

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
MÓDULO DE QUÍMICA ANALÍTICA****BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA LA
DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN AGUAS**

Autor/a: Silvia Royano Martínez

Tutor/a: Juan Carlos Bravo Yagüe

**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

Junio de 2020

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	ii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. PESTICIDAS.....	4
3.1. Pesticidas organoclorados.....	5
3.2. Pesticidas organofosforados.....	6
3.3. Carbamatos.....	8
3.4. Otros.....	9
3.5. Presencia de pesticidas en aguas.....	10
4. BIOSENSORES.....	12
4.1. Clasificación de biosensores.....	13
4.1.1. <i>En función del sistema de reconocimiento</i>	14
4.1.2. <i>En función del sistema de transducción</i>	15
4.2. Biosensores electroquímicos.....	16
4.2.1. <i>Biosensores amperométricos</i>	16
4.2.2. <i>Biosensores potenciométricos</i>	17
4.2.3. <i>Biosensores conductimétricos</i>	19
4.3. Técnicas de inmovilización del sistema de reconocimiento biológico.....	19
4.4. Tipos de electrodos.....	22
5. BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN AGUAS.....	26
5.1. Biosensores catalíticos.....	27
5.2. Biosensores de afinidad.....	36
6. CONCLUSIONES.....	47
7. BIBLIOGRAFIA.....	48

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

2.4-D – Ácido 2,4- diclorofenoxiacético

3DG – Estructura 3D de grafito

AChE- Enzima Acetilcolinesterasa

AgNW – Nanofibras de plata

AuNP – Nanopartículas de oro

Au-SPE – Electrodo serigrafiado de oro

BChE – Enzima Butirilcolinesterasa

BDD – Electrodo de diamante dopado con boro

CBNP – Nanopartículas de negro de carbón

ChOx – Enzima Colina Oxidasa

CNT – Nanotubos de carbono (Carbon Nanotubes)

CS - Quitosano

EIS – Espectroscopía de Impedancia Electroquímica

ESI – Electrodo selectivo de iones

FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

GC – Cromatografía de gases

GCE – Electrodo de carbono vítreo

GO – Óxido de grafeno

HPLC - Cromatografía líquida de alta eficacia

HRP – Peroxidasa de rábano

IDE – Electrodo interdigitado

ITO – Cristal de óxido de titanio e indio

IUPAC - Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

LC – Cromatografía Líquida

LOD – Límite de detección

MS – Espectrometría de masas

Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.

MWCNT - Nanotubos de carbono de pared múltiple

c-MWCNT - Nanotubos de carbono de pared múltiple funcionalizados con grupos carboxilo

OMS – Organización Mundial de la Salud

ONU – Organización de las Naciones Unidas

OPH – Enzima Organofósforo Oxidasa

PB – Azul de Prusia

PGE – Electrodo de barra de grafito

PNP – p-nitrofenol

PtNW – Nanofibras de platino

PVC – Cloruro de polivinilo

PW – Blanco de Prusia

rGO – Óxido de grafeno reducido

SPCE – Electrodo serigrafiado de carbono

SPE – Electrodo serigrafiado

SWCNT – Nanotubos de carbono de pared simple

Tyr – Enzima Tirosinasa.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales aplicaciones de los pesticidas.

Tabla 2. Ejemplos de pesticidas organoclorados.

Tabla 3. Ejemplos de pesticidas organofosforados.

Tabla 4. Ejemplos de carbamatos.

Tabla 5. Ejemplos de pesticidas heterocíclicos y neonicotinoides.

Tabla 6. Ventajas del empleo de biosensores frente a técnicas cromatográficas.

Tabla 7. Tipo de electrodos encontrados en la bibliografía.

Tabla 8. Resumen de los distintos biosensores electroquímicos aplicados a diferentes muestras de agua para la detección de pesticidas.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Consumo de pesticidas por continentes en 2017.

Figura 2. Evolución de las investigaciones en el campo de biosensores para la determinación de pesticidas en muestras de agua.

Figura 3. Uso de los diferentes tipos de pesticidas en función de su aplicación.

Figura 4. Estructura química de (a) ácido ortofosfórico, (b) ácido tiofosfórico y (c) pesticida organofosforado.

Figura 5. Ciclo de los plaguicidas en el medio acuático.

Figura 6. Esquema de un sensor químico.

Figura 7. Clasificación de biosensores en función del mecanismo de reconocimiento y del sistema de transducción.

Figura 8. Esquema de los distintos tipos de biosensores en función del sistema de reconocimiento. (i) Biosensores catalíticos y (ii) de afinidad.

Figura 9. Esquema de un sistema de tres electrodos. 1: electrodo de trabajo, 2: electrodo auxiliar, 3: electrodo de referencia.

Figura 10. Esquema de un sistema de dos electrodos. 1: electrodo de trabajo, 2: electrodo de referencia.

Figura 11. Esquema del funcionamiento de un ESI.

Figura 12. Diferentes inmobilizaciones de las biomoléculas sobre la superficie del electrodo.

Figura 13. Inmovilización física: (A) adsorción por fuerzas intramoleculares y (B) por fuerzas electrostáticas.

Figura 14. Inmovilización física mediante atrapamiento.

Figura 15. Inmovilización química mediante enlace covalente.

Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.

Figura 16. Inmovilización química mediante entrecruzamiento (crosslinking).

Figura 17. Esquema de un electrodo convencional tipo barra.

Figura 18. (IZQ) SPE comerciales. (DCHA) Esquema de la disposición de los electrodos en un SPE.

Figura 19. Proceso de fabricación de un SPE.

Figura 20. Esquema de un electrodo interdigitado (IDE).

Figura 21. Esquema general del proceso de fabricación de un biosensor electroquímico.

1. INTRODUCCIÓN

El agua es uno de los bienes más importantes de nuestro planeta. Debemos cuidarla, pero la realidad es que la actividad humana está incrementando la concentración de diversos contaminantes, poniendo en peligro su calidad y la salud de los ecosistemas. Uno de los grupos de contaminantes más analizados y más controlados, debido al número de intoxicaciones que provocan en todo el planeta, son los pesticidas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año se intoxican dos millones de personas por estas sustancias (Lucas-Viñuela, 2001).

Pese a su elevada toxicidad, las sustancias químicas son producidas y utilizadas en grandes cantidades. Los pesticidas en particular, son empleados sobre grandes superficies en diferentes terrenos como el espacio urbano o industrial. No obstante, su principal aplicación se centra en la agricultura, donde se emplean para luchar contra plagas de organismos que pueden acabar con las cosechas. Estas cosechas son esenciales en la alimentación por lo que es necesario garantizar su éxito. La División de Población de las Naciones Unidas pronostica que en 2050 la población mundial habrá crecido en más de un 20% (ONU, 2019). Cubrir las necesidades de una población cada vez más numerosa, genera en la industria agrícola la necesidad de introducir mecanismos y tecnologías que permitan garantizar la productividad y calidad de las cosechas.

Se estima que el uso de pesticidas a nivel mundial oscila entre 3 y 4 millones de toneladas al año, de las cuales aproximadamente 360.000 corresponden a Europa (Domenect, 2004; Bucur et al., 2018). Sin embargo, Asia consume la mitad del total de pesticidas fabricados a nivel mundial.

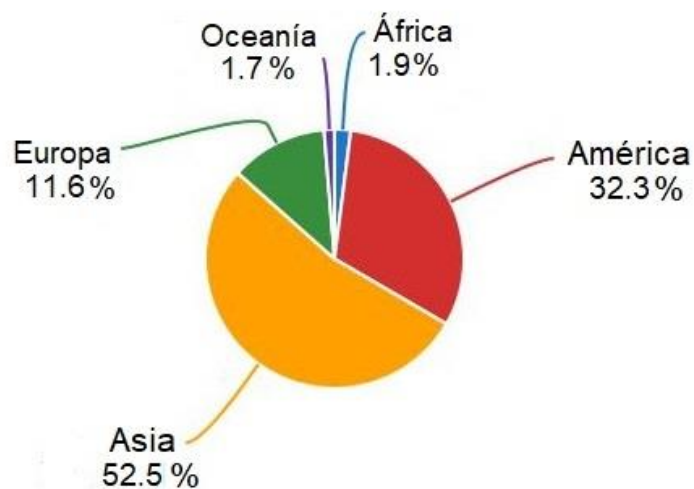


Figura 1. Consumo de pesticidas por continentes en 2017. Fuente: FAOSTAT.

Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.

El uso masivo de estos compuestos eleva peligrosamente su concentración, no solo en el suelo y los alimentos cosechados, sino también en el agua, tanto superficial como subterránea, con el consiguiente efecto tóxico que puede generar en los seres vivos.

Estas sustancias que tienen diferentes tiempos de vida en su forma original, pueden derivar en metabolitos cuya toxicidad sea mayor o sean menos degradables, aumentando su permanencia en el medio. Por tanto, si queremos conocer el estado y la calidad del agua en todo momento, y así poder evitar futuros problemas de bioacumulación, es importante el monitoreo continuo de contaminantes, en especial de pesticidas.

La forma más habitual de analizar la presencia de pesticidas en agua, se basa en el empleo de técnicas cromatográficas como LC-MS (Muckoya et al., 2020), HPLC-UV (Silva et al., 2013) o GC-MS (Feo et al., 2010), previa extracción del analito con métodos como la extracción líquido-líquido (Muckoya et al., 2020), extracción en fase sólida (Tankiewicz et al., 2010) o técnicas más sofisticadas como la extracción asistida con ultrasonidos (Feo et al., 2010). Sin embargo, el coste y el tiempo que hay que invertir en este tipo de determinaciones han hecho que numerosos científicos desarrollen nuevas tecnologías y mejoren las ya existentes. En este ámbito, el desarrollo y empleo de biosensores se ha multiplicado en los últimos años.

Pese a ser ampliamente aplicados en el campo de la medicina, el desarrollo de biosensores electroquímicos aplicados a la determinación de pesticidas en agua viene aumentando desde los últimos 20 años (Figura 2). Principalmente biosensores de tipo enzimático, han conseguido un gran interés en el análisis de la toxicidad de diversas sustancias y en la monitorización ambiental (Sinha et al., 2010). Sin embargo, para conseguir detectar estas sustancias presentes en tan bajas concentraciones, es necesario el empleo de tecnología suficientemente sensible, por lo que hay que prestar atención a las características analíticas que ofrecen estos dispositivos.

A lo largo del presente trabajo se tratará de documentar y evidenciar la capacidad de los biosensores electroquímicos en el análisis de pesticidas en muestras de agua para estudiar su aplicación en la monitorización ambiental.

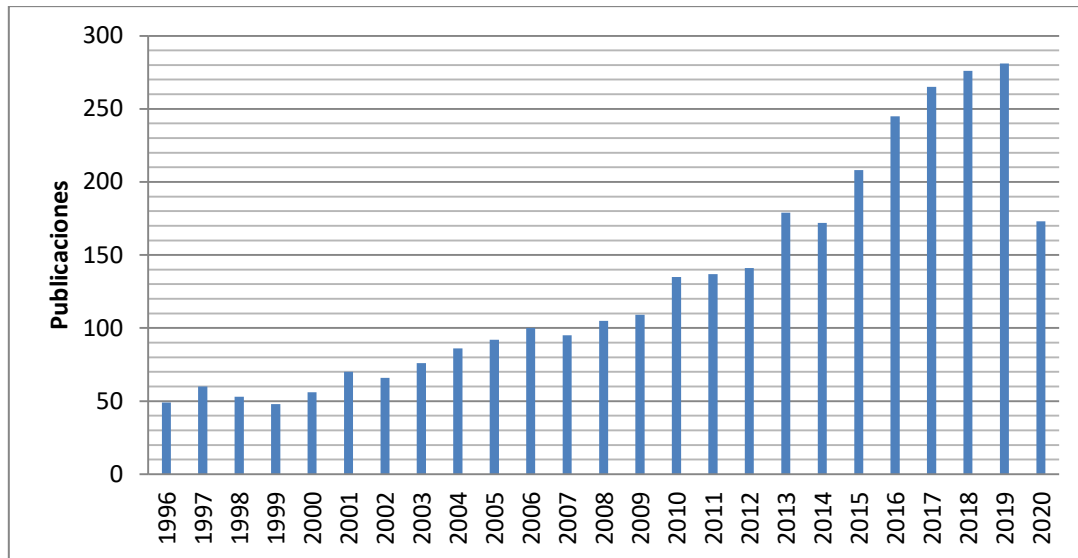


Figura 2. Evolución de las investigaciones en el campo de biosensores para la determinación de pesticidas en muestras de agua. Fuente: ScienceDirect.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es hacer una revisión de los últimos avances en el campo de los biosensores electroquímicos aplicados a la determinación de pesticidas en muestras de aguas.

Para lograr el objetivo principal, se establecen los siguientes objetivos específicos todos ellos referidos al análisis de pesticidas en aguas:

- Realizar un estudio comparativo de los diferentes materiales biológicos utilizados como sistema de reconocimiento en biosensores electroquímicos.
- Realizar un estudio comparativo de los diferentes tipos de detección electroquímica, evaluando sus ventajas en función de la sensibilidad que presentan.
- Realizar un estudio comparativo de los diferentes materiales utilizados en la modificación de electrodos, evaluando las mejoras que ofrecen a las características analíticas del dispositivo.
- Realizar un estudio comparativo de los principales métodos de inmovilización utilizados en la modificación de la superficie de los electrodos, evaluando sus ventajas en cuanto la estabilidad del biosensor.

3. PESTICIDAS

La FAO define los pesticidas como *cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, repeler o combatir plagas o especies no deseadas de plantas o animales que causen perjuicio en su producción* (Lucas-Viñuela, 2001), es decir, son sustancias que se utilizan con el objetivo de controlar las plagas que afectan al crecimiento de cosechas. Sin embargo, aunque su aplicación principal es la protección de cultivos, también son sustancias empleadas para eliminar microorganismos de diferentes medios y superficies como textiles, piscinas e incluso la conservación del papel (Tankiewicz et al., 2010).

Tabla 1. Principales aplicaciones de los pesticidas (Tankiewicz et al., 2010).

<ul style="list-style-type: none">• Eliminar plagas de insectos para mejorar el crecimiento de plantas.
<ul style="list-style-type: none">• Destruir malas hierbas
<ul style="list-style-type: none">• Incrementar y regular la población de animales o plantas
<ul style="list-style-type: none">• Proteger textiles de microorganismos
<ul style="list-style-type: none">• Prevenir el crecimiento de algas en piscinas
<ul style="list-style-type: none">• Prevenir hongos en productos de papel

Para clasificar los pesticidas se puede atender a su aplicación u objetivo. De esta manera se obtienen grupos, como son los herbicidas, insecticidas, fungicidas, rodenticidas, etc., en función de su aplicación contra malas hierbas, plagas de insectos, plagas fúngicas o de roedores, respectivamente (Xiang et al, 2020).

También se pueden clasificar en función de su estructura química. Para conocer sus propiedades fisicoquímicas y su comportamiento en el medio, parece más conveniente esta clasificación. De esta manera se pueden diferenciar varias familias: organoclorados, organofosforados, carbamatos, pesticidas heterocíclicos o neonicotinoides entre otros.

