superficie sobre la cual se inmoviliza posteriormente el enzima plasma amino oxidasa (PAO), mediante entrecruzamiento, empleando glutaraldehído (GA) y seroalbúmina bovina (BSA). Incorporando ferrocenometanol como mediador, puede reducirse el potencial de medida hasta 0.26V. El dispositivo desarrollado permite llevar a cabo el análisis de tiramina con una capacidad de detección de 20 μM , una repetibilidad del 8.7% ($n=3$, $\alpha=0,05$) y una reproducibilidad del 8.4% ($n=5$, $\alpha=0,05$) en términos de desviación estándar residual de las pendientes de las curvas de calibración construidas en el rango de concentraciones de 20 a 164 μM . El biosensor desarrollado fue aplicado con éxito en la determinación del contenido en tiramina en una muestra de queso.

Los autores agradecen la financiación obtenida a través Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) (INNPACTO SERIBIO 2011-2014 y TEC2009-12029). De igual manera Ana Calvo Pérez agradece la financiación de la Junta de Castilla y León y del Fondo Social Europeo concedida a través de su contrato como personal investigador.

- [1] O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M. J. Arcos-Martínez, *Talanta*, 73 (2007) 202–219
[2] Biscay, J., Costa, E., González, M.B., Pingarrón, J.M., Costa, A., *Electroanalysis*. 23(1), (2010),209-214

XXXIII REUNIÓN DEL GRUPO DE ELECTROQUÍMICA DE LA REAL SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA

Madrid (España)

1-4 de Julio de 2012



BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO DESECHABLE PARA LA DETERMINACIÓN SELECTIVA DE TIRAMINA.

Ana Calvo Pérez, Olga Domínguez Renedo, M. Asunción Alonso Lomillo y M. Julia Arcos Martínez.

BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO DESECHABLE PARA LA DETERMINACIÓN SELECTIVA DE TIRAMINA

Ana Calvo Pérez, Olga Domínguez Renedo, M. Asunción Alonso Lomillo y M. Julia Arcos Martínez

Área de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Burgos, Pza. Misael Bañuelos s/n, 09001 Burgos, España. Tel., + 34 947258818.

e-mail: anacp@ubu.es

El control del estado de conservación de los alimentos es sin duda uno de los temas de gran interés en análisis químico. En este sentido, las aminas biógenas (BAs) son indicadores químicos de contaminación microbiana, frescura y calidad de los productos alimentarios. La tiramina (Tyr) es una de BAs con mayor implicación en procesos de contaminación de alimentos [1, 2]. Se encuentra presente de forma natural en alimentos fermentados, algunas variedades de vinos y en ciertos pescados. Entre los efectos nocivos de la Tyr en la salud humana se encuentra su capacidad para provocar cambios en las rutas metabólicas y subidas en la tensión arterial cuando está presente en grandes dosis en el organismo.

Entre los métodos analíticos más utilizados en la determinación de Tyr, se encuentran los basados en técnicas cromatográficas y electroforéticas, en los que son necesarias etapas de derivatización y tediosos pretratamientos de la muestra, así como, una instrumentación compleja, por lo que no resultan adecuadas para la realización de análisis rápidos e "in situ" [3]. Las técnicas electroquímicas se presentan como una clara alternativa debido a sus especiales características que incluyen una elevada sensibilidad y sencillez en la instrumentación utilizada, propiedades que pueden incluso mejorarse con el empleo de sensores y biosensores electroquímicos. Los biosensores se utilizan frecuentemente en el análisis selectivo de sustancias que requieren bajas capacidades de detección, con procesos simples y de bajo coste, permitiendo determinaciones de forma directa y a tiempo real. Dentro de los biosensores electroquímicos, los basados en electrodos serigrafados (SPEs) presentan ventajas añadidas debido a sus reducidas dimensiones y a su carácter desechable.

Generalmente la determinación de BAs con biosensores electroquímicos se ha llevado a cabo empleando enzimas amino oxidasas (AO) como elemento biológico [4, 5]. En este trabajo se plantea el uso del enzima horse radish peroxidasa (HRP), específica para reacciones con compuestos que contiene grupos hidroxilo (-OH) en su estructura. La presencia de un grupo (-OH) en la estructura de la Tyr a diferencia del resto de BAs, aporta una gran ventaja en cuanto a selectividad en el análisis, evitando interferencias analíticas de otras BAs, como son histamina, putrescina, cadaverina, triptamina, espermina y espermidina.

