

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

Posgrado en Ingeniería Ambiental

Facultad de Ingeniería

**DETERMINACIÓN DE CLORPIRIFOS EN LECHE MEDIANTE EL USO DE
UN BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO.**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

**Que para obtener el título de:
MAGISTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL**

**PRESENTA:
Jacqueline Betancur Bustamante**

**Asesor:
Gustavo Antonio Peñuela Mesa
Coasesor:
Juan Bernardo Cano Quintero**

Medellín, septiembre 2017

Agradecimientos

Gracias al grupo GDCON y al grupo GIMEL de la Universidad de Antioquia por su incondicional apoyo técnico y profesional, a los profesores Juan Bernardo Cano, Gustavo Antonio Peñuela, Nelson Londoño por ser una guía durante el desarrollo de este trabajo y su aporte de conocimientos con migo, al fondo de presupuesto de la Universidad de Antioquia y gracias a cada una de las personas que hicieron parte de este camino, por brindarme conocimiento o apoyo moral en el momento oportuno.

Resumen

El clorpirifos es un insecticida comercial organofosforado, en Colombia su uso abarca diferentes cultivos de pastizales y sitios urbanos. El clorpirifos funciona como un inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa, tanto en insectos como en mamíferos, afectando directamente al sistema nervioso central. En los rebaños lecheros el uso inadecuado del clorpirifos puede producir leche con residuos de pesticidas. Según la Organización Mundial de la Salud, el límite de concentración permitido de clorpirifos en la leche de vaca es de 0,02 mg / L. Este trabajo explora el uso de un biosensor amperométrico enzimático como herramienta capaz de determinar la presencia de clorpirifos en la leche de vaca, trabajando en paralelo con la técnica analítica de cromatografía de gases. La enzima acetilcolinesterasa fue utilizada como elemento biológico e inmovilizada sobre electrodos de diferentes materiales de tipo "screen printed" a través del método de "cross linking". Se determinaron las constantes cinéticas de la enzima libre y de la enzima inmovilizada. Se desarrolló un prototipo que permite mediciones de Voltametría en sensor impreso, con características de bajo costo, portabilidad y fácil manejo, dicho prototipo fué utilizado para la cuantificación de la señal bioquímica producida en la reacción enzimática dada sobre el electrodo previamente inmovilizado y utilizada en las pruebas de inhibición y optimización del biosensor. La validación de la técnica para la detección de clorpirifos mediante cromatografía de gases arrojó como resultado que esta técnica analítica cumple los criterios de linealidad, precisión, exactitud y especificidad para la cuantificación de valores traza de 10 $\mu\text{g} / \text{L}$ a 100 $\mu\text{g} / \text{L}$ con la presencia de un efecto matriz. Se concluye que el biosensor puede servir como técnica cualitativa para la detección de plaguicidas en leche pero no cuantitativa, por lo que los biosensores pueden ser herramientas capaces de detectar la presencia de clorpirifos en leche en tiempo real, permitiendo rechazar en el mismo hato lechero, leches que tienen presencia de clorpirifos y para la cuantificación se puede utilizar una técnica más robusta como la cromatografía de gases.

Tabla de contenido

Capítulo 1 Introducción e información general	9
Impacto de los pesticidas organofosforados.	11
Impacto Ambiental.....	11
Impacto social	11
Toxicología de los pesticidas.	12
Capítulo 2.....	14
Objetivos del trabajo	14
Objetivo general.....	14
Objetivos específicos	14
Capítulo 3 Marco teórico.....	15
Técnicas para la detección y cuantificación de pesticidas organofosforados	15
Técnicas cromatográficas.....	15
Biosensores enzimáticos basados en Colinesterasas.....	16
Primera generación	16
Segunda Generación	17
Técnicas de inmovilización enzimática para los biosensores.	18
Adsorción física	18
Atrapamiento físico.....	18
Acoplamiento covalente o cross linking	18
Monocapa autoensamblada (SAM).....	19
Inmovilización orientada	19
Conceptos electroquímicos	19
Electrodos: tipos y materiales	19
Voltametría.	21
Voltametría cíclica	21
Descripción del prototipo de instrumento para medidas amperométricas	21
Capítulo 4.....	23
Desarrollo de los objetivos específicos.....	23
Evaluar la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa como enzima libre.	23
Preparación de soluciones.....	23
Lectura de la Actividad enzimática.....	23
Determinación de las constantes cinéticas	24
Resultados y discusión.....	25
Inmovilizar el elemento biológico en la superficie del transductor del biosensor.	28
Preparación de soluciones.....	28
Aplicación de la inmovilización.	29
Resultados y discusión.....	29
Evaluar el desempeño del biosensor en la medición del clorpirifos usando cromatografía de gases.....	35
Pretratamiento de la muestra.....	35
Resultados y discusión.....	36
Optimizar parámetros de operación en el biosensor	40

Selección de la concentración óptima del sustrato.	40
Ensayos de inhibición del pesticida en agua desionizada.	43
Migración del pesticida en la matriz de leche.....	44
Evaluación del clorpirifos en leche cruda.....	44
Evaluación del clorpirifos en leche descremada.	46
Conclusiones	48
Recomendaciones	49
Lista de Referencias.....	49

Lista de tablas

Tabla 1. Técnicas cromatográficas para la cuantificación de pesticidas OP en leche y derivados lácteos mediante extracción con disolvente	7
Tabla 2. Técnicas cromatográficas para la cuantificación de pesticidas OP en leche y derivados lácteos mediante extracción en fase sólida (EFS)	8
Tabla 3. Técnicas cromatográficas para la cuantificación de pesticidas OP en leche y derivados lácteos mediante extracción por dispersión de matriz en fase sólida (DMFS)	8
Tabla 4. Datos obtenidos para el cálculo de $V_{m\acute{a}x}$ y k_m	18
Tabla 5. Datos obtenidos para el cálculo de $V_{m\acute{a}x(i)}$ y $k_m(i)$	19
Tabla 6. Tratamientos aplicados para la inmovilización enzimática	21
Tabla 7. Resumen de los resultados obtenidos para los cuatro tratamientos aplicados.....	24
Tabla 8. Resumen de los resultados positivos de la evaluación de diferentes tratamientos de inmovilización en diferentes tipos de electrodos	27
Tabla 9. Resultados promedio para los ensayos de Linealidad	29
Tabla 10. Resumen de los datos obtenidos para los ensayos de precisión, exactitud y especificidad	30
Tabla 11. Resumen de los resultados obtenidos para la curva de sustrato en el electrodo de carbono-azul Prusia y carbono-ferrocianuro	34
Tabla 12. Resultados del efecto del clorpirifos en la matriz de agua	35
Tabla 13. Resultados del efecto del clorpirifos en la matriz de leche cruda	37
Tabla 14. Resultados del efecto del clorpirifos en la matriz de leche descremada	39

Lista de figuras

Figura 1. Procesamiento anual de leche en Colombia	10
Figura 2. Producción de leche anual en los 5 departamentos más destacados del país	10
Figura 3. Izquierda, modelo 3D del prototipo desarrollado con sus principales componentes. Derecha modelo real del prototipo desarrollado	22
Figura 4. Representación de Linewaver- Bur	23
Figura 5. Actividad enzimática de la acetilcolinesterasa a diferentes concentraciones de sustrato.	24
Figura 6. Representación de Linewaver- Burk para la determinación de las constantes cinéticas de la AChE.	25
Figura 7. Representación de Linewaver- Burk para la determinación de las constantes cinéticas de la inhibición de AChE	27
Figura 8. Voltametría cíclica para el tratamiento 1 en cada uno de los electrodos evaluados	30
Figura 9. Voltametría cíclica para el tratamiento 2 en cada uno de los electrodos evaluados.	31
Figura 10. Voltametría cíclica para el tratamiento 3 en cada uno de los electrodos evaluados	31
Figura 11. Voltametría cíclica para el tratamiento 4 en cada uno de los electrodos evaluados	31
Figura 12. Gráfico de cajas y bigotes para los experimentos realizados con los de carbono, ferrocianuro y azul de Prusia	33
Figura 13. Blanco para los electrodos que presentaron actividad enzimática.....	34
Figura 14. Curvas de calibración para el clorpirifos en matriz de leche.....	37
Figura 15. Comparación entre las pendientes de las curvas de calibración en solvente y en matriz	39
Figura 16. Voltametría cíclica para la curva del sustrato.....	41
Figura 17. Efecto del clorpirifos en solución acuosa	43
Figura 18. Efecto del clorpirifos en la matriz de leche cruda	45

Figura 19. Efecto del clorpirifos en la matriz de leche descremada47

Capítulo 1

Introducción e información general

El incremento poblacional que se viene dando de forma exponencial a nivel mundial, ha provocado una mayor demanda de los productos alimenticios, principalmente en cereales como el arroz, maíz y trigo (March, 2014). En países tercermundistas como Colombia dicha demanda de productos alimenticios ha sido más notoria, y se consideran como productos básicos de la canasta familiar. En el periodo de tiempo entre 1985 y 2005 la población colombiana tuvo un incremento de 39.27%, pasando de 30.794.425 a 42.888.592 habitantes, y se proyecta que para el año 2020 la población del país habrá alcanzado un total de 50.912.429 (DANE, 2012).

Con el fin de garantizar la producción agrícola y proteger a la población de hambrunas se ha empleado los plaguicidas o también nombrados pesticidas, cuya difusión masiva comenzó después de la segunda Guerra Mundial (Waterfield y Zilberman, 2012) y se acentuó en los años '60 con la llamada “revolución verde” (Brodesser et al., 2006; Oerke, 2006). La revolución verde promovió e incentivó el uso de nuevos fertilizantes, plaguicidas y tecnologías (tractores y sistemas de riego) para aumentar marcadamente el porcentaje de cosechas que llegaban a término para ser consumidas.

Los plaguicidas fueron introducidos al mercado inicialmente para el control de plagas en la agricultura, pero su uso también se ha extendido al control de plagas que afectan de manera directa al ser humano, por tal motivo, también son empleados en el hogar, en zonas recreativas y en la construcción (Aktar, Sengupta y Howdhury, 2009; Whitford et al., 2009). En un trabajo presentado por Cooper y Dobson (2009) se mencionan 26 beneficios primarios de los plaguicidas, que van desde la protección del césped, rendimiento y mejor calidad de las cosechas hasta la protección de vidas humanas, y 36 beneficios secundarios que son los menos inmediatos o son las consecuencias a largo plazo, que van desde la salud de la población, hasta la conservación de la biodiversidad y el movimiento económico de un país.

Históricamente se ha reportado a nivel mundial a los pesticidas organofosforados como uno de los más usados por su amplio espectro de acción, aunque algunos países han disminuido su uso e implementado medidas menos perjudiciales para la salud humana; en países de renta media como Colombia, Ecuador, Sudafrica y otros, aún se usan en porcentajes superiores al 60% (Schreinemachers y Tipraqsa, 2012). En Colombia, el Clorpirifos es un insecticida de alto nivel comercial, su uso abarca diferentes cultivos (papa, tomate, maíz, arroz, sorgo, frutas y hortalizas, algodón, etc.) potreros y sitios urbanos (ICA, 2016). El clorpirifos actúa como un inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa lo que produce acumulación del neurotransmisor acetilcolina en las sinapsis mediadas por este, tanto en los insectos como en los mamíferos, afectando directamente el sistema nervioso central (Rodríguez, Carvajal, Peñuela, 2013). La exposición de los animales al clorpirifos se presenta mayormente al fumar los pastos,

quedando residuos del plaguicida en las plantas y en el suelo, de donde puede ingresar a los animales por la boca, los pulmones y la piel (Ferri et al., 2014). Después de ser bebido o ingerido, pasa rápidamente de los intestinos al torrente sanguíneo, el cual lo distribuye al resto del cuerpo (Rodríguez, Carvajal, Peñuela, 2013). En rebaños lecheros el mal uso del clorpirifos puede conducir a la producción de leche con residuos del plaguicida (Morales et al., 2010).

Considerando que Colombia es un país altamente lechero, cuya producción en el año 2015 fue de aproximadamente tres mil doscientos ochenta y seis millones (3,286 millones) de litros reportados bajo estándares legales (Figura 1), siendo Antioquia el departamento Pionero de producción de leche en el país (Figura 2) (Asoleche, 2017), y que el clorpirifos es ampliamente empleado para fumigar los pastos usados para la ganadería, este pesticida debe ser monitoreado en la leche para garantizar al consumidor un producto inocuo para la salud de las personas. Según la organización mundial de la salud (OMS) la concentración límite permitida de clorpirifos en leche de vaca para no afectar la salud humana es de 0.02mg/L (Food Standars FAO/WHO, 2013).

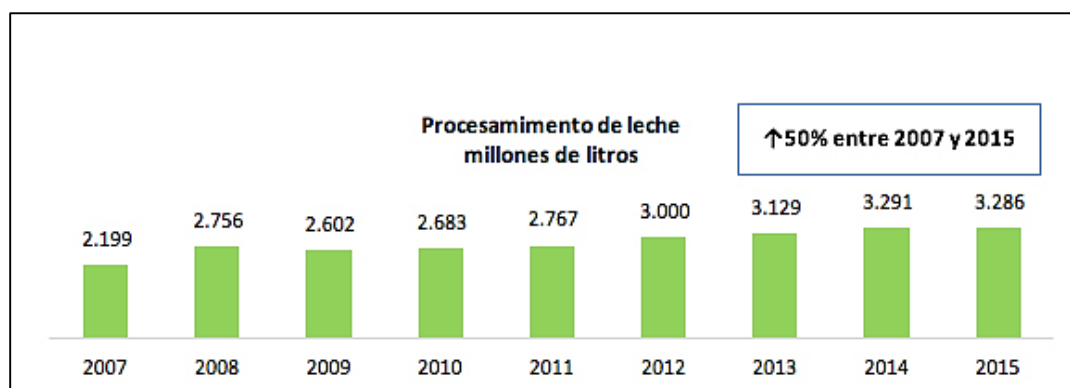


Figura 1. Procesamiento anual de leche en Colombia

Fuente: USP-Ministerio de agricultura

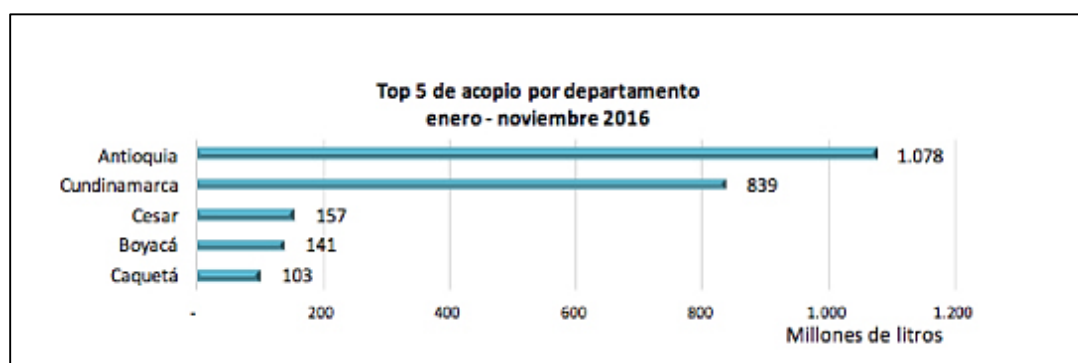


Figura 2. Producción de leche anual en los 5 departamentos más destacados del país.

Fuente: USP-Ministerio de agricultura

Las técnicas más utilizadas para la detección y cuantificación del clorpirifos son la cromatografía líquida de alta eficiencia y la cromatografía de gases. Estas técnicas de

análisis cualitativo y cuantitativo se usan a nivel de laboratorio, y requieren de procedimientos con largos tiempos de preparación de las muestras. Estas técnicas, son inviables para ser usadas para detectar presencia de clorpirifos en el campo donde se tiene el ganado. Por tal razón se ha potencializado las investigaciones en el uso de biosensores como herramientas de análisis capaces de detectar la presencia de clorpirifos en leches en tiempo real, lo que es una gran ventaja para la industria lechera, ya que permite rechazar en el mismo hato lechero, leches que tengan presencia de clorpirifos.

Impacto de los pesticidas organofosforados.

Impacto Ambiental

Los plaguicidas son sustancias contaminantes de alta toxicidad, persistencia y bioacumulación. Algunos son resistentes a la degradación biológica, acumulándose en el ambiente, y más aún si la dosis adecuada y los tiempos recomendados de aplicación no se respetan (CORPOICA, 2007). Los plaguicidas también pueden causar degradación al suelo, algunos estudios revelan que la diversidad de las especies (flora y la fauna) existente en él es reducida (González, 2004). Así mismo los pesticidas pueden provocar la muerte de peces, anfibios, fauna silvestre y animales polinizadores (March, 2014).

Impacto social

Anualmente se reportan en el mundo un número aproximado de un millón de personas intoxicadas accidentalmente por causa de pesticidas, de las cuales aproximadamente 200,000 terminan en la muerte (Fernández, Mancipe y Fernandez, 2010). Muchas otras muertes a causa de intoxicación por pesticidas no se registran en los sistemas de Salud pública ya que se le atribuye a otras causas. El desconocimiento de los síntomas o los efectos crónicos que pueden derivar en enfermedades severas como distintos tipos de cáncer, hacen que la causa final de la enfermedad muchas veces no sea atribuida a los pesticidas, debido a que una persona durante su vida es sometida a diversos agentes carcinógenos (March, 2014), en consecuencia el número real de muertes a causa de intoxicaciones por pesticidas puede ser incluso más elevado.