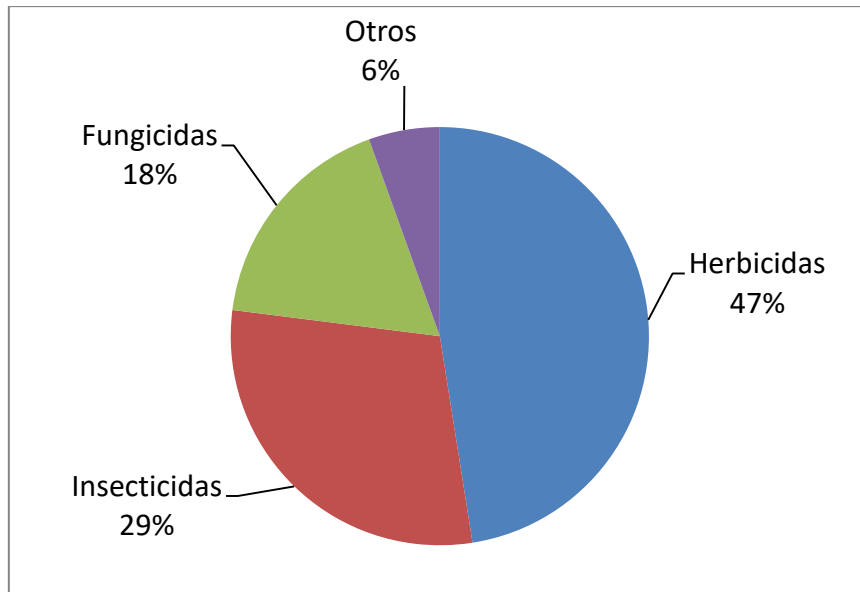


Figura 3. Uso de los diferentes tipos de pesticidas en función de su aplicación (Sharma et al., 2019).

3.1. Pesticidas organoclorados

Son sustancias sintéticas cuya estructura química corresponde principalmente a hidrocarburos aromáticos con átomos de cloro. Fueron los primeros pesticidas usados contra plagas de insectos por su efectividad atacando a su sistema nervioso.

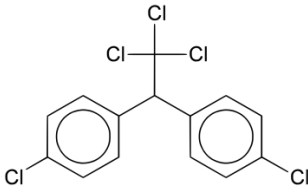
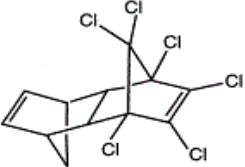
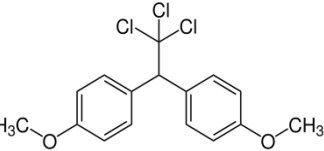
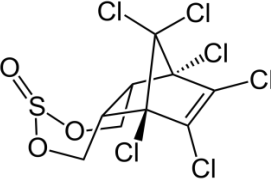
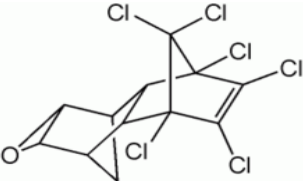
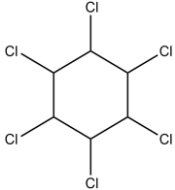
Estas sustancias son muy estables y resisten a la degradación por factores como la luz o el calor. Además, son liposolubles, lo que facilita la acumulación en los seres vivos (bioacumulación) y la consiguiente magnificación en la cadena alimentaria. Estas características fisicoquímicas, hacen de los pesticidas organoclorados sustancias muy persistentes en el medio y altamente tóxicas.

Las intoxicaciones agudas por pesticidas organoclorados pueden presentar sintomatología como náuseas, vómitos, diarrea, confusión, somnolencia o convulsiones entre otros (Ferrer, A., 2003). Mientras que por intoxicaciones crónicas se pueden desarrollar diferentes clases de tumores, como el de hígado, o sufrir distintas afecciones neuronales, como puede ser la enfermedad de Parkinson u otras demencias.

Su elevada estabilidad, su fácil acumulación y su poder tóxico hacen de esta clase los pesticidas más nocivos para la salud de los ecosistemas. Por ello algunos de los pesticidas organoclorados fueron incluidos en el Convenio de Estocolmo (2004) con el fin de eliminar o restringir su uso. La prohibición de estas sustancias en muchos países hizo que fueran

sustituidas por otros pesticidas menos tóxicos como los organofosforados o carbamatos que se expondrán a continuación.

Tabla 2. Ejemplos de pesticidas organoclorados.

Nombre	Fórmula	Nombre	Fórmula
DDT* (dicloro difeni tricloroetano)		Aldrín***	
Metoxicloro**		Endosulfán*	
Dieldrin***		Hexaclorociclo- hexano*	

(* : prohibido ** : en vigilancia, *** : en desuso (UTZ, 2015))

3.2. Pesticidas organofosforados

Son sustancias sintéticas derivadas del ácido ortofosfórico (o tiosfosfórico). Su estructura química básica es un éster fosfórico y consta de un átomo de fósforo, unido a un grupo saliente (X), a un átomo de oxígeno (o azufre) y a dos radicales alquilo (R1 y R2).

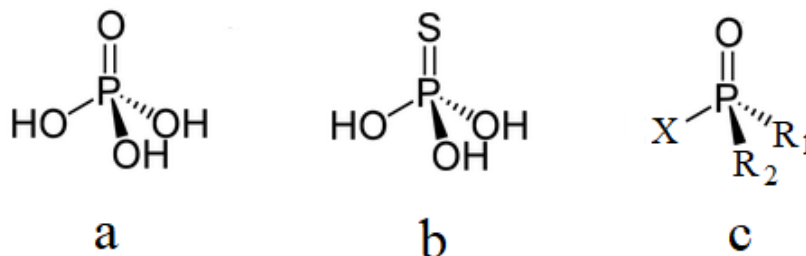


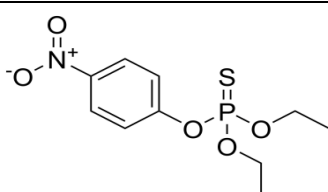
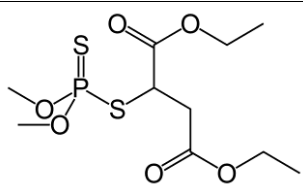
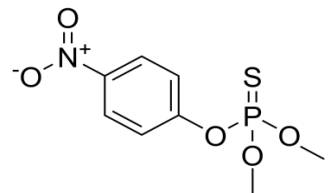
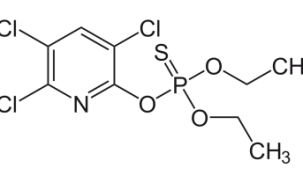
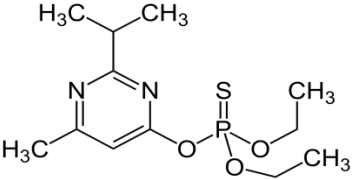
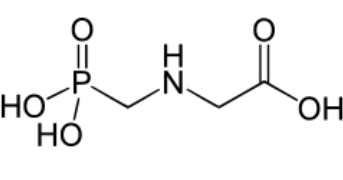
Figura 4. Estructura química de (a) ácido ortofosfórico, (b) ácido tiosfosfórico y (c) pesticida organofosforado.

Al igual que los organoclorados, su acción principal es ejercida como insecticida. La principal diferencia con los pesticidas organoclorados, es su poca estabilidad a pH básico. Esto hace más sencilla su degradación y reduce su persistencia en el medio ambiente. Sin embargo, también son liposolubles por lo que se pueden bioacumular en diferentes tejidos y al ser volátiles pueden ser absorbidos más fácilmente.

Sus efectos en los organismos vivos pueden ser similares a los de otras familias de pesticidas (irritación, dolencias respiratorias y digestivas, etc), pero su actividad se centra en la posibilidad de inhibición de enzimas como las colinesterasas. Estas enzimas son esenciales en el buen funcionamiento del sistema nervioso, y al verse alterado por la presencia de pesticidas organofosforados puede producir problemas cerebrales y parálisis muscular, llevando al organismo a la muerte. La inhibición de estas enzimas es la base para el empleo de estos pesticidas como insecticidas. Un ejemplo muy estudiado es la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) por parte de estos pesticidas organofosforados.

A pesar de su mayor biodegradabilidad y su menor persistencia en el medio, los pesticidas organofosforados siguen siendo altamente tóxicos para los animales (especialmente vertebrados) y por ello requieren una especial atención en su manipulación. Algunos de estos pesticidas también tienen prohibido su uso a nivel mundial.