En este trabajo se han desarrollado dos biosensores para la determinación selectiva de Tyr basados en la modificación de electrodos serigrafados de carbono con el enzima HRP, comparando la inmovilización por entrecruzamiento con la incorporación del enzima en el proceso de serigrafado. El dispositivo desarrollado inmovilizando el enzima permite llevar a cabo el análisis de Tyr con una capacidad de detección de $0.2 \pm 0.01 \mu\text{M}$, una repetibilidad del 7.1% ($n=3$, $\alpha=0,05$) y una reproducibilidad del 6.8% ($n=3$, $\alpha=0,05$) en términos de desviación estándar residual de las pendientes de las curvas de calibración construidas en el rango de 0.2 a $21.4 \mu\text{M}$. Mientras que el dispositivo desarrollado serigrafando el enzima permite llevar a cabo el análisis de Tyr con una capacidad de detección de $2.1 \pm 0.2 \mu\text{M}$, una repetibilidad del 2.2% ($n=3$, $\alpha=0,05$) y una reproducibilidad del 3.4% ($n=3$, $\alpha=0,05$) en términos de desviación estándar residual de las pendientes de las curvas de calibración construidas en el rango de 2 a $456 \mu\text{M}$.

Se ha comprobado la inexistencia de interferencias de otras BAs para ambos biosensores desarrollados. El biosensor desarrollado serigrafando el enzima HRP fue aplicado con éxito en la determinación del contenido en Tyr en muestras de queso.

Los autores agradecen la financiación obtenida a través del Ministerio de Ciencia e innovación (MICINN) y del fondo europeo de desarrollo regional (FEDER)/INNFACTO SERIBIO 2011) y de la Junta de Castilla y León (BU212A12-2). Ana Calvo Pérez agradece la financiación de la Junta de Castilla y León y del Fondo Social Europeo concedida a través de su contrato como personal investigador.

[1] L. Bunková, F. Bunka, G. Mantlová, A. Cablová, I. Sedláček, P. Svec, V. Pachlová, S. Kráćmar, Food Microbiology, 27 880-888.

[2] D.M. Linares, M. Cruz Martín, V. Ladero, M.A. Alvarez, M. Fernandez, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 51 691-703.

[3] S. Hernandez-Cassou, J. Saurina, Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 879 1270-1281.

[4] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, P. Matos, M.J. Arcos-Martínez, Analytica Chimica Acta, 665 26-31.

[5] A. Calvo-Pérez, O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, Microchimica Acta, 180 253-259.

XXXIV REUNIÓN DEL GRUPO DE ELECTROQUÍMICA DE LA REAL SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA Y XV ENCONTRO IBÉRICO DE ELECTROQUÍMICA

Valencia (España)

15-17 de Julio de 2013



DETERMINATION OF METALS BASED ON ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS.

Olga Domínguez Renedo, M. Asunción Alonso Lomillo, Lorena del Torno Román, Ana Calvo Pérez y M. Julia Arcos Martínez.

DETERMINATION OF METALS BASED ON ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS

O. Domínguez*, M.A. Alonso, L. del Torno, A. Calvo, M.J. Arcos
Dpto. de Química, Universidad de Burgos, Plaza Misael Bañuelos s/n 09001 Burgos,
tfn: +34 947 258818; e-mail: olgado@ubu.es

Evento satélite de Nuevos Retos de la Electroquímica

Heavy metals are natural constituents of the earth's crust. They tend to accumulate in soils and sediments since they are very stable and cannot be degraded. Human activities have drastically altered the biochemical and geochemical cycles and balance of some heavy metals. The principal humanmade sources of heavy metals are industrial (mines, foundries and smelters) and diffuse sources (combustion byproducts, road-traffic). Moreover, relatively volatile heavy metals and those that become attached to air-borne particles can be widely dispersed throughout the atmosphere, often being deposited thousands of miles from the site of initial release. Many techniques have been developed for sensitive analyses of various heavy metal ions, including atomic absorption spectrophotometry, inductively coupled plasma mass spectrometry and X-ray fluorescence spectrophotometry. However, these methods generally require expensive instruments, complicated sample pretreatment, and are difficult in online monitoring applications [1]. Electrochemical analysis has long been recognized as a powerful technique for measuring trace metals. These kinds of techniques present some intrinsic advantageous features such as high sensitivity, good selectivity, inexpensive and portable instrumentation, and the ability to determine multielement accurately at trace and ultra-trace levels. Among them, electrochemical biosensors had been shown as suitable devices for the detection of different heavy metals with a high level of sensitivity and selectivity.