Las intoxicaciones por pesticidas OP son más comunes de lo que se piensa, múltiples estudios revelan enfermedades asociadas a esta causa. Estos pesticidas producen inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) dando como resultado una acumulación del neurotransmisor acetilcolina (ACh) provocando una sobre estimulación de los nervios y músculos en el sistema nervioso central periférico y en el sistema nervioso autónomo (Sánchez, Colomina y Herrero, 2015). Los síntomas asociados son: disfunción autónoma, movimientos involuntarios, fasciculación muscular, disminución de la actividad motora y finalmente depresión respiratoria que puede ocasionar la muerte (Pope, 2006). Otras investigaciones relacionan enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer's, el Parkinson's y la esclerosis lateral amiotrófica con la exposición a pesticidas

organofosforados y las anomalías que estos ocasionan en el funcionamiento del sistema colinérgico (Sánchez., Colomina y Herrero, 2015; Ridge, Ebbert, y Kauwe, 2013; Freire y Koifman, 2012; Moretto y Colosio, 2013; Swinnen y Robberecht, 2014) También hay estudios sobre alteraciones del sistema endocrino, en las cuales los pesticidas organofosforados como el clorpirifos causan la multiplicación de células de cáncer mamario (Ventura et al., 2012). En el trabajo realizado por Watts (2012) se mencionan una serie de estudios realizados en los Estados Unidos de donde se concluye que la exposición al clorpirifos aumenta los riesgos de desarrollar varios tipos de cáncer: “Lee et al (2004), en un estudio de 54.383 aplicadores de plaguicidas varones, con un total de 2,070 neoplasmas malignos, encontraron riesgo de aumento de cáncer de pulmón, riñón y cerebro aunque sólo el de pulmón fue estadísticamente significativo, con un riesgo relativo (tasa de riesgo) de 2.18 por días de exposición, comparado con individuos no expuestos. Las personas que estaban en las más altas categorías de días de exposición intensa pero no durante toda la vida, tenían aumentos estadísticamente significativos en las tasas de cánceres linfomatomopoyético, leucemia y cerebro, en comparación con individuos no expuestos. Otra investigación más amplia de aplicadores varones de plaguicidas en Estados Unidos (56.813) encontró un aumento de 2.7 veces del riesgo de cáncer rectal en la categoría de la más alta exposición (Lee et al., 2007). Alavanja et al (2003) encontraron un aumento del riesgo (OR = 1.65) de cáncer de próstata entre los varones aplicadores expuestos a clorpirifos, pero solo en aquellos con una historia familiar de cáncer de próstata. Engel et al (2005) encontraron un riesgo levemente aumentado (OR = 1.4) de cáncer de mamas entre las esposas de los aplicadores de plaguicidas que habían usado clorpirifos, y entre aquellas que no lo habían usado, pero sus esposos sí lo habían usado (OR = 1.3).” En resumen hay una cantidad importante de investigaciones sobre los efectos de la exposición al clorpirifos que indican una asociación con cáncer, especialmente de pulmón y cáncer rectal. Relaciones más débiles se han encontrado con el linfoma no-Hodgkin, leucemia y cáncer al cerebro y la próstata.

Toxicología de los pesticidas.

Tanto el clorpirifos como el resto de pesticidas OP pueden introducirse al organismo por inhalación, ingestión o contacto directo, debido a su alta liposolubilidad, lo que permite pasar las barreras biológicas más fácilmente, adicional su característica de volatilidad, facilita la inhalación (Lotti, 1995). Una vez absorbidos y distribuidos en el organismo, los pesticidas OP son metabolizados principalmente en el hígado por una serie de enzimas (esterasas, transferasas, enzimas microsomales). La serie de transformaciones ocasionada por la acción enzimática tienden a aumentar la solubilidad del pesticida y por consiguiente facilita su excreción a nivel renal (Eddleston y Hillips, 2004).

La toxicidad de los OP se desarrolla a través de la fosforilación de la enzima acetilcolinesterasa. Los pesticidas OP reaccionan con el sitio activo de la enzima, dándose una interacción entre el grupo hidroxilo de la serina del sitio activo de la enzima y el grupo fosfato del pesticida, produciéndose un intermediario de la enzima fosforilada, que bloquea la actividad enzimática (Lin et al., 2005). Si dicha unión no se rompe durante el tratamiento,

la inhibición se hace irreversible, por tanto la enzima queda inhabilitada para su función normal. La inhibición enzimática permite la acumulación de acetilcolina en las uniones colinérgicas neuroefectoras (efectos muscarínicos), en las uniones mioneurales del esqueleto y los ganglios autónomos (efectos nicotínicos) y en el sistema nervioso central (Eddleston y Hillips, 2004; Lin et al., 2005).

La acetilcolina es un neurotransmisor que interactúa con dos tipos de receptores postsinápticos (nicotínicos y muscarínicos), y es responsable de la transmisión fisiológica del impulso nervioso de:

- a. Las fibras colinérgicas postganglionares simpáticas y parasimpáticas a las células efectoras (receptores muscarínicos).
- b. Las neuronas preganglionares a las postganglionares en los sistemas parasimpáticos y simpáticos (receptores nicotínicos).
- c. Los nervios motores al músculo esquelético (receptores nicotínicos).
- d. Algunas terminaciones nerviosas en el sistema nervioso central.

Una vez es liberada y ha interactuado con su receptor, la acetilcolina es destruida mediante la acción de la enzima acetilcolinesterasa, la cual reacciona con el neurotransmisor hidrolizándolo y produciendo colina y ácido acético, que son requeridos por el metabolismo para llevarse a cabo las funciones anteriormente mencionadas (Guyton y Hall, 2006).

Este trabajo explora el uso de un biosensor enzimático amperométrico, como una herramienta de análisis capaz de determinar la concentración de clorpirifos en leche cruda de vaca, comparado en paralelo con resultados obtenidos con la técnica de cromatografía de gases. Se utilizó como elemento biológico la enzima acetilcolinesterasa, la cual fue inmovilizada sobre electrodos de diferente material de tipo “screen printed” mediante el método de “cross linking”. El trabajo abarcó la determinación de constantes cinéticas de la enzima libre y la enzima inmovilizada tales como V_{max} y K_m . Diferentes materiales de electrodos de trabajo fueron evaluados, incluyendo electrodos con potencializadores de la señal; medida en este caso como corriente eléctrica. Se realizó la validación de la técnica para la cuantificación de clorpirifos mediante cromatografía de gases y varios parámetros de optimización fueron valorados para el uso del biosensor.

Capítulo 2

Objetivos del trabajo

Objetivo general

Cuantificar la concentración del pesticida clorpirifos en una matriz de leche mediante el uso de un biosensor enzimático amperométrico.

Objetivos específicos

- Evaluar la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa como enzima libre.
- Inmovilizar el elemento biológico en la superficie del transductor del biosensor, evaluando diferentes técnicas de inmovilización y diferentes tipos de electrodos.
- Evaluar el desempeño del biosensor en la medición del clorpirifos usando una técnica sensible como la cromatografía de gases, realizando pruebas de laboratorio y monitoreos de contaminación en hatos lecheros.
- Optimizar parámetros de operación en el biosensor para cuantificar concentraciones del clorpirifos en el orden de ppb en leches.

Capítulo 3

Marco teórico

Técnicas para la detección y cuantificación de pesticidas organofosforados

Técnicas cromatográficas

El uso de una técnica cromatográfica como método de cuantificación o detección de pesticidas organofosforados requiere de preparación de la muestra (alimento para este caso de interés) y extracción del analito. La elección de estos dos procesos está ligados a la composición y propiedades de los alimentos. La cromatografía gaseosa es la técnica de primera elección para la determinación de pesticidas OP, ya que la mayoría de estos compuestos son muy volátiles y termoestables. Los detectores específicos acoplados a esta técnica han permitido desarrollar métodos de análisis trazas y ultratrazas (Font, Picó y Juan, 2003)

La cromatografía líquida para la detección de pesticidas OP utiliza generalmente un detector UV, lo que da poca selectividad al método ya que muchas moléculas absorben la luz a una longitud de onda igual que la de los pesticidas OP (Ahmed, 2000). Otros autores también han utilizado detectores de fluorescencia pero debido a que los pesticidas OP no son compuestos fluorescentes se precisa de reacciones de derivatización (Hogendoorn, 1999; Fillion, Sauvé y Selwyn, 2000). Estudios más recientes han detectado pesticidas organofosforados mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, donde la extracción del analito (en una matriz de sangre) fue realizada mediante extracción en fase sólida (Choi et al., 2006).

A continuación en las tablas 1, 2 y 3 se presentan las técnicas cromatográficas más utilizadas según la técnica de extracción para la cuantificación de pesticidas organofosforados en leche.

Tabla 1. Técnicas cromatográficas para la cuantificación de pesticidas OP en leche y derivados lácteos mediante extracción con disolvente.

Extracción	Purificación	Determinación	Referencia
Acetato de etilo/sulfato FS (C18/aminopropilo y acetato de etilo) sódico/etanol	FS (C18/aminopropilo y acetato de etilo)	CG-DFLL CG-EM	Bennett, Chung y Lee (1997)
Diclorometano/acetona/ FS (C18 y acetoneitrilo) acetoneitrilo	FS (C18 y acetoneitrilo)	CG-DFLL	Ronald y Pawloski (1997)
Acetoneitrilo/clorhídrico/ FS (Florisil y acetoneitrilo) sulfato sódico	FS (Florisil y acetoneitrilo)	CL-UV	Ahmed (2000)

GC Cromatografía gaseosa; DFLL: detector de fotometría de llama; EM: espectrometría de masas

CL: cromatografía líquida; UV: Luz ultravioleta visible

Tabla 2. Técnicas cromatográficas para la cuantificación de pesticidas OP en leche y derivados lácteos mediante extracción en fase sólida (EFS)

Preparación de la muestra	Extracción	Determinación	Referencia
Adición de acetonitrilo/metanol/acetona y centrifugar. C18 /Carbón y acetonitrilo/ Adicionar 50 ml de agua a una alícuota de 15 ml	C18/Carbón y acetonitrilo/acetona/metanol	CG-DCE CG-DFLL	Schenck y Casanova (1999)
Adición de acetonitrilo/etanol y homogeneizar	Chem Elut CE 1005 y éter de petróleo/ acetonitrilo/ etanol	CG-DFLL	di Muccio et al. (1996)

DCE: detector de captura de electrones

Tabla 3. Técnicas cromatográficas para la cuantificación de pesticidas OP en leche y derivados lácteos mediante extracción por dispersión de matriz en fase sólida (DMFS).

Dispersión	Purificación y elución	Determinación	Referencia
C18/acetonitrilo	Acetonitrilo Purificar: Florisil	CG-DFLL CG-DCE	Schenck y Wagner (1995)

Biosensores enzimáticos basados en Colinesterasas

Para la fabricación de biosensores han sido usados dos tipos de Colinesterasas: La acetilcolinesterasa (AChE) y la butirilcolinesterasa (BuChE), la primera mucho más usada que la segunda (Andreescu y Marty, 2006). Estructuralmente ambas biomoléculas son similares, la diferencia más característica se encuentra en el sustrato que hidrolizan, de este modo BuChE hidroliza butirilcolina y AChE hidroliza acetilcolina (Hosea, Berman, y Taylor, 1995). Además de los sustratos naturales, las colinesterasas son capaces de hidrolizar ésteres de tiocolina tales como: acetiltiocolina, butiriltiocolina, propioniltiocolina, acetil- β -metiltio-colina, de las cuales las más usadas para el diseño de biosensores han sido la butiriltiocolina y la acetiltiocolina (Hosea, Berman, y Taylor, 1995). Según el trabajo presentado por Pohanka, Musilek y Kuca (2009), el primer biosensor enzimático basado en colinesterasa se reportó en 1980, cuya enzima usada fue la butirilcolinesterasa. Luego de esto se ha desarrollado lo que se conoce como las generaciones de biosensores basados en colinesterasa.

Primera generación

a. Biosensor amperométrico bi-enzimático.

Representada por un biosensor amperométrico bi-enzimático, cuyas enzimas usadas fueron la colinesterasa y la colina oxidasa. En este sistema la colinesterasa hidroliza el sustrato natural (acetilcolina para AChE y butirilcolina para BuChE) a colina y acetato. La Colina no es electroquímicamente activa, por tal motivo, la segunda enzima colina oxidasa es usada para producir peróxido de hidrogeno que puede ser amperométricamente detectado a aproximadamente +650mV. Esta detección indirecta de la actividad de la colinesterasa implica que el sensor sea susceptible a interferencias de otras especies electroactivas presentes en el medio de reacción (Lin, Lu y Wang, 2004). Ambas enzimas son inmovilizadas sobre el electrodo de trabajo en igual o diferente matriz de inmovilización (Cremisini et al., 1995; Marty, Sode y Karube, 1992; Rouillon, Mionetto y Marty, 1992) o una puede ser inmovilizada y la otra adicionada en solución (Bernabei et al., 1991; Paleschi et al., 1992).

b. Biosensor potenciométrico mono-enzimático

La detección potenciométrica de la actividad de la enzima AChE se basa en la medida del cambio de pH y/o en el potencial redox en la capa de la enzima. El cambio de pH se debe a la producción de ácido acético por la hidrólisis de la acetilcolina llevado a cabo por la actividad enzimática (Andreescu y Marty, 2006). En los primeros biosensores potenciométricos construidos, la enzima fue inmovilizada sobre el electrodo de trabajo (medidor de pH) mediante atrapamiento físico (Kumaran y Morita, 1995; Ghindilis et al., 1996). Luego se desarrollaron sensores para la medición de pH como transductores de ion-selectivo (Ghindilis et al., 1996; Imato y Ishibashi, 1995) o sensores potenciométricos luz-direccionable (Fernando et al., 1993) conocidos como ISFET y LAPS.

Segunda Generación

a. Biosensores de colinesterasa mono-enzimáticos

Se utilizan sustratos no naturales como acetiltiocolina para la AChE y butiriltiocolina para la BuChE. Este sistema está basado en la detección amperométrica directa de tiocolina, producto de la reacción catalizada por la enzima. El uso de una sola enzima simplifica el diseño del sensor y la detección potenciométrica ocurre a +410mV (Andreescu y Marty, 2006). En el electrodo de trabajo se utilizan mediadores electrónicos para determinar la actividad de la enzima mediante el potencial de oxidación del mediador. Se conoce que los sensores con mediadores son menos susceptibles a compuestos que pueden actuar como interferencias debido a su bajo voltaje utilizado (Andreescu y Marty, 2006). Los mediadores son generalmente inmovilizados sobre la superficie del electrodo de trabajo. Dicho proceso puede llevarse a cabo en la misma matriz de inmovilización de la enzima o en otra separada (Nunes et al., 1999). La enzima es inmovilizada en el electrodo de trabajo mediante la técnica de entrecruzamiento o cross-linking mediante el uso de

reactivos bifuncionales como el glutaraldehído (Hart, Collier y Janssen, 1997; Scouten, Luong y Brown, 1995).

Técnicas de inmovilización enzimática para los biosensores.

Según lo descrito en la literatura, la inmovilización de la enzima sobre el electrodo de trabajo o también llamado transductor es el paso más importante en el desarrollo de un biosensor enzimático. Las interacciones que ocurren entre la enzima y el material del electrodo son indispensables para el biosensor en términos de sensibilidad, estabilidad, tiempo de respuesta y reproducibilidad.

Existe una gran variedad de métodos mediante los cuales la enzima puede ser inmovilizada sobre el transductor.

Adsorción física

Consiste en la deposición sencilla de la enzima sobre el material del electrodo unida a este mediante fuerzas débiles, tales como Van der Waals e interacciones electrostáticas. Dentro de las ventajas de esta técnica se resalta que es simple y barata, no hay daño a la enzima, no hay cambio químico del soporte y es reversible para permitir la regeneración de la enzima libre. Las desventajas se asocian a que se puede presentar fuga de la enzima, un tiempo de respuesta corto, los biosensores generalmente sufren de una pobre estabilidad operacional y de almacenamiento, sensibilidad a los cambios de pH, temperatura y fuerza iónica (Bonnet, Andreescu, Marty, 2003).

Atrapamiento físico

La inmovilización se realiza mediante el atrapamiento de la enzima en una matriz constituida por un gel sólido, polímero o membrana. Como ventajas de la técnica se tiene que el procedimiento se realiza en una etapa a temperatura ambiente, no hay daños a la enzima, la inmovilización es simple y económica, no se presenta ningún cambio químico del soporte. Dentro de las desventajas se encuentra fuga de la enzima, inmovilización inestable, gran variedad y número de polímeros biocompatibles, problemas de reproducibilidad y finalmente se puede encontrar dificultades con la difusión del sustrato debido al tamaño de poro (Andreescu, Barthelmebs, Barthelmebs, 2002 ; Andreescu et al., 2002; Sotiropoulou, Chaniotakis, 2005).

Acoplamiento covalente o cross linking

Este es el procedimiento más utilizado para la inmovilización de la colinesterasa. AChE, uniéndose covalentemente a las superficies de un transductor. Típicamente, el procedimiento implica la modificación del transductor con un agente de reticulación bifuncional tal como glutaraldehído, carbodiimida / succinimida o

aminopropyltriethoxysilanes. Esta técnica presenta ausencia de barreras de difusión, tiempo de respuesta corto, ninguna fuga de la enzima, y una amplia gama de opciones para la selección de material de soporte (haciendo el método flexible con propiedades químicas y físicas específicas) (Skladal, 1996; Skladal, Fiala, Krejci, 1996; Lee et al., 2002; Li et al., 1999). Para este tipo de inmovilización se requiere alta cantidad de enzima, además se puede presentar una posible desnaturalización y los procedimientos suelen ser costosos y complicados (Upadhyay et al., 2009)

Monocapa autoensamblada (SAM)

Es una capa organizada de moléculas anfifílicas en el que un extremo de la molécula muestra una actividad específica reversible por el sustrato. Este tipo de inmovilización se usa cuando la superficie del transductor está hecha de metal (particularmente oro). Este método garantiza la orientación y el control espacial de las enzimas en el proceso de inmovilización y la ausencia de barreras de difusión, pero el posible ensuciamiento del electrodo y la estratificación reproducible de biomoléculas sigue siendo una limitación importante (Wink, Van Zuilen, Bult, Bennekom, 1997; Gooding, Hibbert, 1999)

Inmovilización orientada

La mayor limitación en la inmovilización de enzimas es asegurar el control espacial de la biomolécula y minimizar la pérdida de actividad enzimática durante dicho procedimiento. La inmovilización orientada de AChE se realiza a través de grupos funcionales específicos localizados en su superficie, así los sitios activos pueden ser afrontados hacia los analitos de interés presentes en la muestra, y los sustratos y los productos pueden difundirse libremente en la capa biológica (Andreescu, Fournier, Marty, 2003). Se ha utilizado la AChE de la *Drosophyla melanogaster*, la cual ha sido manipulada mediante ingeniería genética, realizándose la adición de residuos de histidina al grupo carboxilo terminal de la enzima. Los biosensores desarrollados de esta manera mostraron un aumento de la sensibilidad y límite de detección más bajo, pero tiene una operatividad y estabilidad de almacenamiento reducido con respecto a los procedimientos de atrapamiento físico (Andreescu, Barthelmebs, Barthelmebs, 2002; Andreescu et al., 2002). Un aspecto positivo es la baja cantidad de enzima requerida y la reutilización de la misma. El requerimiento de la presencia de grupos específicos en el bioreceptor y el proceso de adición de dichos grupo puede ser engorroso.