Tabla 3. Ejemplos de pesticidas organofosforados.

Nombre	Fórmula	Nombre	Fórmula
Paratión*		Malatión**	
Metilparatión*		Clorpirifós**	
Diazinon		Glifosato**	

(* = prohibido ** = en vigilancia, ***en desuso (UTZ, 2015))

3.3. Carbamatos

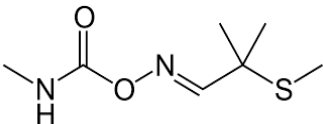
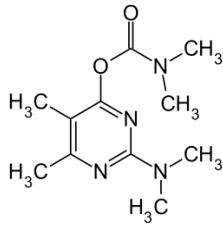
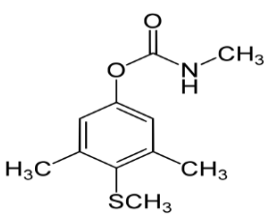
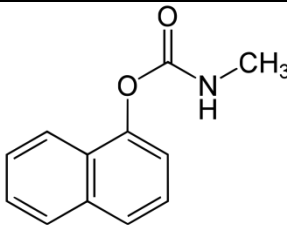
Son sustancias sintéticas derivadas de los ácidos N-metil o dimetilcarbámico (Blanco et al., 2013). Al igual que los organofosforados, son empleados como insecticidas por su capacidad de inhibir la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa (AChE). Sin embargo, esta unión es menos estable que la equivalente con pesticidas organofosforados, llegando a producir una inhibición reversible de la enzima (Ferrer, 2003). Por este motivo, los carbamatos son actualmente, junto con los pesticidas organofosforados, las sustancias más empleadas en la lucha contra las plagas de insectos.

Son sustancias con propiedades oxido-reductoras (Blanco et al., 2013), que se degradan a pH alcalinos y con aumento de la temperatura. Su baja estabilidad y nula bioacumulación, hacen de los carbamatos una alternativa al uso de organoclorados y organofosforados, a pesar de su todavía elevada toxicidad.

La reversibilidad de la inhibición enzimática hace que las intoxicaciones por carbamatos sean de duración limitada, aunque con sintomatología similar a los casos anteriores.

Algunos carbamatos son empleados también como fungicidas y herbicidas.

Tabla 4. Ejemplos de carbamatos.

Nombre	Fórmula	Nombre	Fórmula
Aldicarb*		Pirimicarb***	
Metiocarb*		Carbaril*	

(* : prohibido ** : en vigilancia, *** : en desuso (UTZ, 2015))

3.4. Otros

Compuestos heterocíclicos. Pueden ser compuestos cíclicos de 5 o 6 átomos que presentan heteroátomos. En el caso de presentar átomos de nitrógeno, se obtienen pesticidas derivados de la piridina, diazinas y triazinas utilizados principalmente como herbicidas.

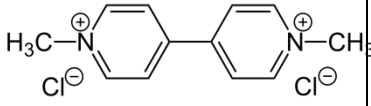
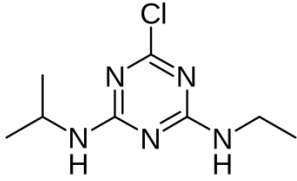
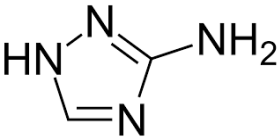
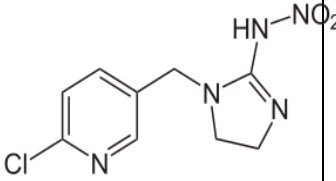
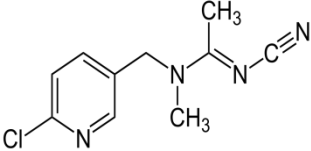
Algunos ejemplos muy conocidos son el Paraquat (derivado de la piridina) o la Atrazina (triazina).

Neonicotinoides. Son pesticidas con poder insecticida que atacan al sistema nervioso de los insectos, siendo menos agresivos frente a aves y mamíferos. Sin embargo, se ha demostrado que estos pesticidas son nocivos para las abejas.

Algunos ejemplos de pesticidas neonicotinoides son el Imidacloprid y el Acetamiprid.

Piretroides. Las piretrinas son insecticidas de origen natural poco estables en el medio ambiente. Sus derivados (piretroides) son insecticidas sintéticos con mejor estabilidad pero poco bioacumulables y además poco tóxicos para los mamíferos. Son neurotóxicos pero no inhiben la actividad de las colinesterasas, alteran los canales de sodio en las neuronas.

Tabla 5. Ejemplos de pesticidas heterocíclicos y neonicotinoides.

Nombre	Fórmula	Nombre	Fórmula
Paraquat*		Atrazina*	
Amitrol**		Imidacloprid*	
Acetamiprid*			

(* : prohibido ** : en vigilancia, *** : en desuso (UTZ, 2015))

3.5. Presencia de pesticidas en aguas

Aunque el 70% del planeta está cubierto por agua, únicamente el 3 % es agua dulce. Ésta recibe grandes cantidades de contaminantes, entre ellos los pesticidas, alcanzando los niveles más altos de contaminación de las aguas por estas sustancias en primavera (Tankiewicz et al., 2010).

La principal fuente de pesticidas en el medio ambiente es la agricultura por la aplicación de estas sustancias en los cultivos. Sin embargo, en cuanto a la presencia de pesticidas en el medio acuático, son diferentes caminos lo que pueden incrementar su concentración, como puede ser la filtración, vertidos industriales y urbanos, incluso a través de la atmósfera por transporte en suspensión de gotas producidas por pulverizaciones. Todo ello contribuye a la pérdida de calidad del agua en ríos, lagos, aguas subterráneas y aguas de consumo.

Cuando entran en un medio acuático pueden depositarse en sólidos y permanecer grandes periodos de tiempo. Además, algunos procesos de biotransformación pueden hacer que su estructura cambie, aumentando su toxicidad. Al ser liposolubles, muchos pueden acumularse en los tejidos de los animales acuáticos y pasar a la cadena alimentaria. De esta manera el ser humano está expuesto a los pesticidas por tres vías: exposición directa por aplicación en los campos, ingesta por el agua de consumo e ingesta a través de alimentos contaminados, ya sean productos cultivados o procedentes de aguas contaminadas.

Los niveles de concentración a los que se pueden encontrar los pesticidas en el medio acuático son bajos, lo que dificulta la detección. Sin embargo, aún en concentraciones bajas su persistencia y acumulación conlleva procesos negativos, que degradan la calidad del agua y la salubridad del ecosistema completo. Por ello, el control de la calidad del agua dulce es uno de los principales objetivos de los estudios ecológicos.

Por lo tanto, pese a las ventajas que presentan de cara a la producción de alimentos, los pesticidas son sustancias químicas muy tóxicas, que se distribuyen por el medio ambiente con mucha facilidad. Su movilidad y persistencia junto con otras características, es determinante para autorizar su comercialización y su uso.