In this work is presented the analysis of different metals including Al(III), As(III), As(V), Cr(III), Cr(VI), Hg(II) and V(V) by means of amperometric enzyme-based biosensors. The developed biosensors are based on the enzymatic inhibition of acetylcholinesterase, acid phosphatase, alkaline phosphatase, α -chymotrypsin, tyrosinase and urease enzymes. Different immobilization processes have been used in the development of these biosensors being cross-linking one of the most utilized procedures, because it often allows the deposition of an elevated amount of enzyme on the electrode surface, which results in a higher sensitivity of the biosensor [2-6].

The advantages of replacing the classical electrodes by disposable screen-printed electrodes in the construction of the amperometric biosensors are also showed. They included the elimination of memory effects in the analysis of trace levels and their particular interest for in situ determination [3-6]. Moreover, the incorporation of metallic nanoparticles on the working electrode surface has led to the construction of more sensitive biosensors due to their important physical and electrical properties [3, 5, 6]. Finally it can be pointed out that the developed biosensors have showed good reproducibility and repeatability values being also successfully applied to the analysis of different heavy metals in real samples.

Authors would like to acknowledge funding via Junta de Castilla y León (BU212A12-2), Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (INNPACTO SERIBIO 2011-2014).

- [1] O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 43 (2013)1042-1073.
- [2] O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, *Anal. Chim. Acta* 521 (2004) 215-221.
- [3] O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, L. Ferreira-Gonçalves, M.J. Arcos- Martínez, *Talanta* 79 (2009) 1306-1310.
- [4] S. Sanllorente-Méndez, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, *Talanta* 93 (2009) 301-306.
- [5] M. Baqueiro-Quirós, O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos- Martínez, *Microchim. Acta* 179 (2012) 65-70
- [6] A.L. Alvarado-Gámez, M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos- Martínez, *J. Electroanal. Chem.* 693 (2013) 51-55.

XXXIV REUNIÓN BIENAL DE LA REAL SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA

Santander (España)

15-18 de Septiembre de 2013



SENSORES Y BIOSENSORES PARA LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS.

Ana Calvo, Wilder Henao, Begoña Molinero, Lorena del Torno, Patricia Barcenilla, Beatriz Elua, M. Asunción Alonso, Olga Domínguez, y M. Julia Arcos.

SENSORES Y BIOSENSORES PARA LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS

A. Calvo, W. Henao, B. Molinero, L. del Torno, P. Barcenilla, B. Elua, M.A. Alonso, O. Domínguez, M.J. Arcos
Dpto. de Química, Universidad de Burgos, Plaza Misael Bañuelos s/n 09001 Burgos,
tfn: +34 947 258818; e-mail: jarcos@ubu.es

Evento satélite de Nuevos Retos de la Electroquímica

Las aminas biogénas (BAs) son bases orgánicas de bajo peso molecular, sintetizadas y degradadas durante el metabolismo normal de los animales, plantas y microorganismos siendo, histamina (His), putrescina (Put), cadaverina (Cad), tiramina (Tyr), triptamina (Trypt), espermina (Spm) y espermidina (Spd) las BAs presentes frecuentemente en los alimentos. La formación de BAs puede ocurrir durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos, como resultado de la actividad bacteriológica. Existe evidencia de que una disminución en la calidad higiénica del producto corresponde a un aumento del contenido de BAs. Por esta razón, el control del contenido de BAs en alimentos y bebidas es cada vez más demandada por las comisiones de regulación (por ejemplo, Comisión reguladora (EC) 2073/2005) [1]. La concentración de BAs es mayor en los alimentos perecederos, especialmente si se fermentan y son ricos en aminoácidos, tales como, pescado, carne, zumo de fruta, vino, cerveza, cacao, leche y queso [2].

La determinación de BAs se ha llevado a cabo tradicionalmente por métodos cromatográficos y de fluorescencia [3,4], los cuales a menudo requieren pretratamientos laboriosos y tiempos de medida de hasta 2 horas, además de sistemas instrumentales de elevado coste. Las técnicas electroquímicas basadas en la utilización de electrodos serigrafiados suponen una clara alternativa frente a estos métodos. La fabricación de electrodos mediante técnicas de serigrafiado, posibilita la producción de un gran número de electrodos desechables a un coste extremadamente bajo y, sin embargo, altamente reproducibles y fiables. [5]. Éstos presentan además un gran número de posibilidades de modificación que aumentan considerablemente su aplicabilidad. La modificación de los electrodos serigrafiados puede realizarse variando la composición de las tintas de impresión por la adición de diferentes sustancias, como metales, enzimas, polímeros, agentes complejantes, etc. Dicha modificación puede también llevarse a cabo mediante el depósito de diversas sustancias sobre la superficie de los electrodos de trabajo, como películas de metales, polímeros, enzimas, etc. [5].