Conceptos electroquímicos

Electrodos: tipos y materiales

Comúnmente la enzima se deposita sobre la superficie del electrodo de trabajo y la actividad de la enzima se mide añadiendo el sustrato a la solución. Inicialmente los biosensores basados en Colinesterasa utilizaron electrodos tipo Clark, que usaba un

electrodo de oxígeno para la detección amperométrica y un electrodo sensible al pH para la detección potenciométrica. En ambos casos, la enzima es inmovilizada mediante atrapamiento físico sobre la superficie del electrodo de oxígeno o mediante el uso de membranas sensibles al pH. Posteriormente se utilizaron electrodos sólidos tales como platino, oro, carbono vítreo y los electrodos de pasta de carbono (Martorell, Cespedes, Martinez-Fabregas, Alegret, 1997). En algunos casos estos electrodos son químicamente y/o electroquímicamente activados para añadir grupos funcionales en su superficie con el objetivo de la posterior fijación de la enzima.

El uso de electrodos sólidos ofrece un buen rendimiento analítico para la determinación de la actividad de la colinesterasa pero presenta varias limitaciones importantes para las mediciones de inhibición. Debido a la inactivación de la enzima por el inhibidor, para utilizar nuevamente el biosensor requiere la regeneración y/o sustitución de la capa de enzima. Por lo tanto, un nuevo electrodo tiene que estar preparado para cada medición, incluyendo la calibración del sensor y la determinación de muestras desconocidas. Dependiendo del material del electrodo, los pasos de preparación pueden incluir el pulido mecánico, la activación de la superficie del electrodo, la unión de los mediadores electrónicos y, en algunos casos, la cobertura con capas adicionales para aumentar la estabilidad de la enzima. Además, estos electrodos son costosos y su producción por grandes cantidades es casi imposible. Debido a estas limitaciones y a la naturaleza de las mediciones de inhibición, a finales de 1990, la mayoría de los electrodos sólidos para biosensores de AChE fueron reemplazados por los electrodos producidos por serigrafía o también denominados screen printed (Noguer, Leca, Jeanty, Marty, 1999; Hartley, Hart, 1994), los cuales presentan múltiples ventajas, ya que son adecuados para trabajar con microvolúmenes y son más fáciles de preparar y modificar. Son reutilizables y de bajo costo y tienen una excelente especificidad y selectividad. Adicionalmente los electrodos “screen printed” (SPE) son atractivos para las determinaciones in situ, ya que han demostrado tener buenos resultados (Pundir, Chauhan, 2012).

Con el fin de mejorar la señal detectada por los electrodos “screen printed”, se han utilizado mediadores eléctricos como potencializadores de la señal transmitida por la actividad enzimática, los cuales participan en los procesos de oxidación y reducción de las reacciones enzimáticas, contribuyendo a la potencialización de las mismas. Los potencializadores más comunes usados en inmovilización enzimática son los basados en ferrocianuro, tales como ferrocianuro de potasio y hexacianoferrato férrico (PB), reportado en la literatura también como azul de Prusia (Ricci, Palleschi, 2005).

Otra tendencia más reciente en la fabricación de biosensores basados en la colinesterasa es utilizar materiales nanoestructurados y nanocompuestos para obtener una gran área superficial y una mayor sensibilidad. Un ejemplo es el uso de nanotubos de carbono. En este caso, el biosensor se fabrica por la deposición de nanotubos sobre la superficie del electrodo de trabajo de un electrodo serigrafiado, seguido de secado y simple deposición de AChE en solución (Joshi et al., 2005). El sensor se caracteriza por una elevada área superficial que mejora la actividad electrocatalítica hacia la tiocolina, lo que facilita el funcionamiento a bajo potencial sin el uso de mediadores electrónicos. El uso de

nanomateriales y nanocompuestos en biosensores basados en Colinesterasa es relativamente inexplorado y representa una línea de investigación importante para futuros avances.

Voltametría.

La Voltametría se basa en la determinación de las intensidades de corriente que circula por el circuito de medida. Para tener una utilidad analítica el parámetro que se determina tiene que tener una relación con la concentración del analito que se desea cuantificar. Esto se logra si se trabaja en condiciones donde el único mecanismo de transporte actuante con el analito sea la difusión.

Las técnicas amperométricas se utilizan mucho en la tecnología de sensores y en el seguimiento de valoraciones y reacciones de interés biológico. Los métodos amperométricos modernos continúan siendo unas poderosas herramientas empleadas por los diferentes tipos de químicos interesados en el estudio y aplicación de los procesos de oxidación, reducción y adsorción (Ramírez, 2009).

Voltametría cíclica

Es una técnica que se emplea comúnmente para estudios de procesos de óxido-reducción (redox), mecanismos de reacción, propiedades electrocatalíticas, estudio de intermediarios de reacción, entre otros. Es una técnica donde se analiza la variación de la corriente a medida que se modifica el potencial. Esta técnica se basa en aplicar un barrido de potencial al electrodo de trabajo tanto en el sentido directo como en el inverso, es decir realizando lo que se denomina barrido triangular de potencial. Este programa de potencial se inicia en un valor inicial o de partida hasta un valor final o de corte. El barrido puede ser iniciado en cualquier sentido (anódico o catódico) y esta técnica permite repetir este ciclo las veces que sea necesario (Vázquez, 2016).

Descripción del prototipo de instrumento para medidas amperométricas

En el marco del proyecto CODI 2014-462 “Biosensores para la detección de plaguicidas en leche” asociado a al presente trabajo de grado de maestría, se ha desarrollado un prototipo que permite realizar medidas de Voltametría sobre sensor impreso (SPE), con características de bajo costo, portabilidad y facilidad de operación. El área de aplicación es la medida en campo de contaminantes, en este caso clorpirifos en leches.

En este trabajo de grado de maestría, el prototipo fue empleado para la cuantificación de la señal bioquímica producida en la reacción enzimática dada sobre el electrodo previamente

inmovilizado y utilizado en las pruebas de inhibición y de optimización del biosensor. Contemporáneamente se dieron líneas guía para la mejora y optimización del prototipo.

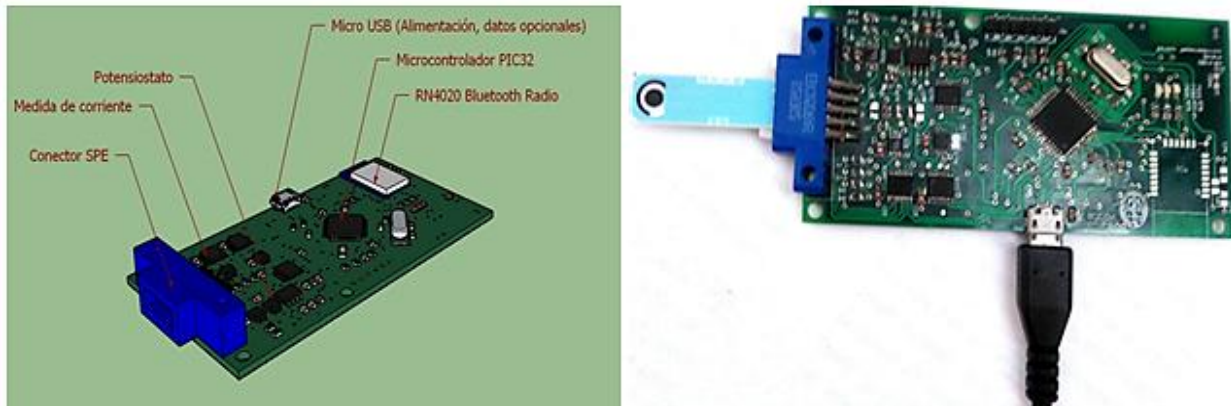


Figura 3. Izquierda, modelo 3D del prototipo desarrollado con sus principales componentes. Derecha modelo real del prototipo desarrollado.

Las principales características del dispositivo realizado y mostrado en la figura 3 y son las siguientes:

- 1) Conexión directa de sensores impresos tipo SPE de la serie DROPSSENS.
- 2) Dos tipos de medida: Voltametría cíclica y medida directa.
- 3) Potencial de oxido-reducción configurable entre -1000mV a +1000mV, con resolución de 1mV.
- 4) Rango de medida de corriente configurable entre +/-7uA, +/-70uA, +/-700nA.
- 5) Variación de voltaje con pasos cada 0,5 segundos para la voltametría cíclica.
- 6) Alimentación desde baterías o desde puerto USB del computador.
- 7) Posibilidad de comunicación de datos via USB para uso en laboratorio o vía Bluetooth para uso en campo por medio de dispositivos smartphone – tablet.

Capítulo 4

Desarrollo de los objetivos específicos

Evaluar la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa como enzima libre.

La actividad enzimática de la enzima libre se determinó según el método evaluado por Ellman y compañía (Ellman et al., 1960).

Preparación de soluciones.

Buffer fosfato 0.1M; pH 8; Acetilcolina (Acetylthiocholine chloride SIGMA, referencia: A5626), se realizó una curva de concentraciones de acetilcolina con 1mM, 0.15mM, 0.25mM, 0.3mM, 0.4mM, 0.5mM, 0.7mM, 0.85mM, 1.0 mM; Acetilcolinesterasa 0.01mg/mL (Acetylcholinesterase from Electrophorus electricus SIGMA, referencia: C3389); DTNB 0.01M (5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoic Acid) SIGMA, referencia: 322123). Todas las soluciones fueron realizadas con agua desionizada.

Lectura de la Actividad enzimática.

La actividad enzimática se determinó mediante un método espectrofotométrico realizando medidas puntuales de la absorbancia cada dos minutos durante 16 minutos, a una longitud de onda de 416nm.

Para la determinación de las constantes cinéticas, la concentración de la enzima fue constante, correspondiente a 0,01mg/mL o equivalente a 5U de enzima. Las medidas de la absorbancia a las diferentes concentraciones de sustrato se realizaron por triplicado y se realizó un blanco por cada ciclo de actividad enzimática (un ciclo de actividad enzimática fue la lectura de absorbancia desde el tiempo de 0 minutos hasta 16 minutos). La longitud de la celda en cm por donde pasa el haz de luz fue de 1cm. El coeficiente de extinción molar del cromóforo (DTNB) corresponde a $\epsilon=13600\text{L}\cdot\text{cm}/\text{mol}$. El procedimiento utilizado para la preparación final de la lectura fue de la siguiente manera: 500 μL DTNB + 500 μL Sustrato + 950 μL Buffer fosfato + 50 μL Enzima o 1000 μL Buffer fosfato, en el caso del blanco, el cual no lleva enzima, de este modo el volumen total de la solución para cada concentración de sustrato fue 2mL y se preparó directamente en la celda de lectura.

La evaluación de la inhibición enzimática se realizó utilizando una concentración constante de clorpirifos correspondiente a 0,02mg/L a diferentes concentraciones de sustrato (las mismas utilizadas para la determinación de la actividad cinética sin inhibición), cuyo procedimiento para la lectura mediante espectrofotometría fue 500 μL DTNB + 500 μL Sustrato + 900 μL Buffer fosfato + 50 μL Enzima + 50 μL Clorpirifos o 950 μL Buffer

fosfato para el caso del blanco, el cual no lleva enzima. Para cada concentración de sustrato se realizó la lectura por triplicado y se realizó un blanco de reactivos por cada ciclo de actividad enzimática.

Determinación de las constantes cinéticas

Para la determinación de la velocidad de reacción se empleó la ecuación 1.

$$Vel\ rxn\left(\frac{mmol}{L} * min\right) = \frac{\frac{\Delta Abs}{min} * Ve * F}{\epsilon * l * enz} \quad \text{Ecuación 1}$$

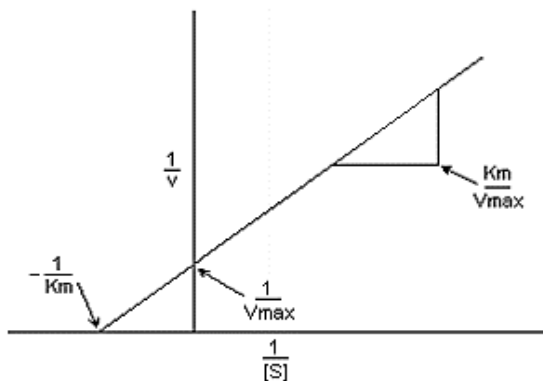
Donde, V_e = volumen total del ensayo (mL)

F = factor de dilución de la enzima

ϵ = coeficiente de extinción molar del cromóforo

l = La longitud de la celda en cm por donde pasa el haz de luz

La Velocidad máxima y la constante de Michaelis-Menten (k_m) fueron determinadas mediante la representación de Linewaver- Burk (Figura 4), según ecuación 2.



$$\frac{1}{V} = \frac{k_m}{V_{m\acute{a}x}[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Figura 4. Representación de Linewaver- Burk

De este modo representando $1/V$ vs $1/[S]$, se debe obtener una línea recta donde la intersección con el eje $1/V$ corresponde a $1/V_{m\acute{a}x}$ y la pendiente de la recta equivale a $k_m/V_{m\acute{a}x}$.

Para evaluar el efecto del inhibidor (clorpirifos) en la actividad enzimática, la absorbancia fue medida de manera puntual en el tiempo de 0 minutos y de doce minutos.

Y se siguió el mismo procedimiento anterior para encontrar $V_{\max(i)}$ y $K_m(i)$ asociados a la actividad enzimática con inhibidor.

Resultados y discusión

a. Constantes cinéticas de la enzima libre sin inhibidor.

En la Figura 5 se muestra el resultado para el seguimiento de la formación del producto (Tiocolina), procedente de la reacción de la Acetilcolina en presencia de acetilcolinesterasa, durante un intervalo de tiempo de 16 minutos. La hidrólisis de la acetilcolina por la acción de la acetilcolinesterasa genera como productos de reacción a la Tiocolina y el acetato. La tiocolina liberada reacciona con el cromóforo DTNB, dando lugar a la formación del ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB²⁻) compuesto de color amarillo, cuyo valor óptimo de absorbancia corresponde a una longitud de onda de 412nm (Rodríguez, Carvajal, Peñuela, 2013). La tasa de aparición de este producto de reacción es mayor conforme aumenta la actividad enzimática existente en la muestra.

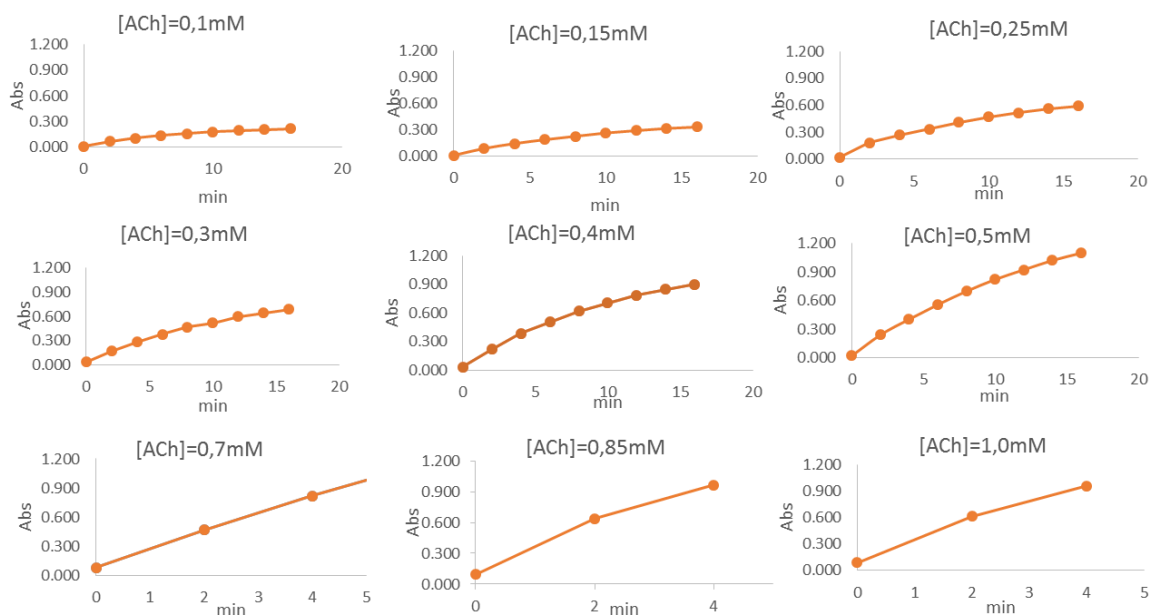


Figura 5. Actividad enzimática de la acetilcolinesterasa a diferentes concentraciones de sustrato.

Como se espera teóricamente, a medida que aumenta la concentración de sustrato también incrementa la actividad enzimática, dicho incremento se evidencia en el valor de la absorbancia, el cuál es mayor para el mismo tiempo conforme aumenta la concentración de acetilcolina utilizada. Hasta la concentración de sustrato correspondiente a 0,4mM todos los valores de la absorbancia durante los 16 minutos evaluados se encuentran por debajo de la unidad, cumpliendo de este modo lo planteado por Lamber-Beer cuya ley expresa la relación entre la absorbancia y la concentración de un cromóforo en solución a

una longitud de onda fija, pero solo se cumple para soluciones diluidas ($abs < 1$) debido a que ϵ varía con la concentración a causa de fenómenos de dispersión de la luz, agregación de moléculas, cambios del medio, entre otros. En consecuencia solo son confiables los datos que están por debajo de la unidad para el valor de la absorbancia.

Según los resultados obtenidos (figura 5), la medida de actividad enzimática con una concentración de 0,5mM de acetilticolina después de los 12 minutos no es confiable, pues sobrepasa el valor de la unidad para la absorbancia. Se presentó una saturación de la enzima alrededor de los 5 minutos para la concentración de acetilticolina correspondiente a 0,7 mM y alrededor de los 4 minutos para las concentraciones de acetilcolina correspondientes a 0,85mM y 1,0 mM.