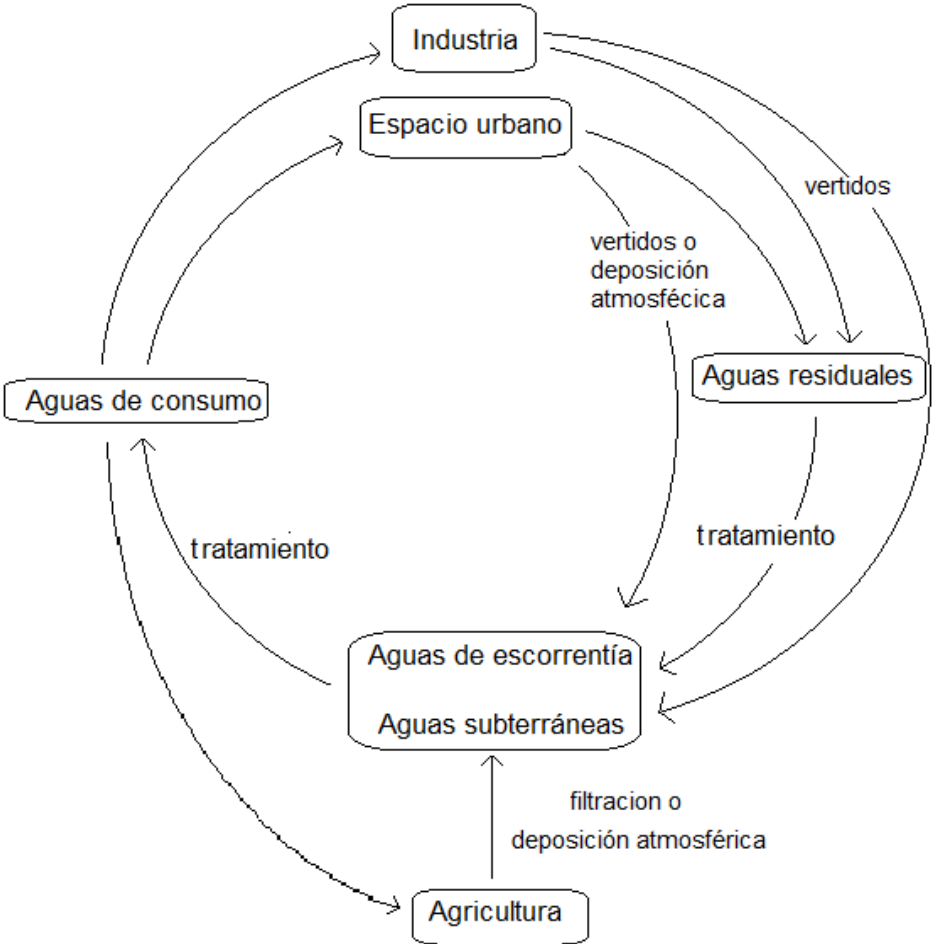


Figura 5. Ciclo de los plaguicidas en el medio acuático.

4. BIOSENSORES

De manera genérica un sensor se define como un dispositivo que detecta un cambio y emite una señal o respuesta. En química, podríamos utilizar la siguiente definición de sensor: un instrumento miniaturizado capaz de detectar un cambio químico, físico o biológico en el medio y traducirlo en una señal medible y analíticamente útil, que aporte información cuantitativa o cualitativa sobre la muestra (Díez-Sánchez, 2016). Un sensor químico consta de dos partes fundamentales: el receptor o sistema de reconocimiento y un transductor. Mientras que el receptor es el encargado de interactuar con el analito para provocar dicho cambio, el transductor capta la alteración y genera una señal, la cual envía a un sistema que procese los datos (Hernandez-Vargas et al., 2018). Esta señal deberá ser correlacionada con la concentración de analito (Bonetto, 2013). La parte del receptor es la que dota de selectividad al instrumento y la parte del transductor la que le aporta la sensibilidad (Moreno-Guzmán, 2013). Si el sistema de reconocimiento lo compone una molécula u organismo biológico, se denominan **biosensores**. Según la IUPAC un biosensor es *un dispositivo que utiliza reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas, inmunosistemas, tejidos, orgánulos o células enteras para detectar compuestos químicos, generalmente por señales eléctricas, térmicas u ópticas* (IUPAC, 2014).

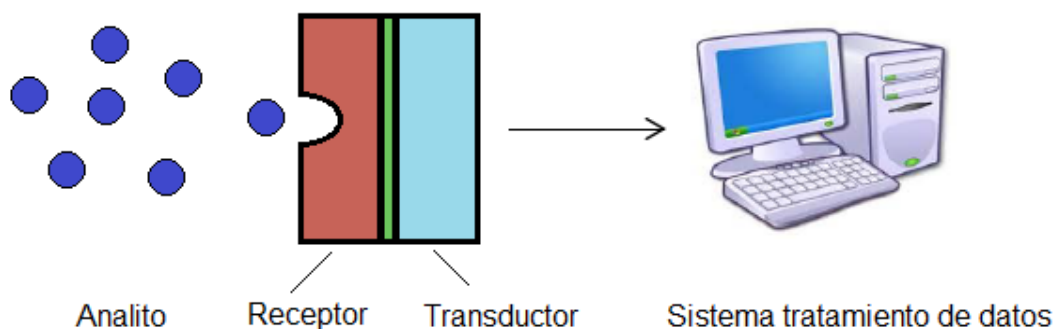


Figura 6. Esquema de un sensor químico. Imagen adaptada de Calvo-Pérez, 2014.

Una de las características fundamentales de un biosensor es la capacidad de realizar análisis en tiempo real. Uno de los problemas que tiene el análisis con instrumentación tradicional, es la necesidad de emplear recursos tales como tiempo y dinero. La determinación de cualquier analito por métodos cromatográficos, por ejemplo, conlleva invertir tiempo en procesos como la toma de muestra, el traslado al laboratorio, la preparación de la muestra, la puesta a punto de la instrumentación y el tiempo de análisis que sea necesario en cada caso. A esto hay que sumarle el gasto en reactivos y equipos

Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.

necesarios en el tratamiento de muestra, la costosa instrumentación y la necesidad de disponer de personal cualificado para el manejo de la misma. Sin embargo, el objetivo de un biosensor es ser capaz de determinar un analito in situ y hacer medidas continuas sin necesidad de muestrear ni pretratar la muestra.

Además, para poder realizar esas medidas in situ y en continuo, un biosensor debe ser un instrumento pequeño. Por ello, uno de los aspectos a tener en cuenta en la fabricación de biosensores es la posible miniaturización del instrumento, consiguiendo además reducir el consumo de reactivos y productos.

Tabla 6. Ventajas del empleo de biosensores frente a técnicas cromatográficas (Bucur et al., 2018).

Biosensores	Cromatografía
Mediciones in situ y en continuo	Es necesario muestrear y trasladar la muestra al laboratorio
Detección rápida	Gasta tiempo en la preparación de muestra y posterior análisis
Ahorra gasto en reactivos y volumen de muestra	Es necesario emplear volúmenes grandes de reactivos. Incrementa los desechos y el gasto económico
Fácil manejo	Necesario personal cualificado
Selectividad (reconocimiento biológico)	Posibles interferencias
Mayor sensibilidad	

4.1. Clasificación de biosensores

Para clasificar los biosensores se puede atender a i) el mecanismo de reconocimiento y ii) el sistema de transducción empleado.

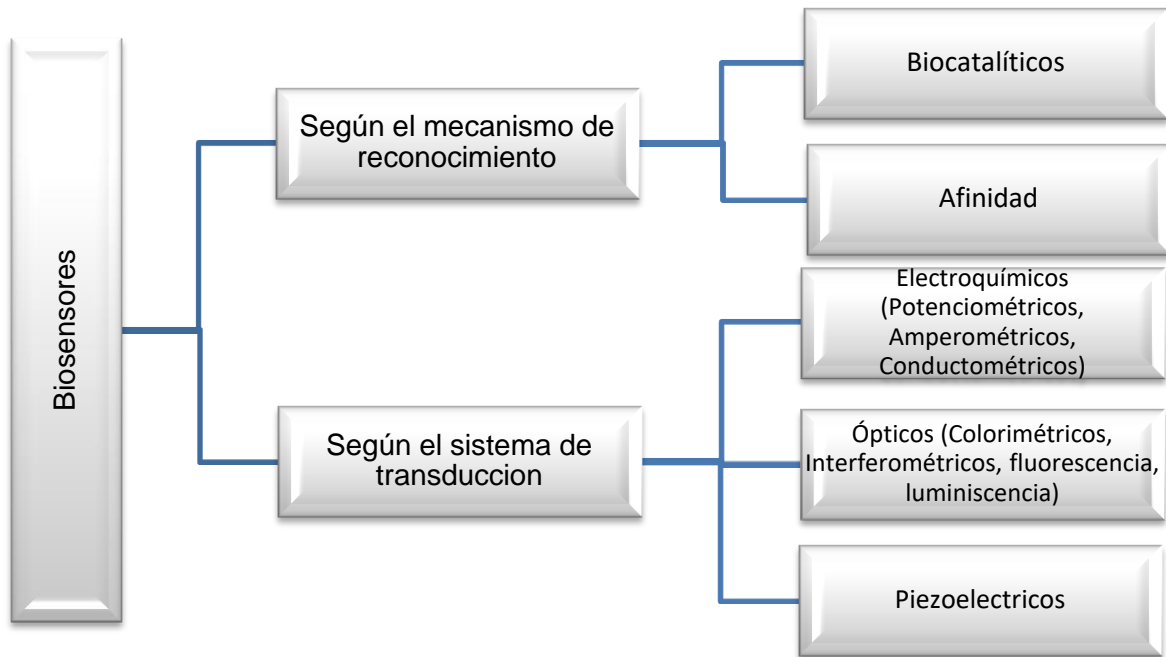


Figura 7. Clasificación de biosensores en función del mecanismo de reconocimiento y del sistema de transducción.