En este trabajo se han desarrollado diferentes métodos para la determinación de putrescina, tiramina, espermina y histamina mediante el empleo de biosensores basados en electrodos serigrafiados de carbono. En algunos casos, el electrodo fue modificado mediante la incorporación directa del tetratiofulvaleno (TTF), usado como un agente mediador, en la tinta de carbono para la impresión del electrodo de trabajo. Posteriormente se modificó la superficie de este electrodo por medio de la inmovilización por entrecruzamiento de enzimas como mono amino oxidasa (MAO), plasma amino oxidasa (PAO), putrescina oxidasa (PUO) entre otras. En estos casos, la detección amperométrica se ha realizado mediante la medición de la corriente anódica debida a la oxidación del mediador TTF al aplicar un potencial de medida de +250 mV. Los biosensores construidos mostraron una alta reproducibilidad presentando una desviación estándar relativa inferior al 10% (n=4) en la mayor parte de los casos. Finalmente, los biosensores se han aplicado con éxito a la determinación de aminas biogénas en productos alimentarios.

Los autores agradecen la financiación obtenida a través del Ministerio de Ciencia e innovación (MICINN) (INNACTO SERIBIO 20011-2014-I). De igual manera los autores agradecen la financiación a la Junta de Castilla BU212A12-2) y al fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

[1] Di Fusco, M. Federico, R. Boffi, A. y cols Anal Bional Chem, 401 (2011) 707-716

[2] Mureşan, L., Ronda, R., Frébort, I. y cols. Microchim Acta, 163 (2008) 219–225.

[3] Bao B., Yuwen L., Zheng X. Y., J. Mater. Chem., 20 (2010) 9628–9634

[4] Punakivi K., Smolander M., Talanta 68 (2006) 1040–1045

[5] Domínguez, O., Alonso, M. A., Arcos, J., Talanta, 73 (2007) 202-219.

XXXIV REUNIÓN BIENAL DE LA REAL SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA

Santander (España)

15-18 de Septiembre de 2013



ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AAS	Espectrofotometría de absorción atómica
Amp	Amperometría
AO	Amino oxidasa
AuNPs	Nanopartículas de oro
AuNPs-SPCEs	Electrodos serigrafiados de carbono modificados con nanopartículas de oro
BAs	Aminas biógenas
BSA	Serolbúmina bovina
Cad	Cadaverina
DAO	Diamino oxidasa
DPASV	Voltamperometría diferencial de impulsos de redisolución adsortiva
DPV	Voltamperometría diferencial de impulsos
E_{ap}	Potencial aplicado
ETAAS	Espectrometría de absorción atómica con cámara de grafito
FAAS	Espectrometría de absorción atómica de llama
GA	Glutaraldehído
GC	Cromatografía de gases
GOx	Glucosa oxidasa
Hg-SPCEs	Electrodos serigrafiados de carbono modificados con película de mercurio
His	Histamina
HMDE	Electrodo de gota colgante de mercurio
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HRP	Horseradish peroxidasa
HRP/SPCEs	Electrodos serigrafiados de carbono basados en el enzima horseradish peroxidasa
ICP-AES	Emisión atómica de plasma de acoplamiento inductivo
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo
iMAO	Inhibidores del enzima monoamino oxidasa

IPC	Plasma de acoplamiento inductivo
LC	Cromatografía líquida
LSV	Voltamperometría de barrido lineal
MAO	Monoamino oxidasa
MEKC	Cromatografía electrocinética micelar
MLC	Cromatografía líquida micelar
HOMeFc	Ferrocenometanol
PAO	Plasma amino oxidasa
PAO/SPCEs	Electrodos serigrafiados de carbono basados en el enzima plasma amino oxidasa
PUO	Putrescina oxidasa
Put	Putrescina
RSD	Desviación estándar relativa
SPAuEs	Electrodos serigrafiados de oro
SPCEs	Electrodos serigrafiados de carbono
SPC _{HRP} Es	Electrodos serigrafiados de carbono con enzima horseradish peroxidasa serigrafiado
SPC _{Pt} E	Electrodos serigrafiados de carbono platinizado
SPC _{TTF} E	Electrodos serigrafiados de carbono con tetratíafulvaleno serigrafiado
Spd	Espermidina
SPEs	Electrodos serigrafiados
Spm	Espermina
SWASV	Voltamperometría de onda cuadrada de redisolución anódica
SWV	Voltamperometría de onda cuadrada
TAO	Tiramina oxidasa
Tryp	Triptamina
TTF	Tetratíafulvaleno
Tyr	Tiramina
UHPLC	Cromatografía de ultra alta eficacia
UPLC	Cromatografía de ultra eficacia
UV-vis	Ultravioleta visible