Para hallar las constantes cinéticas tales como $V_{m\acute{a}x}$ y k_m , se trabajó solo con los valores que cumplieron con la ley de Lamber-Beer, y en donde el incremento de la absorbancia fue lineal, para ello se tomó los valores de la absorbancia entre 0 y 10 minutos en el rango de concentración de sustrato de 0.1 a 0.5 mM, tal como se muestra en la tabla 4. A partir de estos datos se realizó la representación de Lineweaver- Burk mostrada en la figura 6.

Tabla 4. Datos obtenidos para el cálculo de $V_{m\acute{a}x}$ y k_m

[ACh]	$\Delta Abs / min$	V.rxn ($\mu mol/min$)	1/[S]	1/V.rxn
0.1	0.017	4.912	10.000	0.204
0.15	0.025	7.294	6.667	0.137
0.25	0.043	12.618	4.000	0.079
0.3	0.049	14.412	3.333	0.069
0.4	0.067	19.706	2.500	0.051

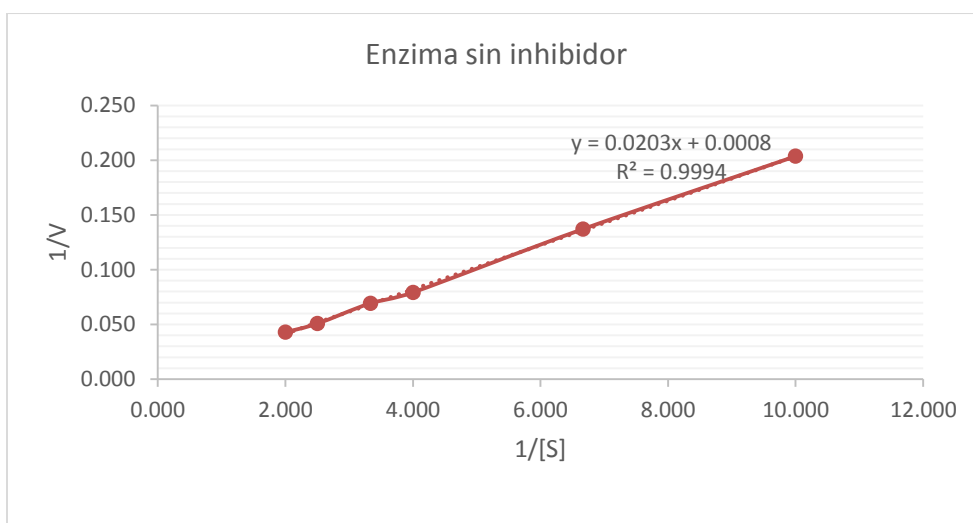


Figura 6. Representación de Lineweaver- Burk para la determinación de las constantes cinéticas de la AChE.

Mediante la representación de Linewaver- Burk (figura 6) obtenida a partir de los valores experimentales reportados en la tabla 4, se obtuvo una ecuación de la recta correspondiente a $y = 0.0203x + 0.0008$, interpretando esto mediante la ecuación 2, se adquiere que $1/V_{max} = 0.0008$ y $k_m/V_{m\acute{a}x} = 0.0203$, por tanto el valor de $V_{m\acute{a}x}$ para la enzima acetilcolinesterasa fue de $1250 \mu\text{mol}/\text{min}$ y de k_m fue de $2.54\text{E}-05 \text{ M}/\text{min}$

b. Constantes cinéticas de la enzima libre con inhibidor.

Los datos experimentales necesarios para la determinación de las constantes cinéticas, asociadas a la inhibición enzimática se muestran en las tablas 5, la representación de Linewaver- Burk obtenida mediante estos datos se presenta en la figura 7, de donde se obtiene la siguiente ecuación de la recta $y = 0.0361x + 0.1721$. De igual manera que en ítem anterior, mediante la ecuación 2 se deduce que $1/V_{m\acute{a}x}(i) = 0.1721$ y $k_m(i)/V_{m\acute{a}x}(i) = 0.0361$ de donde se obtiene que los valores de $V_{m\acute{a}x}(i)$ y $k_m(i)$ son respectivamente $5.810 \mu\text{mol}/\text{min}$ y $2.098\text{E}-07 \text{ M}/\text{min}$. Con relación al k_m encontrado para la enzima libre sin inhibidor, $k_m(i)$ es más pequeño, lo que significa que la afinidad que presenta la enzima por el inhibidor es mayor a la presentada por el sustrato.

Tabla 5. Datos obtenidos para el cálculo de $V_{m\acute{a}x}(i)$ y $k_m(i)$

[ACh]	$\Delta\text{Abs}/\text{min}$	V.rxn ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	1/[S]	1/V.rxn
0.1	0.006	1.882	10.000	0.531
0.15	0.009	2.500	6.667	0.400
0.25	0.010	2.882	4.000	0.347
0.3	0.012	3.471	3.333	0.288
0.4	0.011	3.353	2.500	0.298
0.5	0.017	5.088	2.000	0.197

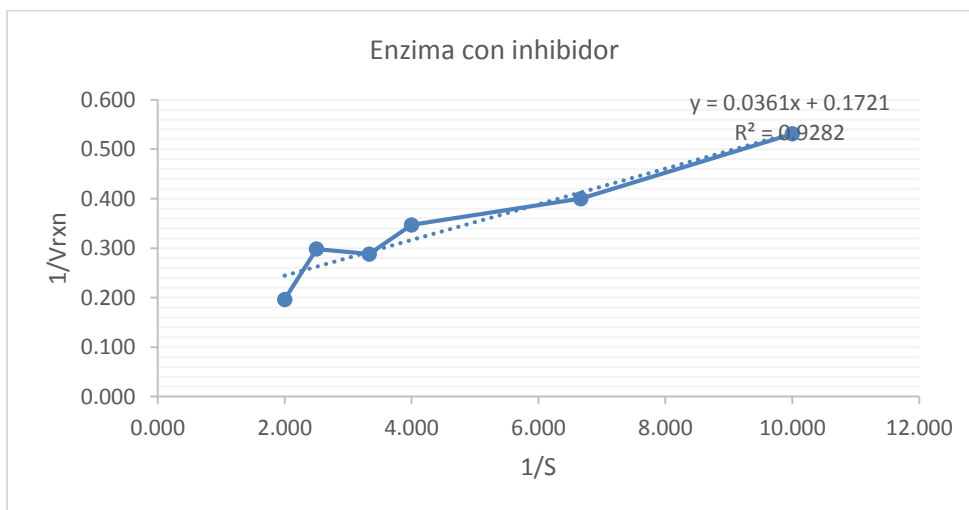


Figura 7. Representación de Linewaver- Burk para la determinación de las constantes cinéticas de la inhibición de AChE.

Tanto el valor de la velocidad máxima de reacción ($V_{m\acute{a}x}$) como el de la constante de Michaelis (K_m), disminuyen para el caso de la enzima con inhibidor, lo que indica que el inhibidor, en este caso el clorpirifos, se une al complejo ES (enzima-sustrato) e interfiere en la formación del producto, ocasionando una disminución en ambas constantes cinéticas. El tipo de inhibición se denomina incompetitiva o incompetitiva, en donde el inhibidor se une a un punto diferente del sitio activo de la enzima (Voet, Voett, Pratt, 2007). En este tipo de inhibición el clorpirifos interfiere en la disminución de la actividad enzimática uniéndose a una parte de la enzima diferente del sitio activo cuando ya está formado el complejo acetilcolinesterasa- acetiltiocolina. La adición del inhibidor produce una disminución en el valor de V_{max} lo que indica que la enzima tarda más tiempo en realizar su función catalítica, es decir el número de moléculas de sustrato que se convierten en producto por una unidad de tiempo disminuye.

Sabiendo que el tipo de inhibición presentado es incompetitiva, la determinación de la constante de inhibición (K_i) se determinó mediante la ecuación 3.

$$k_m(i) = \frac{k_m}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde $[I]$ = Es el valor de la concentración de clorpirifos utilizado en M ($5.70E-08$)

$k_m(i)$ = $2.098E-07$ M/min

k_m = $2.54E-05$ M/min

Despejando y remplazando en la ecuación 3 el valor para K_i fue de $9,88E-17$ M, lo que representa un valor muy bajo comparado con los valores de concentración sustrato utilizados, lo que representa que el inhibidor es potente y la unión que este realiza en el complejo ES es fuerte, por ende se dificulta que la reacción sea reversible.

Inmovilizar el elemento biológico en la superficie del transductor del biosensor.

La Inmovilización del elemento biológico (acetilcolinesterasa) se llevó a cabo en la superficie del electrodo de trabajo mediante la técnica de cross-linking. No se realizó otro tipo de inmovilización debido a que con otros métodos como atrapamiento físico, se produce pérdida de la enzima por arrastramiento al agregar la muestra sobre el electrodo.

Preparación de soluciones

Albumina de suero fetal Bovino (BSA) 5% - 6% (Albumin bovine serum SIGMA, referencia :A4503); Glutaraldehido (GA) 2.5% - 5% (Glutaraldehyde solution SIGMA, referencia: G5882); Acetilcolinesterasa 10U-100U. Las soluciones fueron preparadas con agua desionizada.

Aplicación de la inmovilización.

La inmovilización se evaluó en diferentes tipos de electrodos con cuatro tratamientos diferentes mostrados en la tabla 6, en la que se varió la concentración de los reactivos de la siguiente manera:

Tabla 6. Tratamientos aplicados para la inmovilización enzimática

Tratamiento	Características del mix
Tratamiento 1	GA 2,5%; BSA 6% ; 100U AChE
Tratamiento 2	GA 2,5%; BSA 6% ; 10U AChE
Tratamiento 3	GA 1%; BSA 5% ; 100U AChE
Tratamiento 4	GA 1%; BSA 5% ; 10U AChE

Para los tratamientos 1 y 2, el mix se preparó con la siguiente relación: 5 μ L BSA + 5 μ L GA + 10 μ L AChE. Se tomaron 5 μ L del mix y se adicionaron sobre el electrodo de trabajo. Se dejó enfriar a 4°C durante 24h.

Para los tratamientos 3 y 4, el mix se preparó con igual cantidad de BSA, GA y AChE. Se tomaron 2 μ L de la mezcla resultante y fueron adicionados sobre el electrodo de trabajo. Se dejó enfriar a 4°C durante 24h.

Antes de leer, los electrodos se dejaron secar a 28°C durante 30 min (para activar la enzima). Una vez transcurrido este tiempo fueron almacenados en solución Buffer 1M, pH 8 y los que no se utilizaron se almacenaron a una temperatura de 4°C por un periodo de tiempo hasta de 15 días. Cada que realizará lectura, la enzima debía activarse a una temperatura de 28°C.

Los cuatro tratamientos fueron evaluados en electrodos de trabajo de carbono (Dropsens, referencia: 110); electrodos de oro (Dropsens, referencia: 220BT); electrodos de platino (Dropsens, referencia: 550) y los tratamientos 1 y 2 fueron evaluados en electrodos de carbono con potencializadores; carbono con azul de Prusia (Dropsens, referencia: 710) y carbono con ferrocianuro (Dropsens, referencia: F10). Todos utilizando como electrodo de referencia Ag/AgCl.

Para cada tipo de electrodo se realizó por triplicado Voltametría cíclica con un barrido de voltaje de -1000mV a 1000mV, durante 5 ciclos y con una variación de lectura de 20mV cada 0.5 segundos con el objetivo de determinar la eficacia de la inmovilización, observando si durante el barrido de voltaje la enzima si presentaba actividad o no. Todos los ensayos amperométricos se realizaron con una concentración de sustrato de 5mM preparada en una solución de buffer fosfato con un pH =7.1. El blanco se trabajó únicamente con buffer fosfato pH = 7,1.

Resultados y discusión

La Voltametría cíclica se realizó con el fin de encontrar el voltaje óptimo de oxidación de la tiocolina sobre cada tipo de electrodo, evaluando en cada uno la inmovilización

enzimática con los cuatro tratamientos mostrados en la tabla 6. Según el material del electrodo de trabajo, la tiocolina, producto de la hidrólisis de la acetilticolina se oxida en la superficie del electrodo a un voltaje característico, lo que conlleva a un aumento de la corriente de salida. En la Voltametría cíclica dicho aumento de corriente se observa como un pico que indica la actividad enzimática (Andreescu y Marty, 2006).

En las Figuras 8, 9, 10 y 11 se puede que el voltaje necesario para que se produzca la reacción bioquímica en la superficie del electrodo (observación del pico) cambia según el tipo de material utilizado para el electrodo de trabajo y el tratamiento aplicado. Lo mismo ocurre con la intensidad de la señal de la reacción bioquímica registrada mediante el valor de la corriente.

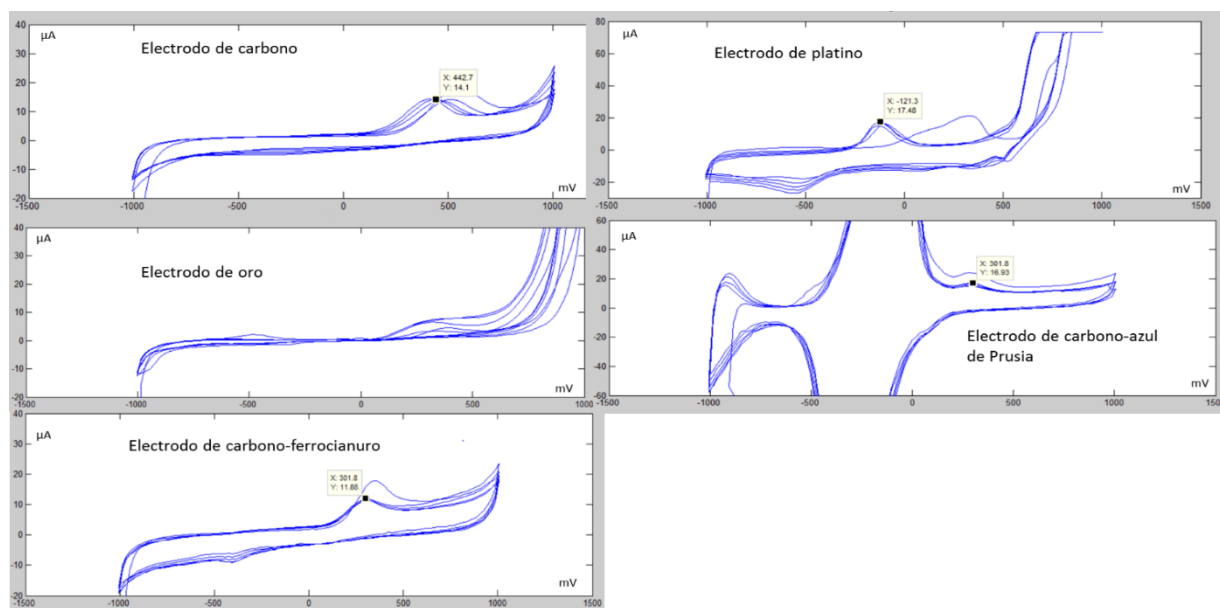


Figura 8. Voltametría cíclica para el tratamiento 1 en cada uno de los electrodos evaluados

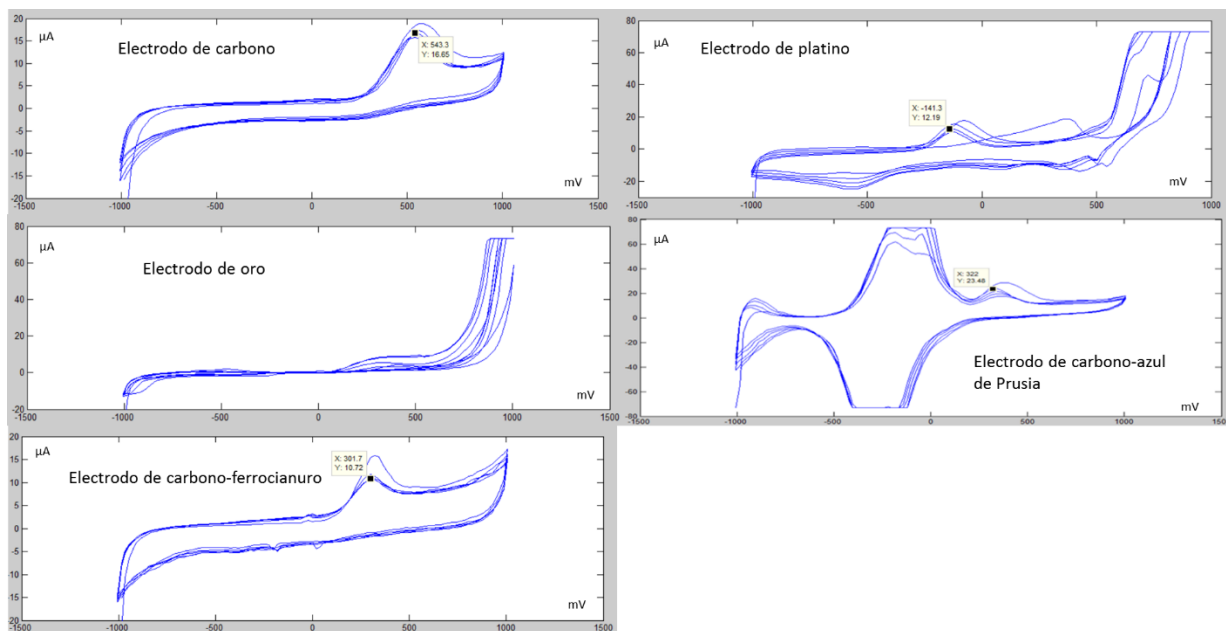


Figura 9. Voltametría cíclica para el tratamiento 2 en cada uno de los electrodos evaluados.