4.1.1. En función del sistema de reconocimiento

Los **biosensores catalíticos** emplean receptores que actúan como catalizador de una reacción, donde generalmente la presencia o ausencia del sustrato o producto será clave en la producción de señal. Los receptores biocatalíticos más ampliamente utilizados por su actividad catalítica y su alta especificidad son las enzimas.

Por su parte, los **biosensores de afinidad** se basan en la formación de un complejo entre el receptor y el analito (sustrato). La formación de este complejo puede ser medida gracias a una reacción biocatalítica auxiliar (Díez-Sánchez, 2016) o mediante el marcaje de alguna de las partes que intervienen en la formación del complejo. Los tipos de complejos que se forman en los biosensores de afinidad son, por ejemplo, antígeno-anticuerpo, si el receptor empleado es tipo inmunológico.

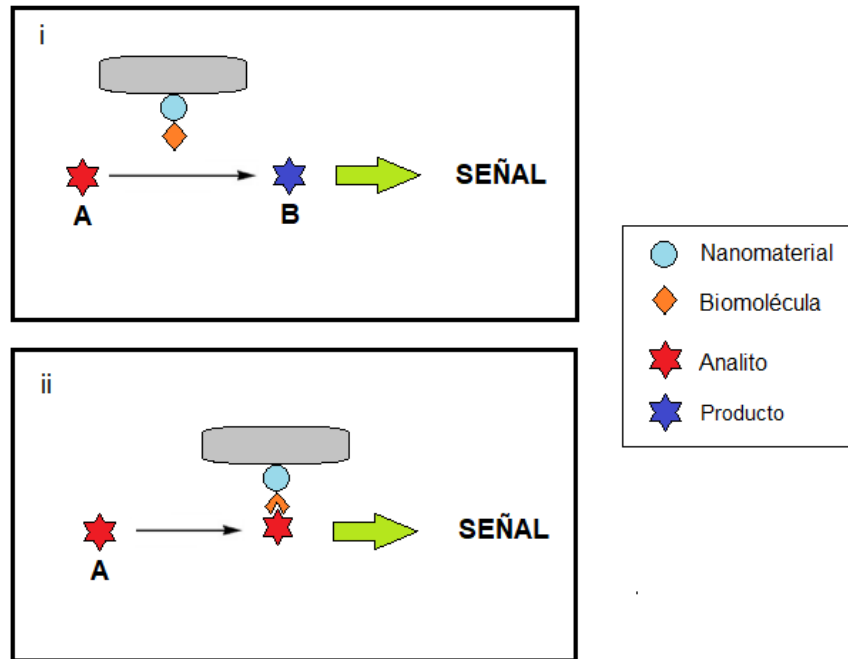


Figura 8. Esquema de los distintos tipos de biosensores en función del sistema de reconocimiento. (i) Biosensores catalíticos y (ii) de afinidad.

4.1.2. En función del sistema de transducción

En función del sistema de transducción podemos distinguir distintos tipos de biosensores, principalmente:

Biosensores ópticos: los transductores ópticos son dispositivos compactos que mediante la interacción luz-materia, consiguen obtener una respuesta como puede ser cambios en la absorbancia o en la fluorescencia. Constan de una fuente de emisión de luz, actuando ésta como sustrato del material biológico inmovilizado. Los sistemas de detección óptica están basados en espectroscopía de absorción, fluorescencia, índice de refracción, etc (Hassani, 2016). Las ventajas de estos transductores son su velocidad de análisis y la posibilidad de obtener respuestas sin necesidad de pretratar la muestra, característica esencial de los biosensores. Sin embargo, son menos económicos que otros transductores.

Biosensores piezoeléctricos: los transductores piezoeléctricos se basan en la medida de masa adsorbida sobre el transductor. Utilizan materiales como cristales o cerámicas, los cuales pueden deformarse al aplicar un campo eléctrico. Si el campo eléctrico oscila, el material vibra, variando esa vibración en función de la masa del material adsorbido. Estos transductores presentan un elevado nivel de interferencias, por lo que resultan menos específicos y sensibles que otros transductores.

Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.

Biosensores electroquímicos: los transductores electroquímicos se basan en detectar el producto de una reacción química (o bioquímica) sobre la superficie de un material conductor. En este caso, la señal detectada se traduce en una señal eléctrica. Son una gran alternativa por su bajo coste, su simplicidad y su fácil miniaturización.

Los biosensores más desarrollados son los biosensores electroquímicos y por eso este trabajo se centra en el estudio de las diferentes aplicaciones de este tipo de transductores para la determinación de pesticidas.

4.2. Biosensores electroquímicos

Los transductores electroquímicos son los más empleados como sistema de transducción en el desarrollo de biosensores. Esto es así por sus diseños simples, su fácil manejo, no ser especialmente caros y, principalmente, por su fácil miniaturización (Díez-Sánchez, 2016).

El sistema de transducción de un biosensor electroquímico consta de una serie de electrodos que en función de la información que detecten podrán actuar como biosensores amperométricos, potenciométricos o conductimétricos.

4.2.1. Biosensores amperométricos

Los biosensores amperométricos miden, a un potencial constante, la intensidad de corriente producida sobre la superficie del electrodo por una reacción de oxidación-reducción (Bonetto, 2013). La intensidad es directamente proporcional a la cantidad de especie electroactiva y podrá ser relacionada con la concentración de analito (Uniyal y Sharma, 2018) como se muestra en la ecuación de Cottrell (Bonetto, 2013):

$$i(t) = nFAC \sqrt{\frac{D}{\pi t}}$$

donde i es la intensidad de corriente, n es el número de electrones intercambiados, F la constante de Faraday, A la superficie del electrodo, C la concentración de analito, D el coeficiente de difusión del analito y t el tiempo.

Los biosensores dotados con un sistema de transducción amperométrico, tienen la ventaja de ser más selectivos que otros transductores, ya que el potencial de oxidación o reducción es característico de cada analito (Díez-Sánchez, 2016).

Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.

Los biosensores amperométricos constan de un sistema de tres electrodos: electrodo de referencia, auxiliar y de trabajo. Se aplica un potencial sobre el electrodo de trabajo, que se mantendrá constante gracias a un electrodo de referencia. El electrodo de trabajo registrará un cambio de corriente al producirse la reacción electroquímica, cuya intensidad se medirá gracias a un amperímetro y al electrodo auxiliar que cerrará el circuito permitiendo así la transferencia de carga.

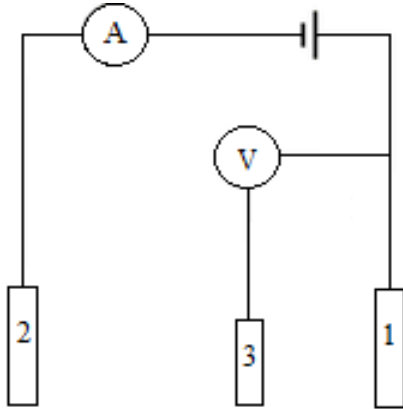


Figura 9. Esquema de un sistema de tres electrodos.