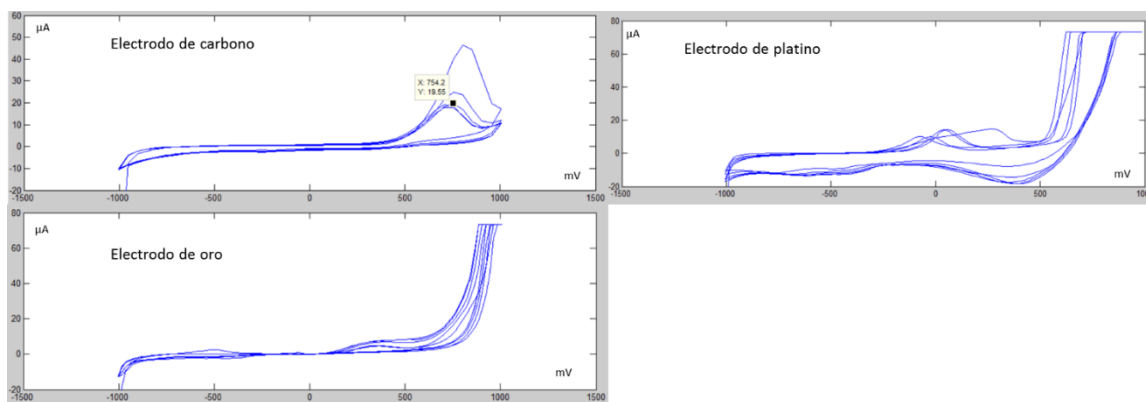


Figura 10. Voltametría cíclica para el tratamiento 3 en cada uno de los electrodos evaluados.

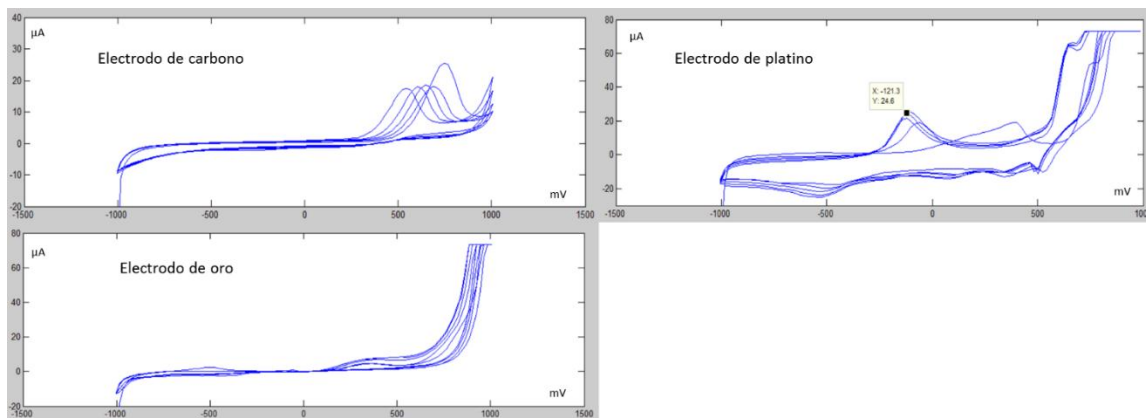


Figura 11. Voltametría cíclica para el tratamiento 4 en cada uno de los electrodos evaluados.

El electrodo de oro no presentó respuesta (no hubo presencia de pico) claramente positiva para la inmovilización enzimática con alguno de los cuatro tratamientos aplicados. Múltiples autores afirman que los electrodos de oro pueden presentar interferencias atribuidas a su fabricación cuando son utilizados para el diseño de biosensores enzimáticos (Li et al., 2012; Kadara, Jenkinson, Banks, 2009), por ende, en la mayoría de los casos para su buen funcionamiento se requiere de la modificación de su superficie mediante pretratamiento del electrodo (Arduini et al., 2013). En cuanto al electrodo de platino, presentó un pico en valores de voltaje muy cambiantes para cada uno de los ensayos en los cuatro tratamientos (figura 8, 9, 10 y 11), lo que a su vez se registra en la tabla 7 con el alto valor de la desviación estándar correspondiente a 46%, 111%, 58% y 30% para los tratamientos 1, 2, 3 y 4, respectivamente, por ende las pruebas realizadas con este electrodo para todos los tratamientos fueron descartadas por no presentar repetibilidad entre los ensayos.

Tabla 7. Resumen de los resultados obtenidos para los cuatro tratamientos aplicados

Tratamiento 1								
Tipo de Electrodo	Carbono		Platino		Azul de Prusia		Ferrocianuro	
medida	corriente μA	voltaje mV	corriente μA	voltaje mV	corriente μA	voltaje mV	corriente μA	voltaje mV
\bar{x}	14.46	464.86	17.72	-66.14	16.26	281.2	10.55	281
s	0.45	24.3	2.05	46.29	0.93	0.35	1.48	28.28
Tratamiento 2								
Tipo de Electrodo	Carbono		Platino		Azul de Prusia		Ferrocianuro	
medida	corriente μA	voltaje mV	corriente μA	voltaje mV	corriente μA	voltaje mV	corriente μA	voltaje mV
\bar{x}	16.18	550	15.21	3.12	20.49	342.05	11.07	301.78
s	0.61	16.41	3.24	111.24	2.52	16.37	0.47	16.41
Tratamiento 3								
Tipo de Electrodo	Carbono		Platino					
medida	corriente μA	voltaje mV	corriente μA	voltaje mV				
\bar{x}	20.33	741.65	15.82	-45.33				
s	3.12	25.1	5.03	58.37				
tratamiento 4								
Tipo de Electrodo	Carbono		Platino					
medida	corriente μA	voltaje mV	corriente μA	voltaje mV				
\bar{x}	17.95	623.75	18.74	-88.8				
s	0.4	67.62	4.56	30.73				

* \bar{x} corresponde al promedio aritmético de los datos

* s representa la desviación estándar de la muestra.

Para los electrodos que presentaron señal se realizó un análisis de comparación de medias, con el fin de sustentar como el valor de la corriente donde se presenta el pico de actividad enzimática se ve afectado tanto por el tipo de electrodo utilizado como por el tratamiento aplicado. En la figura 12 se presenta el gráfico de cajas y bigotes obtenido para los dos factores evaluados. Es evidente que al aplicar el tratamiento 1 o 2 se presenta un cambio en el valor de la corriente donde se presenta el pico de actividad enzimática (figura 12 A), pero la prueba ANOVA para este caso presentó un valor-p correspondiente a 0.0944 lo cual indica que aunque hay diferencias en el valor de la medias, estas no son estadísticamente significativas por tanto, este factor no influye significativamente en la

variable de respuesta (corriente), caso contrario ocurre con la media del valor de la corriente al variar el tipo de electrodo utilizado (figura 12.B), en la figura de cajas y bigotes se observa que el valor de las medias son bastante diferentes entre sí, la prueba ANOVA para este caso arrojó un valor-p de 0.0000 por ende la diferencia entre las medias de los valores de la corriente son estadísticamente significativas lo que expresa que el tipo de electrodo utilizado (carbón, carbón con ferrocianuro o carbón con azul de Prusia) tiene una influencia estadísticamente significativa en el valor obtenido de la corriente eléctrica para el pico presentado de la actividad enzimática.

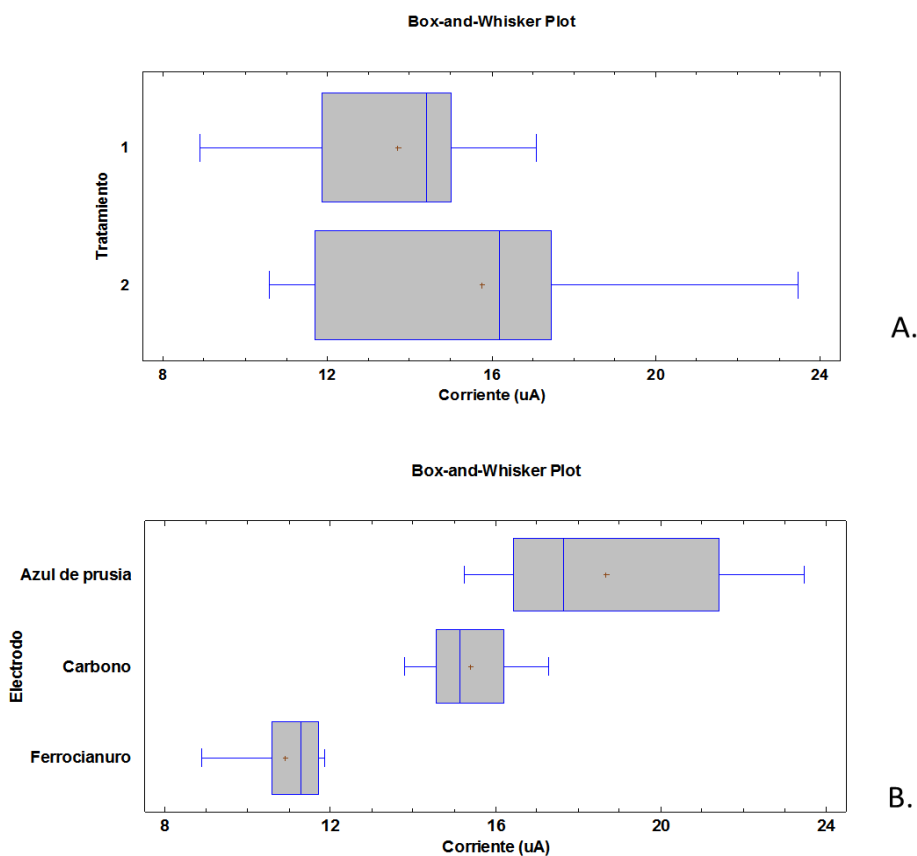


Figura 12. Gráfico de cajas y bigotes para los experimentos realizados con los de carbono, ferrocianuro y azul de Prusia. A. respuesta de la corriente teniendo como factor el tratamiento, B. respuesta de la corriente teniendo como factor el tipo de electrodo.

Teniendo en cuenta que el factor influyente en los experimentos realizados es el tipo de electrodo utilizado, para tomar decisiones y seleccionar la mejor opción de trabajo se debe realizar un análisis por separado del comportamiento de cada uno de los electrodos según el tratamiento usado para determinar la mejor respuesta. La tabla 7 da evidencia de que los dos electrodos de carbono con potencializadores (azul de Prusia y ferrocianuro) presentaron aparentemente el pico de actividad enzimática con un valor promedio igual de

voltaje, correspondiente a 281 mV. Sin embargo, hubo una mejor señal amperométrica para el electrodo de carbono con el potencializador azul de Prusia (16.26 μA). En el tratamiento 2, el electrodo de carbono con el potencializador azul de Prusia presentó la mayor señal amperométrica con una corriente de 20.49 μA , pero siendo los datos mucho más dispersos para este tratamiento que para el tratamiento 1, por ende se tomó la decisión de seleccionar al tratamiento 1 como la mejor opción para este tipo de electrodo. Por otra parte, el electrodo de carbono con ferrocianuro presentó los mejores resultados tanto de corriente como de desviación de los datos para el tratamiento 2 (11.07 μA y 0.47%), por consiguiente el segundo tratamiento fue seleccionado para ser aplicado en este tipo de electrodo. Adicionalmente la tabla 7 exhibe que el electrodo de carbono fue el que requirió de un mayor voltaje para proporcionar la reacción enzimática en todos los tratamientos (460mV), pero especialmente los tratamientos 2, 3 y 4, presentaron un voltaje muy elevado para este electrodo. Para el tratamiento 4 la desviación de los datos correspondiente a los valores de voltaje fue 67%, por tanto este tratamiento fue descartado como una opción de trabajo. Para tomar la decisión de cuál de los tres tratamientos restantes era el más conveniente para trabajar con el electrodo de carbono, fue necesario comparar el valor de voltaje obtenido para cada tratamiento y el obtenido para el blanco (figura 13). La literatura reporta que con electrodos de carbono la tiocolina se oxida en la superficie del electrodo a un valor de 410mV (Andreescu y Marty, 2006). El valor promedio según los ensayos realizados en este trabajo fue 460 mV, lo cual no está tan alejado de lo reportado en la literatura, considerando que la diferencia del valor experimental (460mV) y el valor teórico(410mV) equivale a un error del 10.87%.

El ensayo para el blanco se realizó para cada electrodo y para el tratamiento seleccionado se adicionó Buffer Fosfato, de este modo la enzima inmovilizada no tuvo ningún sustrato para reaccionar y realizar su actividad enzimática. Por consiguiente los picos observados en la figura 13 no corresponden a picos de actividad enzimática sino a deformación natural del electrodo por la aplicación de valores extremos de voltaje. Para el electrodo de carbono, el pico comienza a aparecer alrededor de un valor de voltaje correspondiente a 550mV, para el electrodo de carbono con ferrocianuro comienza haber un incremento de la corriente en un valor de voltaje de 500mV y para el electrodo de carbono con azul de Prusia, dicho valor correspondió a 480mV.

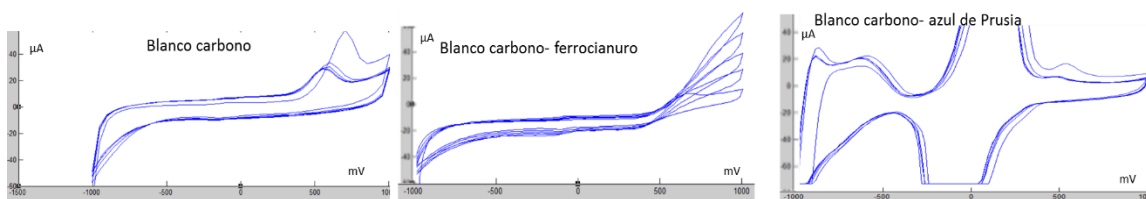


Figura 13. Blanco para los electrodos que presentaron actividad enzimática

Conociendo el valor del voltaje en el cual el electrodo de carbono comienza a aumentar los valores de corriente sin ser asociado a la actividad enzimática, se concluye que el

tratamiento más óptimo para dicho electrodo correspondió al tratamiento 1 (460mV), cuyo valor de voltaje fue menor a los 550mV registrado para el blanco, por ende los demás tratamientos no son tenidos en cuenta para la próxima etapa de este trabajo.

En la tabla 8, se presenta un resumen de los resultados positivos de la evaluación de diferentes tratamientos de inmovilización en diferentes tipos de electrodos y que sirvieron para seleccionar las condiciones para continuar con la etapa de inhibición con el pesticida clorpirifos.

Tabla 8. Resumen de los resultados positivos de la evaluación de diferentes tratamientos de inmovilización en diferentes tipos de electrodos.

Tipo de Electrodo	Tratamiento con mejor respuesta	Voltaje a usar (mV)
Carbono	Tratamiento 1	460
Carbono- azul de Prusia	Tratamiento 1	400
Carbono- Ferrocianuro	Tratamiento 2	400

Los valores de voltaje de la tabla 8 fueron seleccionados de tal forma que estuvieran por encima del pico presentado de la actividad enzimática, pero por debajo del pico presentado para el blanco de reacción.

Se observa que el tipo de electrodo con resultados positivos fue el de carbono, tanto para el electrodo sin potencializadores electroquímicos como para los dos electrodos con diferente tipo de potencializador. Adicionalmente se evidenciaron valores de corriente eléctrica mayores para el electrodo de carbono con azul de Prusia como para el electrodo de carbono con ferrocianuro, lo que confirma que la presencia de estas moléculas si tuvieron la capacidad de potencializar la reacción bioquímica, y por consiguiente, obtener una mayor señal de la corriente eléctrica.

Evaluar el desempeño del biosensor en la medición del clorpirifos usando cromatografía de gases.

Para confirmar los resultados obtenidos en el biosensor fue necesario utilizar una técnica alternativa para la verificación de los datos, lo cual se hizo por cromatografía de gases acoplada a un detector de espectrometría de masa (CG/EM). La técnica fue validada para la matriz de leche cruda, para ello se tuvo en cuenta los criterios de validación reportados en la guía SANTE 11945/2015.

Pretratamiento de la muestra

Siendo la leche una matriz en alimentos con un alto porcentaje de grasa, el pretratamiento de la muestra para las etapas de extracción y limpieza del analito (clorpirifos), se realizó

según el método QuEChERS, reportado en la AOAC 2007.01, cuyo proceso fue el siguiente:

a. Etapa de extracción del clorpirifos.

Se tomaron 10 gramos de la muestra, se adicionaron 10 mL de acetonitrilo al 1% con ácido acético y se homogenizó con Vortex durante 1 min. Luego fueron adicionadas las sales de extracción (6 g $MgSO_4$ + 1,5 g $NaC_2H_3O_2$) y se agitó mecánicamente durante 1 min. Finalmente se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min a una temperatura de 20 °C

b. Etapa de limpieza del clorpirifos

Se tomó 1 mL del sobrenadante obtenido de la etapa de extracción y fue adicionado sobre un cartucho de limpieza (SPE) (50 mg PSA + 50 mg C18 + 150 mg $MgSO_4$). Se agitó en el vortex durante 1 min y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min a una temperatura de 20 °C. Finalmente, se tomaron 0,5 mL del sobrenadante y se adicionaron en los viales para el análisis por CG/EM.

c. Análisis de la muestra por CG/EM.

El equipo utilizado para el análisis de las muestras fue GC Agilent 7890A, detector MS Agilent 5975C y automuestriador Agilent 7693, cuyas condiciones para el análisis fueron: Columna: HP-5MS UI (Medianamente polar), longitud de 30 m, diámetro de 0,250 mm y capa de 0,25 μm . El flujo de 1.2 mL/min y la velocidad de 37.629 cm/s. Gas de arrastre helio.

Horno: Rampa de calentamiento de 60 °C durante 1 min, luego la tasa de calentamiento fue de 30 °C/min hasta 290 °C y se mantuvo constante durante 6.33 min.

Inyector: El volumen de inyección fue de 10 μL . Rampa de calentamiento de 90 °C durante 0.1 min, luego la tasa de calentamiento fue de 600 °C/min hasta 325 °C y se mantuvo constante durante 5 min., luego la tasa de enfriamiento fue de 5 °C/min hasta 290 °C durante 10 min. El modo de inyección fue mediante venteo de solvente.

Los iones monitoreados para el clorpirifos fueron: 97, 197, 199, 314 y 316.

Los iones monitoreados para el estándar interno (TPP Trifenilfosfato) fueron: 65, 77, 325, 326, 327.

Las condiciones del espectrómetro de masas fueron: Temperatura de la fuente de 230°C y temperatura del cuádrupolo de 150°C.

Resultados y discusión.

Para la validación del método de clorpirifos en leche mediante cromatografía gaseosa, se evaluaron los siguientes criterios:

a. Linealidad

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido. Se tomó como punto de partida un intervalo de concentraciones de acuerdo con la finalidad de este trabajo, de tal forma que el valor máximo de concentración de clorpirifos en leche cruda de vaca corresponde a 20 µg/L; valor establecido por la Organización Mundial de la Salud.

Se realizaron tres curvas de calibración con siete puntos de concentración, tal como se muestra en la tabla 9, entre 5 µg/L y 100 µg/L.

Tabla 9. Resultados promedio para los ensayos de Linealidad.

Valor de matriz teórico (µg/L)	Valor experimental promedio (µg/L)	s	Residuales promedio (%)
5	4.54	0.31	9.26
10	10.87	0.34	8.71
20	19.78	1.22	4.24
30	30.79	2.45	5.39
50	50.39	1.45	2.08
70	69.12	6.49	6.51
100	99.52	6.29	4.98

Para determinar la linealidad del método, se tuvo en cuenta los criterios de aceptación establecidos en la guía SANTE 11945/2015, la cual establece que para que se cumpla este criterio, los residuales deben de tener un valor menor o igual al 20%. Según la tabla 9 dicho criterio se cumple para todos los puntos de la curva de calibración, por consiguiente el método es lineal, lo que se puede corroborar en la figura 14.

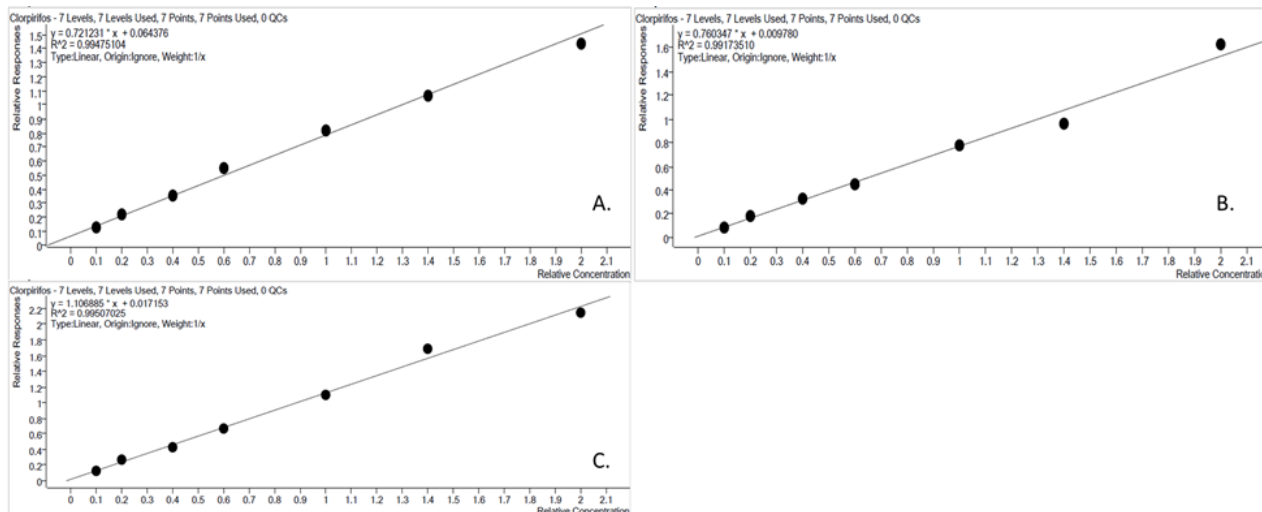


Figura 14. Curvas de calibración para el clorpirifos en matriz de leche, A. curva de calibración para la repetición 1, B. curva de calibración para la repetición 2, C. curva de calibración para la repetición 3

Los coeficientes de regresión lineal para las curvas de la figura 14 fueron altos, 0.994, 0.991 y 0.995 para el ensayo uno, el ensayo dos y el ensayo tres respectivamente. Por tanto la varianza del modelo se puede explicar entre un 98 a un 99%, siendo esto estadísticamente un resultado óptimo.

b. Precisión, Exactitud y Especificidad.

La precisión se evaluó por la repetibilidad (instrumental y del método), la cual se hace determinando la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas en el laboratorio y en un periodo de tiempo corto, para ello se realizaron nueve repeticiones (n=9) en el valor establecido como el límite de cuantificación (10 µg/L) y dos veces el límite de cuantificación (20 µg/L). El criterio para que la precisión se cumpla, que el %RSD debe ser menor o igual al 20%.

La exactitud, definida como la concordancia entre el valor medido y el valor aceptado como referencia, se evaluó también con un n=9 para el límite de cuantificación y dos veces el límite de cuantificación; se estableció en función del porcentaje de recuperación. El porcentaje de recuperación debe estar comprendido entre un rango de 70-120%.

La especificidad consiste en la certeza de que el analito corresponde verdaderamente a la muestra. Para ello se realizó un análisis en blanco de matriz en donde la cantidad de analito presente no debe superar el 30% del Límite de cuantificación.

A continuación en la tabla 10 se muestra el resumen de los datos obtenidos para la evaluación de precisión, exactitud y especificidad.

Tabla 10. Resumen de los datos obtenidos para los ensayos de precisión, exactitud y especificidad

Concentración teórica	10 µg/L (LC)	20 µg/L (2 LC)	Blanco matriz
\bar{x}	7.76 µg/L	16.54 µg/L	0.37 µg/L
<i>s</i>	1.39	2.90	0.65
% RSD	17.90	17.51	No aplica
% Recuperación	77.63	82.68	No aplica

*LC= Límite de cuantificación

*2LC= dos veces el límite de cuantificación

Según los criterios de aceptación se puede concluir que el método es preciso ya que el %RSD es menor al 20% para cada ensayo, es exacto por que el porcentaje de recuperación se encontró dentro del rango 70-120% y es específico porque la cuantificación del blanco de matriz fue de 3.70% comparado con el límite de cuantificación.

c. Efecto matriz

El efecto matriz se atribuye a las modificaciones que puede haber en el método asociadas a los componentes de la matriz evaluada. Si el efecto matriz está en $\pm 15\%$, se considera

que la matriz no afecta el comportamiento cromatográfico del analito y por ende este puede cuantificarse bien a través de las curvas en solvente o a través de las curvas en matriz. Si el efecto matriz supera el $\pm 15\%$, el analito sólo puede cuantificarse a través de las curvas en matriz.

El efecto matriz (EM) se calcula mediante una comparación de las pendientes entre una curva en solvente y una curva en matriz, tal como se muestra en la ecuación 4.

$$\%EM = \frac{\text{pendiente en matriz} - \text{pendiente en solvente}}{\text{pendiente en solvente}} \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

En la figura 15 se presenta la comparación entre la curva de calibración en solvente (acetónitrilo) y la curva de calibración en matriz (leche).

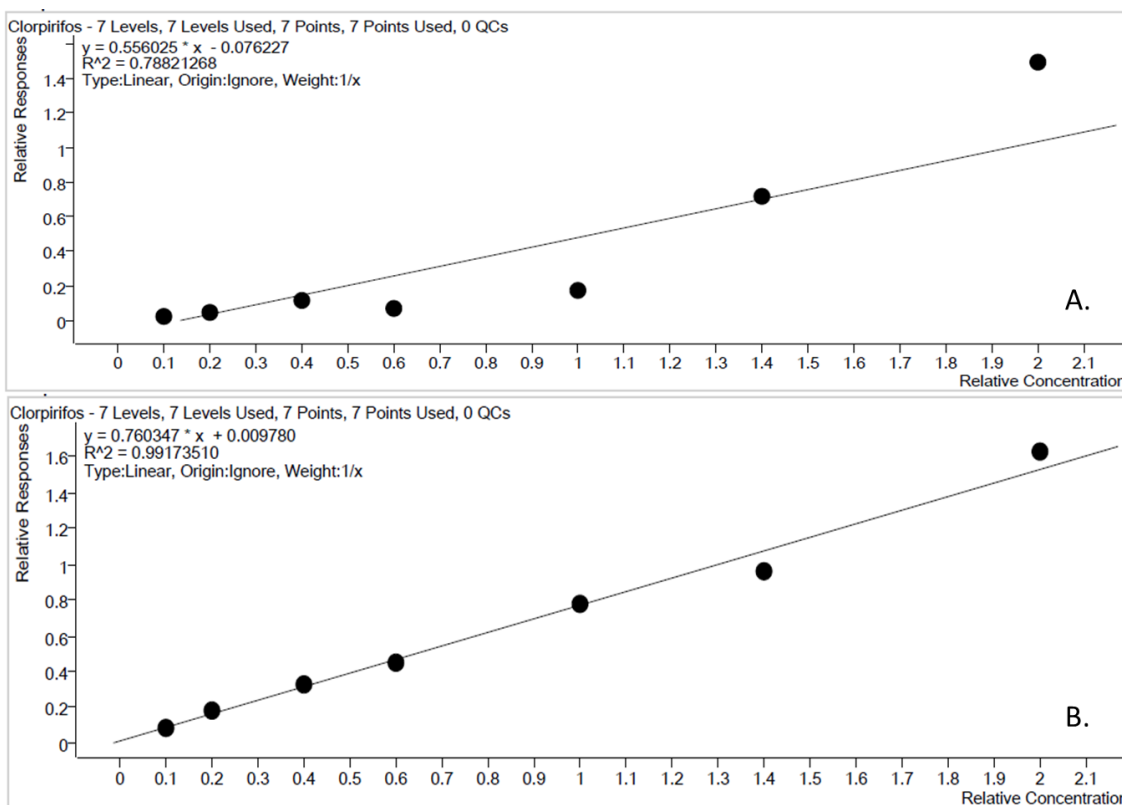


Figura 15. Comparación entre las pendientes de las curvas de calibración en solvente y en matriz. A. curva en solvente, B. curva en matriz

Se obtiene una pendiente de 0.56 y 0.76, para la curva del pesticida en el solvente y en la matriz respectivamente cuyo $\%EM=35.71\%$ calculado mediante la ecuación 4.

En consecuencia hay un notorio efecto matriz en el método, ya que el valor de $\%EM$ es superior al 15% por tanto, la curva de calibración debe realizarse en la matriz cuando se vaya a realizar la lectura de muestras mediante cromatografía de gases.

Optimizar parámetros de operación en el biosensor

Para el desarrollo de este objetivo específico los ensayos de optimización del biosensor se realizaron en agua desionizada, y finalmente se hizo una evaluación del instrumento en leche cruda y en leche descremada para evaluar el efecto de la grasa en dicha herramienta de medida.

Selección de la concentración óptima del sustrato.

Se realizaron ensayos con diferentes concentraciones de sustrato para establecer cuál concentración producía en el electrodo una mayor respuesta medida en corriente. Este ensayo se realizó por triplicado para cada uno de los electrodos seleccionados previamente (electrodo de carbono, carbono-azul Prusia y carbono-ferrocianuro).

Las mediciones se realizaron mediante Voltametría cíclica de la siguiente manera: Antes de comenzar la mediciones, los biosensores almacenados en solución Buffer Fosfato 0.1M, pH 8.0, fueron incubados a una temperatura de 28°C durante 45 minutos para activar la enzima, una vez transcurrido este tiempo se conecta el biosensor a la tarjeta electrónica para transformar la señal bioquímica producida en la reacción enzimática en datos de corriente eléctrica. Dicha corriente eléctrica es proporcional a la intensidad de la reacción bioquímica producida. Una gota de sustrato fue adicionada sobre el electrodo de trabajo delimitado por un anillo (o-ring) puesto previamente. Se realizó un barrido de voltaje desde -1000mV a 1000mV con 5 ciclos y una variación de 20mV cada 0.5s

En la figura 15 se muestra un resumen gráfico de las curvas de sustrato obtenidas para cada tipo de electrodo utilizado. Se puede observar que en caso del electrodo de carbono (figura 15. C) el sustrato óptimo corresponde a 5mM, con una respuesta promedio de 14.10mV ya que con los demás no hubo reacción de la enzima, ya que para la concentración de sustrato de 8mM y 10mM se ve un pico, pero no es debido a la actividad enzimática, pues el valor del voltaje en dicha reacción es mayor a 550mV, voltaje en el que el electrodo comienza a sufrir un daño de manera natural como ya se había mencionado anteriormente en el análisis del blanco.

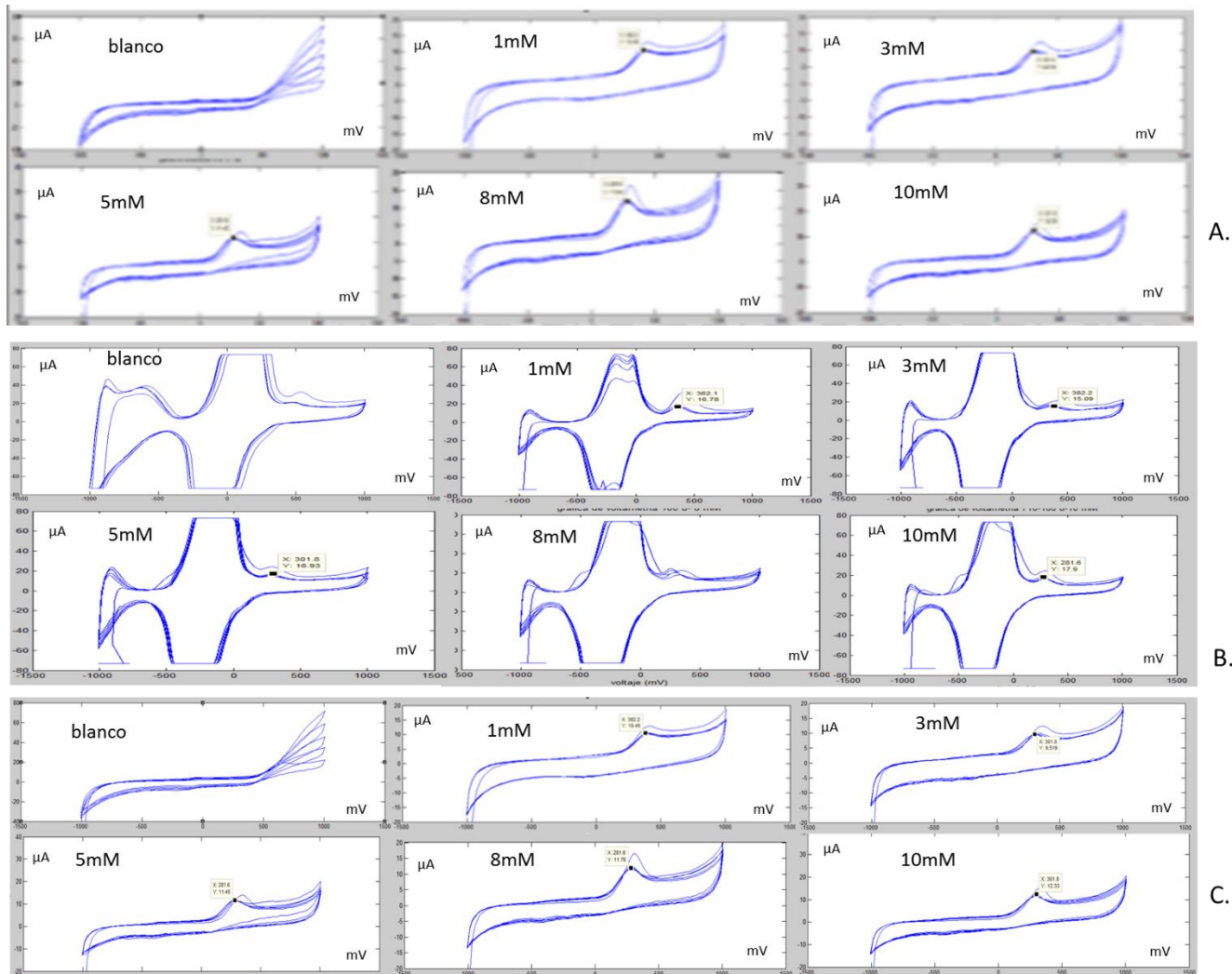


Figura 16. Voltametría cíclica para la curva del sustrato. A. Electrodo carbono-ferrocianuro, B. electrodo carbono-prussian blue, C. electrodo carbono.

Para los electrodos de Carbono-ferrocianuro (figura 16.A) y Carbono-azul Prusia (figura 16.B) se hace difícil sacar conclusiones mediante las gráficas, por ende se realiza un breve análisis numérico presentado en la tabla 11 para corroborar cuál es el sustrato al que mejor funciona la enzima.

Tabla 11. Resumen de los resultados obtenidos para la curva de sustrato en el electrodo de carbono-azul Prusia y carbono-ferrocianuro.

Electrodo Carbono- azul Prusia			Electrodo Carbono- Ferrocianuro		
Concentración sustrato (mM)	Valor promedio (μA)	s	Concentración sustrato (mM)	Valor promedio (μA)	s
1	16.50	0.58	1	11.41	0.78
3	15.88	0.93	3	11.25	1.17
5	16.93	0.45	5	11.57	0.26
8	20.95	3.35	8	11.78	0.25
10	17.16	1.04	10	10.28	0.41

Para el caso del electrodo de Carbono-Azul Prusia, el mejor resultado según la tabla 11 se obtiene a una concentración de sustrato de 8mM, presentándose un valor promedio de corriente de 20.95 μA pero mediante las gráficas se observa que el valor del voltaje al cual se daba el pico de actividad enzimática era muy inestable y poco repetitivo (Figura 16.B), por tanto, esta opción se descartó y se decidió que la mejor opción es la concentración de 5mM de sustrato, con la cual se obtuvo un valor promedio de la corriente de 16.93 μA , muy parecido al valor obtenido con una concentración de 10mM (17.16 μA), que a pesar de que en éste último la concentración es el doble la diferencia en la respuesta no es significativa.

Para el electrodo carbono-ferrocianuro se obtuvieron las mejores respuestas con 5mM y 8mM, con las cuales se obtuvieron 11.57 μA y 11.78 μA , respectivamente, siendo insignificante dicha diferencia. Por tanto, se decidió que electrodo funciona óptimamente con 5mM de sustrato.

De esta manera se consiguió que las características de los electrodos a usar para los ensayos de inhibición en agua, leche cruda y leche descremada fueron:

- Electrodo de carbono: inmovilización enzimática con 2,5% GA, 6% BSA y 100U AChE, concentración de sustrato a usar en los ensayos de inhibición correspondiente a 5mM.
- Electrodo de carbon-prussian blue: inmovilización enzimática con 2,5% GA, 6% BSA y 100U AChE, concentración de sustrato a usar en los ensayos de inhibición correspondiente a 5mM.
- Electrodo de carbono-ferrocianuro: inmovilización enzimática con 2,5% GA, 6% BSA y 10U AChE, concentración de sustrato a usar en los ensayos de inhibición correspondiente a 5mM.