- 1: electrodo de trabajo**
- 2: electrodo auxiliar**
- 3: electrodo de referencia**

4.2.2. Biosensores potenciométricos

Los biosensores potenciométricos miden la diferencia de potencial entre dos electrodos manteniendo la corriente constante. Esta diferencia de potencial es causada por una reacción química, la cual varía la concentración de iones presentes en el medio. Diferentes tipos de reacción o formación de complejos, pueden generar especies cargadas que al aproximarse al electrodo de trabajo generen una diferencia de potencial respecto a un electrodo de referencia. Dicho de otra manera, la concentración del analito sobre el electrodo evoluciona obligando a variar el potencial para mantener el valor de la corriente constante.

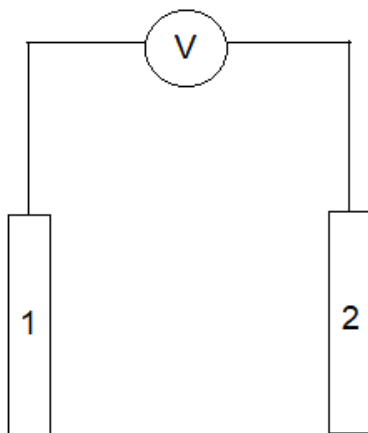


Figura 10. Esquema de un sistema de dos electrodos.

- 1: electrodo de trabajo**
- 2: electrodo de referencia**

Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.

Los más comunes en la detección potenciométrica de pesticidas, son los electrodos selectivos de iones (ESI). Estos electrodos son selectivos únicamente para un ion producido por esa reacción que se mencionaba anteriormente. Se basan en la diferencia de potencial que se genera en ambos lados de una membrana permeable. Un ejemplo de electrodo selectivo de iones es el electrodo de pH.

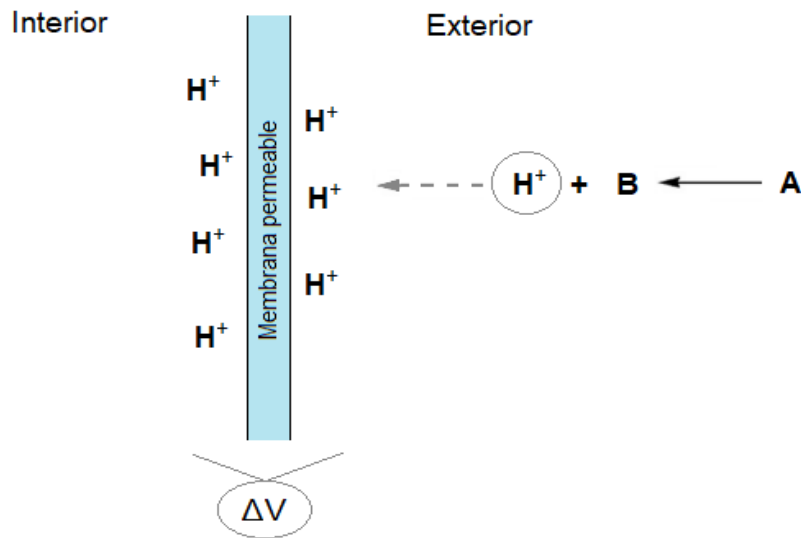


Figura 11. Esquema del funcionamiento de un ESI.

En potenciometría se puede relacionar la concentración de los iones con el voltaje gracias a la ecuación de Nernst (Hernandez-Vargas et al., 2018):

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln Q$$

donde R es la constante de los gases ideales (en $J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$), T es la temperatura (en K), F es la constante de Faraday, E y E^0 representan el potencial en equilibrio y en la célula respectivamente y Q es el cociente entre la concentración de iones en el ánodo y la concentración de iones en el cátodo. Se puede encontrar expresada de la siguiente manera cuando la temperatura es de 25°C:

$$E = E^0 - \frac{0.0592}{n} \text{Log} Q$$

Los transductores potenciométricos fueron los transductores más empleados en los años 80 y 90 (Cano-Luna, 2008). Sin embargo, la posibilidad de miniaturización y mejores resultados

Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.

en cuanto a sensibilidad, hizo que los transductores amperométricos aumentasen sus aplicaciones en el campo de los biosensores.

4.2.3. Biosensores conductimétricos

Los biosensores conductimétricos miden cambios en la conductividad del medio. Al igual que en los biosensores potenciométricos, una reacción química o la formación de diversos complejos pueden variar la concentración de iones en el medio, cambiando la movilidad de los mismos hacia el ánodo y el cátodo. Estos cambios de movilidad iónica alteran las propiedades conductoras del medio, alterando también la transferencia de cargas por el sistema.

Los cambios en la transferencia de cargas sobre la superficie del electrodo se pueden medir con detectores impedimétricos. Estos detectores miden la impedancia u oposición que presenta el dispositivo al transporte de electrones. Generalmente, mediante una corriente alterna se pueden registrar cambios de la impedancia en función de la frecuencia de la corriente alterna aplicada.

De manera sencilla, la medida de la conductividad o la impedancia se puede explicar con la Ley de Ohm, donde se relaciona de manera inversamente proporcional la corriente que circula por un circuito y la resistencia que éste presenta.

$$R(\Omega) = \frac{E(V)}{i(A)}$$

donde E es el potencial aplicado en función del tiempo, i es la intensidad registrada y R la resistencia medida en ohmios. En el caso de la impedancia se representa gráficamente $Z(\Omega)$ frente a la frecuencia de la perturbación del potencial (ω) para obtener los resultados de los cambios de la transferencia de cargas.

4.3. Técnicas de inmovilización del sistema de reconocimiento biológico

Como ya se ha comentado, una de las ventajas de los biosensores electroquímicos es su sencillez y rapidez del análisis. Esto es posible porque el sistema de reconocimiento está conectado o inmovilizado directamente sobre el electrodo. A la hora de fabricar un biosensor, la inmovilización es el paso más importante. De la correcta inmovilización depende el buen funcionamiento del dispositivo. Es importante mantener la actividad de la molécula biológica

Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.

y conseguir una unión estable, pues esto permitirá obtener buenos resultados de selectividad, sensibilidad y permitirá conservar la actividad del dispositivo en el tiempo.

Podría parecer que la manera más sencilla de inmovilizar la biomolécula es enlazarla directamente sobre la superficie del electrodo. Sin embargo, no suele ser la opción que mejores resultados obtiene. Se necesita una interfase que puede estar formada por nanomateriales, estructuras tridimensionales que actúen de andamio para la biomolécula (como redes sol-gel) o interfases combinadas, compuestas por una red tridimensional o polimérica que soporta los nanomateriales que a su vez inmovilizarán la biomolécula receptora. Respecto a este proceso de formación de una interfase o funcionalización del electrodo, los investigadores centran sus esfuerzos en el desarrollo y síntesis de nuevos materiales que aporten propiedades cada vez más ventajosas sobre el análisis con biosensores.