Es importante aclarar que en el proceso de inmovilización, el último reactivo en adicionarse en el mix fue el glutaraldehido y esto mejoró la respuesta de la actividad enzimática. Autores como Silva, Jeanty y Marty (2004) mencionan en su trabajo que el glutaraldehido puede comunmente actuar inhibiendo la enzima y para controlar esto debe ser adicionado de último para elaborar el mix de la inmovilización, adicionalmente los mismo autores recomiendan utilizar concentraciones altas de enzima superiores a 50U. Así

se explica que la mayoría de los tratamientos óptimos para la inmovilización resultaron para una concentración de enzima de 100U.

Ensayos de inhibición del pesticida en agua desionizada.

Para los ensayos de inhibición en agua se realizó la curva de inhibición del pesticida por triplicado para cada uno de los electrodos previamente seleccionados, tal como se observa en la tabla 12. El porcentaje de inhibición fue determinado según la ecuación 5.

$$\% I = \frac{I_a - I_b}{I_b} \times 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

I_a es el valor de la corriente registrado de la actividad enzimática para el sustrato.

I_b es el valor de la corriente registrado de la actividad enzimática una vez adicionado el inhibidor.

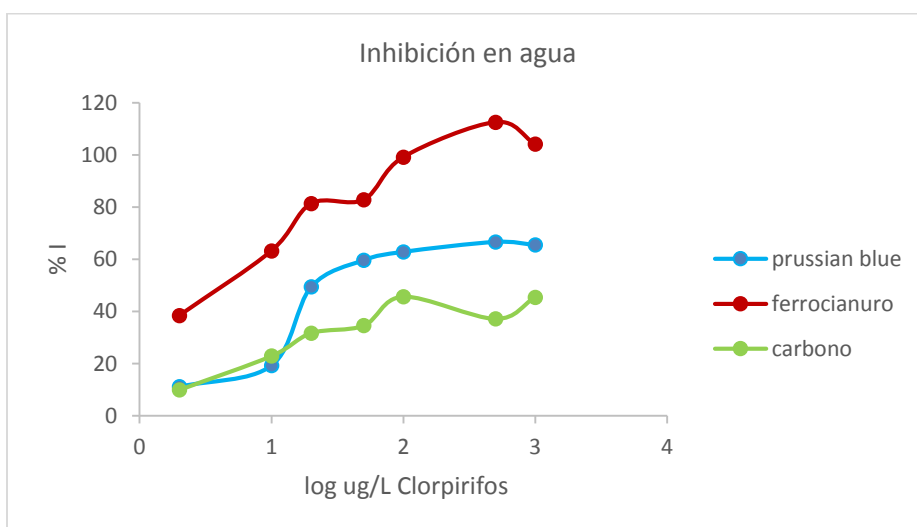


Figura 17. Efecto del clorpirifos en solución acuosa

Tabla 12. Resultados del efecto del clorpirifos en la matriz de agua

Clorpirifos ug/L	Carbono %I promedio	s	Azul Prussia %I promedio	s	Ferrocianuro %I promedio	s
2	9.92	0.86	11.13	0.47	38.40	0.34
10	22.90	0.39	19.29	0.86	63.22	4.94
20	31.69	1.07	49.43	0.66	81.31	0.75
50	34.57	0.35	59.65	1.55	82.80	0.68
100	45.65	0.21	62.84	0.44	99.14	0.81
500	37.16	2.38	66.64	2.91	112.53	1.61
1000	45.41	0.41	65.52	0.75	104.11	1.06

Según la figura 17 se presentó una evidente respuesta a la inhibición del pesticida utilizando una matriz de agua en los tres tipos de electrodos de carbono utilizados, la gráfica se realizó evaluando el porcentaje de inhibición con respecto al logaritmo de la concentración del pesticida para obtener una mejor visualización gráfica de los datos. La mejor respuesta se obtuvo para el electrodo de carbono con ferrocianuro, el cual muestra unos porcentajes de inhibición más elevados.

Se observó que la inhibición se realiza de manera lineal hasta una concentración de clorpirifos de 500 $\mu\text{g/L}$ (tabla 12, figura 17) para el caso de los electrodos de carbono con los potencializadores, pero para el caso del electrodo de carbono solo, la linealidad se cumple hasta una concentración de clorpirifos de 100 $\mu\text{g/L}$. Lo que indica que para una matriz de agua, el biosensor podría detectar de manera confiable concentraciones de clorpirifos inferiores a 100 $\mu\text{g/L}$ para el caso del electrodo de carbono y de 500 $\mu\text{g/L}$ para el caso de los electrodos de carbono con los potencializadores azul Prusia y ferrocianuro. El comportamiento no lineal para valores superiores a los previamente mencionados según el tipo de electrodo, puede deberse a que la enzima se satura a dichos valores de pesticida, por ende a concentraciones más elevadas la enzima no responde de manera lineal ya que ha perdido su capacidad catalítica por posibles cambios ocasionados en la estructura tridimensional de la misma.

Migración del pesticida en la matriz de leche

Con el fin de corroborar que el clorpirifos es de carácter hidrofóbico se realizó un ensayo con leche cruda para determinar a qué parte de la matriz de la leche migraba el pesticida. Para ello se tomaron 250 mL de leche cruda y se enriqueció la muestra a una concentración de 1 mg/L de clorpirifos. La muestra fue homogenizada en Vortex durante un minuto y almacenada durante 12 horas a una temperatura de 4°C. Una vez transcurrido este tiempo se homogenizó nuevamente la leche y se tomó una alícuota de 50 mL la cual fue dejada en reposo a una temperatura inferior a 10°C durante una hora. Finalmente la muestra fue centrifugada a 5000 rpm durante 5 min y las dos fases fueron separadas (fase acuosa y fase grasa).

La fase acuosa y la fase grasa se trataron por separado, a ambas se les realizó el proceso de pretratamiento de la muestra mediante el método QuEChERS explicado anteriormente y finalmente fueron leídas mediante cromatografía gaseosa.

En los resultados obtenidos se demostró que alrededor de un 90% del clorpirifos migró hacia la parte de la grasa de la leche, por ende, se ratifica que el clorpirifos es un pesticida altamente lipofílico.

Evaluación del clorpirifos en leche cruda

La leche cruda utilizada fué de un hato lechero ubicado en el municipio de Heliconia en el departamento de Antioquia. Inicialmente la leche fue analizada mediante cromatografía gaseosa, para verificar si poseía alguna concentración de clorpirifos. Se obtuvo como resultado que la leche cruda estaba libre de clorpirifos y se procedió a realizar la curva de matriz enriquecida como se muestra en la tabla 13. El valor del porcentaje de inhibición fue obtenido mediante la ecuación 5.

Los ensayos de inhibición se realizaron por triplicado para cada tipo de electrodo. Inicialmente se adicionó una gota de sustrato a una concentración de 5mM y se esperó un tiempo de 4 minutos para conseguir la estabilización del valor de la corriente eléctrica. Una vez transcurrido este tiempo se comenzó a adicionar sobre el electrodo de trabajo, la curva de clorpirifos en matriz de leche cruda con una separación de tiempo de 4 minutos entre cada punto. La curva fue adicionada sobre un mismo electrodo de trabajo de forma ascendente.

Los resultados de la evaluación del biosensor enzimático amperométrico en la matriz de leche cruda, utilizando tres tipos de electrodos diferentes, se muestran en la tabla 13 y en la figura 18.

Tabla 13. Resultados del efecto del clorpirifos en la matriz de leche cruda

Clorpirifos ug/L	Carbono %I promedio	s	Azul prusia %I promedio	s	Ferrocianuro %I promedio	s
2	51.25	7.88	54.58	24.21	117.68	38.89
10	71.09	27.70	85.06	33.27	182.44	72.93
20	90.02	52.05	101.83	43.21	242.01	109.48
50	85.43	35.34	91.10	41.70	228.76	96.42
100	77.21	31.61	148.19	8.71	185.72	39.31
200	81.08	30.28	250.30	57.58	171.06	6.48
500	91.79	43.69	300.89	15.29	203.46	47.07
1000	93.37	45.94	281.87	4.00	180.17	49.60

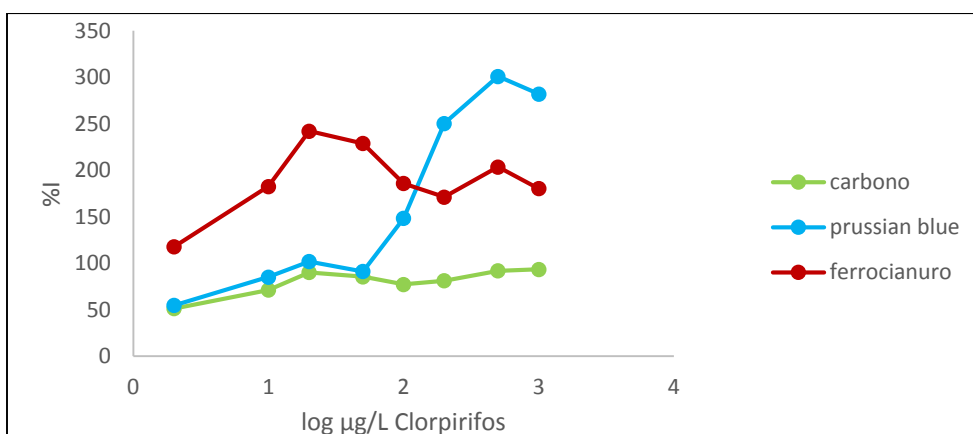


Figura 18. Efecto del clorpirifos en la matriz de leche cruda

Según los resultados para la matriz de leche cruda (tabla 13, figura 18), el biosensor resultó ser una herramienta sensible a la concentración del inhibidor, pues los porcentajes de inhibición para una concentración tan pequeña de clorpirifos como lo es $2 \mu\text{g/L}$ son mayores al 50% para los tres tipos de electrodos evaluados, lo que demuestra una alta sensibilidad en el instrumento de medida.

Para los tres electrodos utilizados se demuestra una linealidad en los resultados del porcentaje de inhibición hasta el punto tres de la curva correspondiente a $20 \mu\text{g/L}$ de clorpirifos, valor correspondiente al límite permitido por la OMS para leche de vaca. Por tanto, el biosensor, según estos resultados, puede ser útil para detectar valores por debajo de este límite, que era lo que se pretendía desde el inicio de este trabajo de investigación.

Es evidente que existen diferencias entre los resultados del biosensor obtenidos en matriz de agua y en matriz de leche cruda, lo que demuestra un efecto matriz en el método de análisis. Dicho efecto matriz también fue evidenciado como se mencionó anteriormente en la validación del método de detección de clorpirifos mediante cromatografía gaseosa. Tanto en cromatografía de gases como en la detección del clorpirifos mediante el biosensor parece que la matriz de leche cruda potencializa la señal en los resultados de la inhibición, lo cual puede deberse a moléculas que están asociadas a la composición de la leche cruda que pueden actuar como interferentes en el método.

Al igual que en la matriz de agua, las señales de inhibición más intensas para la matriz de leche cruda utilizando el biosensor amperométrico se obtuvieron utilizando el electrodo de carbono con ferrocianuro como potencializar electroquímico. Se puede concluir que la grasa natural de la leche no actúa como interferente de la corriente eléctrica.

Evaluación del clorpirifos en leche descremada.

La leche descremada utilizada fue leche comercial de larga vida de bolsa, cuyas especificaciones de producción indicaban que era 100% descremada. Inicialmente la leche fue analizada para verificar si poseía alguna concentración de clorpirifos. Se obtuvo como resultado que la leche descremada estaba libre de clorpirifos y se procedió a realizar la curva de matriz enriquecida como se muestra en la tabla 14. El valor del porcentaje de inhibición fue obtenido mediante la ecuación 5.

Los ensayos de inhibición se realizaron por triplicado para cada tipo de electrodo. El sustrato utilizado fue de una concentración de 5mM y el tiempo de espera o de estabilización para la adición de cada punto de la curva fue de 4 minutos. La curva fue adicionada sobre un mismo electrodo de trabajo de forma ascendente.

Este ensayo se realizó con el objetivo de verificar si el electrodo con en una matriz de leche pero sin presencia de grasa se comportaba similar o diferente que con la matriz de leche cruda, es decir si la grasa afectaba la medición de la corriente eléctrica. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 14 y la figura 19.

Tabla 14. Resultados del efecto del clorpirifos en la matriz de leche descremada

Clorpirifos ug/L	Carbono %I promedio	s	prussian blue %I promedio	s	Ferrocianuro %I promedio	s
2	64.51	21.40	42.06	20.96	130.54	0.93
10	80.12	27.35	52.92	24.48	164.90	7.86
20	88.39	32.84	42.13	25.17	160.35	18.66
50	78.52	46.60	53.34	5.85	154.64	0.57
100	72.22	47.07	74.23	37.71	159.92	29.12
200	38.91	38.16	56.17	38.75	98.72	5.64
500	46.19	32.26	70.79	20.13	129.00	6.70
1000	57.97	39.85	91.14	9.13	149.24	13.39

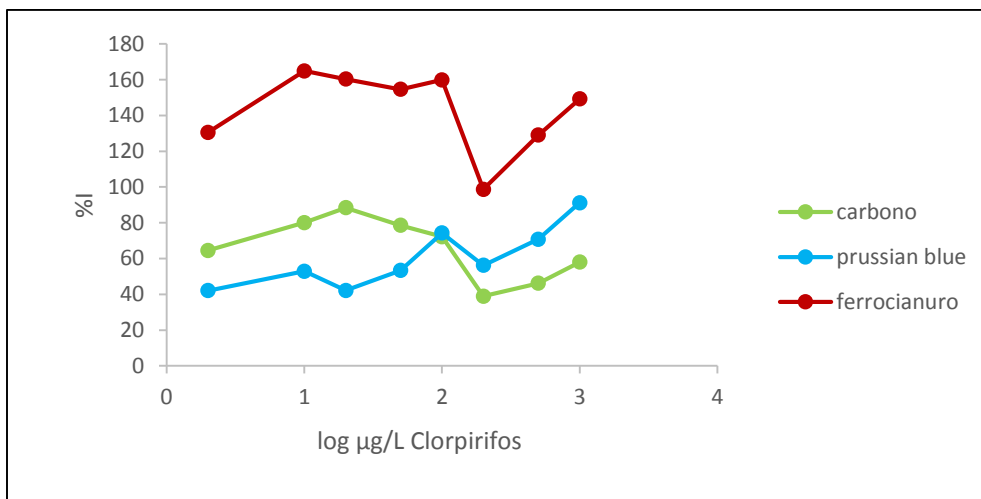


Figura 19. Efecto del clorpirifos en la matriz de leche descremada

De manera similar que para la matriz de leche cruda, para la matriz de leche descremada se evidencia un fuerte incremento en los valores obtenidos del porcentaje de inhibición (figura 19, tabla 14) con respecto a los obtenidos para el ensayo del biosensor en matriz de agua, evidenciando un posible efecto matriz en el método. Aparentemente la señal del biosensor no se ve afectada por la grasa, ya que como se acabó de mencionar la señal de la corriente medida como porcentaje de inhibición denota una alta respuesta, incluso para concentraciones muy bajas del inhibidor como lo es el valor de 2 µg/L.

Al igual que para la matriz de agua y de leche cruda, las señales de inhibición más intensas para la matriz de leche deslactosada utilizando el biosensor amperométrico, se obtuvieron utilizando el electrodo de carbono con ferrocianuro como potencializar electroquímico.

Conclusiones

El pesticida clorpirifos actúa como un inhibidor de tipo incompetitivo, produciendo una disminución en el valor de la $V_{máx}$ y el k_m de la enzima.

Los resultados óptimos para la inmovilización enzimática mediante “cross linking” se obtuvieron utilizando cantidades grandes de concentración de enzima (100U) sobre electrodos de carbono.

Se notó un aumento de la corriente eléctrica utilizando los electrodos de carbono con potencializadores electroquímicos como el azul Prusia y el ferrocianuro.

La validación de la técnica para la detección de clorpirifos mediante cromatografía CG/EM cumplió con los criterios de Linealidad, Precisión, Exactitud y Especificidad, reportados en la guía SANTE 11945/2015. Además se concluye que se presenta un efecto matriz.

Se evidencia un posible efecto matriz con la leche en el uso del método de la detección de clorpirifos en leche mediante un biosensor amperométrico.

Para el caso de las tres evaluaciones en diferentes matrices (agua, leche cruda, leche descremada), el tipo de electrodo que presentó una mayor señal en cuanto al porcentaje de inhibición fue el de carbono con ferrocianuro.

Aparentemente no se evidencia una interferencia de la señal de la corriente eléctrica por la composición de la grasa en la leche.

Para una matriz de leche cruda el biosensor amperométrico evaluado en este trabajo de investigación para la determinación de clorpirifos, puede ser utilizado en concentraciones inferiores a 20 $\mu\text{g/L}$ cuyo valor corresponde al límite residual permitido por la OMS.

Recomendaciones

Como un complemento que se debe realizar para agregarle confiabilidad y robustez al biosensor enzimático amperométrico como instrumento de medida para la determinación de clorpirifos, evaluado a lo largo de este proyecto de investigación, es comenzar el proceso de validación de dicha herramienta en matriz de leche cruda.

Lista de Referencias

- Ahmed, H.F. 2000. Monitoring methyl parathion residues in milk and yogurt, and fate of methyl parathion during milk processing. *Bull Environ Contam Toxicol* 65: 207-214.
- Aktar, W., Sengupta, D., Howdhury, A. 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Inter-disc Toxicol*. 2: 1-12.
- Alavanja, M.C.R., Samanic, C., Dosemeci, M., Lubin, J., Tarone, R., Lynch, C.F., Knott, C., Thomas, K., Hoppin, J.A., Barker, J., Coble, J., Sandler, D.A., Blair, A. 2003. Use of agricultural pesticides and prostate cancer risk in the Agricultural Health Study cohort. *Am J Epidemiol* 157(9):800-14.
- Andreescu, S., Marty, J.L. 2006. Twenty years research in cholinesterase biosensors: from basic research to practical applications. *Biomolecular Engineering*, 23(1), 1–15
- Andreescu, S., Barthelmebs, L., Barthelmebs, J.-L. 2002. Immobilisation of AChE on screen-printed electrodes: comparative study between three immobilization methods applications to the detection of organophosphorus insecticides, *Anal. Chim. Acta* 464, 171–180.
- Andreescu, S., Fournier, D., Marty, J.-L., 2003. Development of highly sensitive sensor based on bio-engineered acetylcholinesterase immobilized by affinity method. *Anal. Lett.* 39, 1865–1885.
- Andreescu, S., Noguier, T., Magearu, V., Marty, J.-L. 2002. Screen-printed electrode based on AChE for the detection of pesticides in presence of organic solvents. *Talanta* 57, 169–176.
- AOAC Official Method 2007.01. Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate, Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, First Action 2007. Disponible en: https://nucleus.iaea.org/fcris/methods/AOAC_2007_01.pdf
- Arduini, F., Guidone, S., Amine, A., Palleschi, G., & Moscone, D. 2013. Acetylcholinesterase biosensor based on self-assembled monolayer-modified gold-screen printed electrodes for organophosphorus insecticide detection. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 179, 201–208. <http://doi.org/10.1016/j.snb.2012.10.016>
- Asociación de procesadores de la leche, Asoleche. 2017. Aumento en el consumo de lácteos en Colombia en 2016 Disponible en: <http://asoleche.org>
- Bennett, D., Chung, A.C., Lee, S.M. 1997. Multiresidue method for analysis of pesticides in liquid whole milk. *J AOAC Int* 80: 1065-1077.
- Bernabei, M., Cremisini, C., Mascini, M., Palleschi, G. 1991. Determination of organophosphorus and carbamic pesticides with a choline and acetylcholine electrochemical biosensor. *Anal. Lett.* 24, 1317–1331.
- Bonnet, C., Andreescu, S., Marty, J.-L.. 2003. Adsorption: an easy and efficient immobilisation of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes. *Anal. Chim. Acta* 481, 209–211
- Brodesser, J., Byron D.H., Cannavan A., Ferris I.G., Gross-Helmert, K., Hendrichs, J., Maestroni, B.M., Unsworth, J., Vaagt, G., Zapata, F. 2006. Pesticides in developing countries and the International Code of Conduct on the distribution and the use of pesticides. Austrian Agency for Health and Food Safety (AGES). Meeting on Risks and Benefits of Pesticides, March 30, Vienna, Austria. 6 pp
- Choi, K., Joo, H., Rose, R.L., Hodgson, E. 2006. Metabolism of chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon by human hepatocytes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 20(6), 279–91.

- Cooper, J., Dobson, H. 2007. The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop Protection* 26: 1337- 1348.
- CORPOICA C.I Nataima. 2007. Manual técnico para la preparación, uso, manejo y certificación de productos para una agricultura ecológica en Colombia.
- Cremisini, C., Di Sario, S., Mela, J., Pilloton, R., Palleschi, G., 1995. Evaluation of the use of free and immobilised acetylcholinesterase for paraoxon detection with an amperometric choline oxidase based biosensor. *Anal. Chim. Acta* 311, 273–280.
- Departamento Administrativo de Estadística, DANE. 2012. Conciliación Censal 1985-2005 y Proyecciones de Población 2005-2020. Disponible en: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/poblacion/proyepobla06_20/7Proyecciones_poblacion.pdf
- di Muccio A, Pelosi P, Camoni I, Barbini DA, Dommarco R, Generali T, Ausili A. 1996. Selective, solid-matrix dispersion extraction of organophosphate pesticide residues from milk. *J Chromatogr A* 754: 497-506.
- Eddleston, M., Hillips, M. R. 2004. Self Poisoning with Pesticides. *British Medical Journal*, 328:42-4.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. 1960. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95. Engel, L.S., Hill, D.A., Hoppin, J.A., Lubin, J.H., Lynch, C.F., Pierce, J., Samanic, C., Sandler, D.P., Blair, A., Alavanja, M.C. 2005. Pesticide use and breast cancer risk among farmers' wives in the Agricultural Health Study. *Am J Epidemiol* 161(2):121-35.
- Fernández, A., D., Mancipe, G. L., Fernández A. D. 2010. Intoxicación por organofosforados Introducción Plaguicidas, 18(49), 84–92.
- Fernando, J.F., Rogers, K.R., Anis, N.A., Valdes, J.J., Thompson, R.G., Eldefrawi, A.T., Eldefrawi, M.E., 1993. Rapid detection of anticholinesterase insecticides by a reusable light addressable potentiometric biosensor. *J. Agric. Food Chem.* 41, 511–516.
- Ferri, D., Gaviña, P., Costero, A. M., Parra, M., Vivancos, J.L., Martínez-Máñez, R. 2014. Detection and discrimination of organophosphorus pesticides in water by using a colorimetric probe array. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 202, 727–731.
- Fillion, J, S.auvé, F., Selwyn, J. 2000. Multiresidue method for the determination of 251 pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography/ mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection. *J AOAC Int* 83: 698-713.
- Freire, C., Koifman, S. 2012. Pesticide exposure and Parkinson's disease: epidemiological evidence of association. *Neurotoxicology*, 33(5), 947-971
- Font, G., Picó, Y., Juan, A. 2003. Revisión de los métodos de determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en alimentos. *Toxicol*, 20, 166–175.
- Food Standars FAO/WHO 2013. Pesticide Residues in Food and Feed. Maximum Residue Limits for Chlorpyrifos.
- Ghindilis, A.L., Morzunova, T.G., Barmin, A.V., Kurochin, I.N., 1996. Potentiometric biosensors for cholinesterase inhibitor analysis based on mediatorless bioelectrocatalysis. *Biosens. Bioelectron.* 11, 873–880.
- González, P. 2004. Riesgos químicos por uso de plaguicidas en el medio ambiente. *Federacio De Serveis I Administracions Publiques*, 1–135.
- Guyton A, Hall J. 2006. *Textbook of Medical Physiology*, Eleventh Edition., pág 752
- Hartley, I.C., Hart, H.P., 1994. Amperometric measurement of organophosphate pesticides using a screen-printed disposable sensor and biosensor based on cobalt phthalocyanine. *Analytical Proceedings Including Analytical Communications* 31, 333–337
- Hart, A.L., Collier, W.A., Janssen, D., 1997. The response of screen-printed electrodes containing cholinesterases to organo-phosphate in solution and from commercial formulation. *Biosens. Bioelectron.* 12, 645–654.
- Hogendoorn, E.A., Ossendrijver, F-M-, Dijkman, E., Baumann, R.A. 1999. Rapid determination of glyphosate in cereal samples by means of pre-columns derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr A* 833: 67-73.

- Hosea, N.A., Berman, H.A., Taylor, P. 1995. Specificity and orientation of trigonal carboxi esters and tetrahedral alkylphosphonyl esters in cholinesterases. *Biochemistry* 34, 11528–11536.
- ICA, 2016. Registros nacionales de Pesticidas. Disponible en: <http://www.ica.gov.co/getdoc/d3612ebf-a5a6-4702-8d4b-8427c1cdaeb1/REGISTROS-NACIONALES-PQUA-15-04-09.aspx>
- Imato, T., Ishibashi, N., 1995. Potentiometric butyrylcholine sensor for organophosphate pesticides. *Biosens. Bioelectron.* 10, 435–441
- Jiménez, C., León, D. 2009. Biosensores: Aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios. *Revista de la facultad de química farmacéutica*, 16(1), 144-154.
- Joshi, K.A., Tang, J., Haddon, R., Wang, J., Chen, W., Mulchaldani, A., 2005. A disposable biosensors for organophosphorus nerve agents based on carbon nanotubes modified thick film strip electrodes. *Electroanalysis* 17, 54–58
- Kadara, R. O., Jenkinson, N., Banks, C. E. 2009. Characterization and fabrication of disposable screen printed microelectrodes. *Electrochem. Commun.* 11:13-77.
- Kumaran, S., Morita, M., 1995. Application of a cholinesterase biosensor to screen for organophosphorus pesticides extracted from soil. *Talanta* 4, 649– 655.
- Lee, W.J., Sandler, D.P., Blair, A., Samanic, C., Cross, A.J., Alavanja, M.C.R. 2007. Pesticide use and colorectal cancer risk in the Agricultural Health Study. *Int J Cancer* 121:339-46.
- Lee, W.J., Blair, A., Hoppin, J.A., Lubin, J.H., Rusiecki, J.A., Sandler, D.P., Dosemeci, M., Alavanja, M.C.R. 2004. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to chlorpyrifos in the agricultural health study. *J Nat Cancer Instit* 96(23):1781-9.
- Lee, H.S., Kim, Y.A., Chao, Y.A., Lee, Y.T., 2002. Oxidation of organophosphorus pesticides for the sensitive detection by a cholinesterase-based biosensor. *Chemosphere* 46, 571–576.
- Li, M., Li, Y-T., Li, D-W., Long Y-T. 2012. Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays-A review. *Anal. Chim. Acta* 734, 19-31
- Lin, G., Lee, Y.R., Liu, Y.C., Wu, Y.G. 2005. Ortho effect for inhibition mechanisms of butyrylcholinesterase by o-substitute phenyl L-butyl carbamates and comparison with acetylcholinesterase, cholesterol esterase, and phenol, *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1124–1131
- Li, Y.G., Zhou, Y.X., Feng, J.L., Jiang, Z.H., Ma, L.R.. 1999. Immobilisation of enzyme on screen-printed electrode by exposure to glutaraldehyde vapour for the construction of amperometric acetylcholinesterase electrodes. *Anal. Chim. Acta* 382, 272–282.
- Lin, Y.H., Lu, F., Wang, J., 2004. Disposable carbon nanotube modified screen- printed biosensor for amperometric detection of organophosphorus pesticides and nerve agents. *Electroanalysis* 16, 145–149.
- Lotti, M. 1995. Cholinesterase Inhibition: Complexities in Interpretation. *Clinical Chemistry*, 41:1814-8.
- March, G. J. 2014. Agricultura y plaguicidas: Un análisis global. 1a ed. - Rio Cuarto : FADA - Fundación Agropecuaria para el Desarrollo de Argentina.
- Martorell, D., Cespedes, F., Martinez-Fabregas, E., Alegret, S. 1997. Determination of organophosphorus and carbamate pesticides using a biosensor based on polyshable 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane-modified graphite-epoxy biocomposite. *Anal. Chim. Acta* 337, 305–313.
- Marty, J.L., Sode, K., Karube, I. 1992. Biosensor for detection of organophosphate and carbamate insecticides. *Electroanalysis* 4, 249–252.
- Morales, C., Rodríguez, N., Restrepo, L. F., López, C. 2010. Relación entre residuos de clorpirifos en leche y sangre de vacas Holstein y niveles séricos de estradiol y tiroxina. *Revista electrónica de Veterinaria*, 11(1), 1-22.
- Moretto, A., Colosio, C. 2013. The role of pesticide exposure in the genesis of Parkinson's disease: epidemiological studies and experimental data. *Toxicology*, 307, 24-34
- Noguer, T., Leca, B., Jeanty, G., Marty, J.-L., 1999. Biosensors based on enzyme inhibition. Detection of organophosphorus and carbamate insecticides and dithiocarbamate fungicides. *Field Anal. Chem. Technol.* 3, 171–178.
- Nunes, G.S., Barcelo, D., Grabaric, B.S., Diaz-Cruz, J.M., Ribeiro, M.L., 1999. Evaluation of highly sensitive amperometric biosensor with low cholinesterase charge immobilized on a chemically modified carbon paste electrode for trace determination of carbamates in fruit, vegetable and water samples. *Anal. Chim. Acta* 399, 37–49

- Oerke, E.C. 2006. Crop losses to pest. *Journal of Agricultural Science* 144: 31-43.
- Palleschi, G., Bernabei, M., Cremisini, C., Mascini, M. 1992. Determination of organophosphorus insecticides with a choline electrochemical biosensor. *Sens. Actuators B* 7, 513–517.
- Pohanka, M., Musilek, K., Kuca, K. 2009. Progress of biosensors based on cholinesterase inhibition, *Curr. Med. Chem.* 16, 1790–1798.
- Pope, C.N. 2006. Central nervous system effects and neurotoxicity. In R. C. Gupta (Ed.), *Toxicology of organophosphate & carbamate compounds* (pp. 271-291). Burlington: Academic Press. *Pharmacology*, 256(3), 379-385.
- Pauli, W. M., O'Reilly, R. C. 2008. Attentional control of associative learning: a possible role of the central cholinergic system. *Computational Cognitive Neuroscience*, 1202, 43-53.
- Pereira, E. F. R., Aracava, Y., DeTolla, L. J., Beecham, E. J., Basinger, G. W., Wakayama, E. J. 2014. Animal models that best reproduce the clinical manifestations of human intoxication with organophosphorus compounds. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 350(2), 313-321.
- Pi, Y., Zhang, L., Chang, K., Li, B., Guo, L., Fang, C. 2012. Lack of an association between Paraoxonase 1 gene polymorphisms (Q192R, L55M) and Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Neuroscience Letters*, 523(2), 174-179.
- Pope, C.N. 2006. Central nervous system effects and neurotoxicity. In R. C. Gupta (Ed.), *Toxicology of organophosphate & carbamate compounds* (pp. 271-291).
- Pundir, C. S., Chauhan, N. 2012. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: a review. *Analytical Biochemistry*, 429(1), 19–31.
- Rainier, S., Bui, M., Mark, E., Thomas, D., Tokarz, D., Ming, L. 2008. Neuropathy target esterase gene mutations cause motor neuron disease. *American Journal of Human Genetics*, 82(3), 780-785.
- Ramírez, Juan. 2009. APUNTES DE ELECTROQUÍMICA II. Instituto Politécnico Nacional Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Disponible en: [http://www.biblioteca.upibi.ipn.mx/Archivos/Material%20Didactico/Apuntes%20de%20Electroqu%C3%ADmica%20II%20\(17nov09\).pdf](http://www.biblioteca.upibi.ipn.mx/Archivos/Material%20Didactico/Apuntes%20de%20Electroqu%C3%ADmica%20II%20(17nov09).pdf)
- Ricci, F., & Palleschi, G. (2005). Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. *Biosensors & Bioelectronics*, 21(3), 389–407.
- Ridge, P. G., Ebbert, M. T. W., Kauwe, J. S. K. 2013. Genetics of Alzheimer's disease. *BioMed Research International*, 25, 49-54.
- Rodríguez, D.C., Carvajal, S., Peñuela, G. 2013. Effect of chlorpyrifos on the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase by cross-linking in water-supply samples and milk from dairy cattle. *Talanta*, 111, 1-7.
- Ronald, D., Pawloski, T.M. 1997. Matrix-induced enhancement of pesticides in gas chromatography: is there a solution. *J High Resolut Chromatogr* 20: 375-378.
- Rouillon, R., Mionetto, N., Marty, J.L., 1992. Acetylcholine biosensor involving entrapment of two enzymes. Optimization of operational and storage conditions. *Anal. Chim. Acta* 268, 347–350.
- Sánchez Santed, F., Colomina, M. T., Herrero Hernández, E. 2015. Organophosphate Pesticide exposure and neurodegeneration. *Cortex*, 74, 417–426.
- SANTE/11945. 2015. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Disponible en: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945.pdf
- Scouten, W. H., Luong, J. H. T., Brown, R. S. 1995. Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design. *TIBTECH*, 13, 178–185.
- Schenck, F.J., Wagner, R. 1995. Screening procedure for organochlorine and organophosphorus pesticide residues in milk using matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction and gas chromatographic determination. *Food Add Contam* 12: 535- 541.
- Schenck, F.J., Casanova, J.A. 1999. Rapid screening for organochlorine and organophosphorus pesticides in milk using C18 and graphitized carbon black solid phase extraction cleanup. *J Environ Sci Health* 34: 349-362.
- Skladal, P. 1996. Biosensors based on cholinesterases for detection of pesticides. *Food Technol. Biotechnol.* 34, 43–49.

- Skladal, P., Fiala, M., Krejci, J., 1996. Detection of pesticides in the environment using biosensors based on cholinesterases. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 65, 139–148
- Silva Nunes, G., Jeanty, G., & Marty, J.-L. 2004. Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides. *Analytica Chimica Acta*, 523(1), 107–115.
- Sotiropoulou, S. Chaniotakis, N.A. 2005. Tuning the sol–gel microenvironment for acetylcholinesterase encapsulation, *Biomaterials*. 26, 6771–6779.
- Schreinemachers, P., Tipraqsa, P. 2012. Agricultural pesticides and land use intensification in high, middle and low income countries. *Food Policy*, 37(6), 616–626.
- Swinnen, B., Robberecht, W. 2014. The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, 10(11), 661–670
- Upadhyay, S. Rao, G.R. Sharma, M.K. Bhattacharya, B.K. Rao, V.K. Vijayaraghavan, R. 2009. Immobilization of acetylcholinesterase–choline oxidase on a gold–platinum bimetallic nanoparticles modified glassy carbon electrode for the sensitive detection of organophosphate pesticides, carbamates, and nerve agents, *Biosens. Bioelectron.* 25 832–83
- Vázquez, Mario. 2016. Voltametría cíclica. Plataforma académica para pregrado y posgrado, Universidad de Antioquia. Disponible en: <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/mod/page/view.php?id=54362>
- Voet, D., Voet J., Pratt C. 2007. *Fundamentos de bioquímica. La vida a nivel molecular.* Madrid, España: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Waterfield G., Zilberman D. 2012. Pest management in food systems: and economic perspective. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 37: 223-245.
- Watts, M. 2012. Clorpirifos: Un posible COP a nivel global. Pesticide Action Network Norteamérica (PANNA).
- Whitford, F., Pike, D., Hanger, G., Burrough, F., Johnson, B., Blessing, A. 2009. The benefits of pesticides. A story worth telling. *Purdue Extension PPP-70.* 33 pp.
- Wijeyesakere, S. J., Fink, J. K., Makhaeva, G. F. 2013. Neurotoxicity target esterase (NTE): overview and future. *Chemico-Biological Interactions*, 203(1), 238-244.
- Wink, T. Van Zuilen, S.J. Bult, A. Van Bennekom, W.P. 1997. Self-assembled monolayers for biosensors, *Analyst* 122 43R–50R.
- Gooding, J.J. Hibbert, D.B. 1999. The application of alkanethiols self-assembled monolayers to enzyme electrodes, *Trends Anal. Chem.* 18, 525–532.



V.°B.° Gustavo Peñuela
Asesor



V.°B.° Juan Bernardo Cano
Coasesor