Hay diferentes métodos para llevar a cabo esta inmovilización, siendo los principales los siguientes:

→ Mediante métodos físicos:

- Inmovilización por adsorción
- Inmovilización por atrapamiento

→ Mediante métodos químicos:

- formación de enlaces covalentes
- por entrecruzamiento (crosslinking)

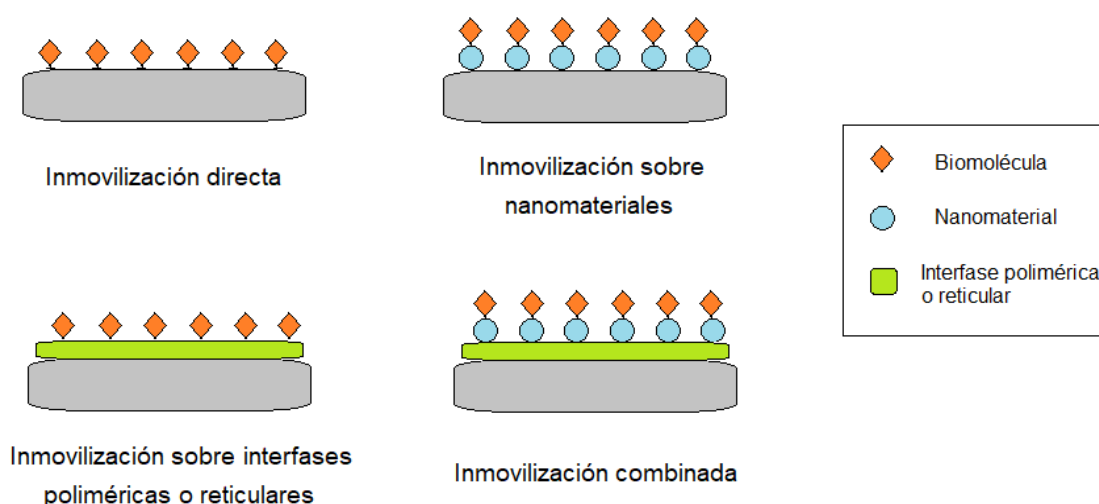


Figura 12. Diferentes inmovilizaciones de las biomoléculas sobre la superficie del electrodo.

Adsorción. Mediante interacciones intermoleculares tipo Van der Waals o electrostáticas, la biomolécula se deposita sobre la superficie del electrodo o interfase. Es una inmovilización sencilla que da opción a recuperar el material inmovilizado. Su principal desventaja es la poca fuerza de estas uniones que lleva a la pérdida parcial del receptor. Por lo tanto, el biosensor resulta poco estable y muy sensible a cambios de pH o temperatura.

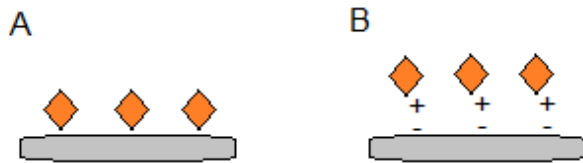


Figura 13. Inmovilización física: (A) adsorción por fuerzas intermoleculares y (B) por fuerzas electrostáticas.

Atrapamiento. Mediante la formación de una red (sol-gel o polimérica), se confina la biomolécula en su interior. Este método, como el anterior, no cambia la composición ni estructura de la biomolécula y sigue siendo una inmovilización poco estable.

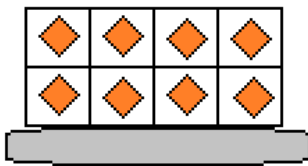


Figura 14. Inmovilización física mediante atrapamiento.

Enlace covalente. En este caso, la biomolécula se inmoviliza mediante la formación de enlaces covalentes entre grupos funcionales de la biomolécula y el electrodo (o interfase). Es una unión mucho más estable que las uniones físicas. Sin embargo, se necesita un cambio químico de las especies por lo que resulta ser un método más costoso.

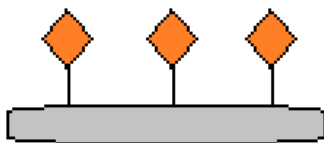


Figura 15. Inmovilización química mediante enlace covalente.

Entrecruzamiento. La inmovilización por entrecruzamiento o crosslinking, también lleva a la formación de redes para la fijación de la biomolécula. La diferencia con el atrapamiento físico, es que en el entrecruzamiento la biomolécula también forma parte de esa red pues ésta se forma mediante unión covalente de la biomolécula y un agente bifuncional o multifuncional.

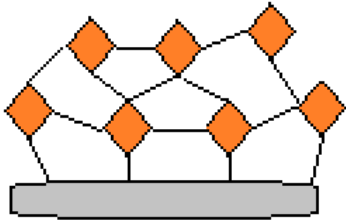


Figura 16. Inmovilización química mediante entrecruzamiento (crosslinking).

4.4. Tipos de electrodos

Tras comentar la importancia que tiene la inmovilización de las biomoléculas sobre la superficie de los electrodos, parece adecuado explicar brevemente la morfología y los diferentes tipos de electrodos que se pueden utilizar en el desarrollo de biosensores electroquímicos.

Los electrodos más conocidos tienen forma de barra. Contienen un cable conductor que termina en un extremo de un material conductor específico, como pueden ser metales (Au, Ag, Pt...) o carbono.

En los biosensores electroquímicos, los materiales empleados en el diseño de los electrodos no participan en la reacción de oxidación-reducción, solamente intercambian electrones con las moléculas electroactivas. Es importante que la superficie del electrodo esté libre y no se recubra de posibles compuestos, como óxidos, para permitir la buena transferencia de electrones. Por lo tanto, junto con la buena conductividad, el material debe ser lo más químicamente inerte posible.

Entre los metales, unos de los más comunes para formar electrodos de trabajo son el platino y el oro. Ambos presentan buenas propiedades eléctricas. Sin embargo, el empleo de metales preciosos encarece el proceso de fabricación de electrodos y biosensores.

Una alternativa más económica es utilizar materiales de carbono. Sus distintas formas alotrópicas presentan diferentes propiedades mecánicas y eléctricas. Por ejemplo, el diamante es un material no conductor, por lo que no es un buen material para la fabricación

de electrodos. Sin embargo, algunos investigadores han desarrollado electrodos de diamante dopado con átomos como el boro (Freitas et al., 2019) permitiendo desarrollar electrodos con propiedades excelentes como un amplio intervalo de potenciales aplicables. Por otro lado, el grafito y el grafeno sí son conductores, aunque más inestables. Uno de los materiales más empleados para fabricar electrodos es el carbono vítreo (GCE). Este material de carbono puro, presenta una estructura no cristalina y es inerte químicamente.

Una característica de los electrodos empleados en biosensores, independientemente del material utilizado, es la pequeña superficie electroquímicamente útil de la que dispone. La Figura 17 presenta un esquema de un electrodo convencional donde se observa que la superficie activa del electrodo es muy reducida.

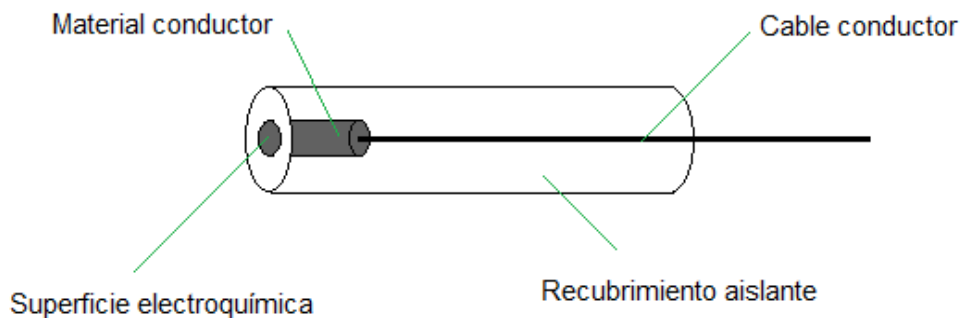


Figura 17. Esquema de un electrodo convencional tipo barra.

Cuando se trata de biomoléculas es posible que, tras una serie de medidas, los sistemas de reconocimiento pierdan su actividad. Esto hace que la aplicación comercial de los biosensores se vea obstaculizada. Una alternativa a los electrodos convencionales cada vez más desarrollada son los electrodos serigrafiados (SPE). Se trata de un dispositivo desechable, de bajo coste que además permite la miniaturización del sistema favoreciendo la aplicación para determinaciones in situ.

Los SPE son electrodos impresos sobre un sustrato (PVC, cerámica, papel), con una tinta conductora (Hernandez-Vargas et al., 2018). Con un molde o plantilla, se deposita la tinta conductora sobre el sustrato. Tras fijar la tinta, se añade una capa aislante que deja visible sólo la parte necesaria de los electrodos. Al igual que los electrodos convencionales, se pueden encontrar SPE con materiales como plata, oro o carbono.

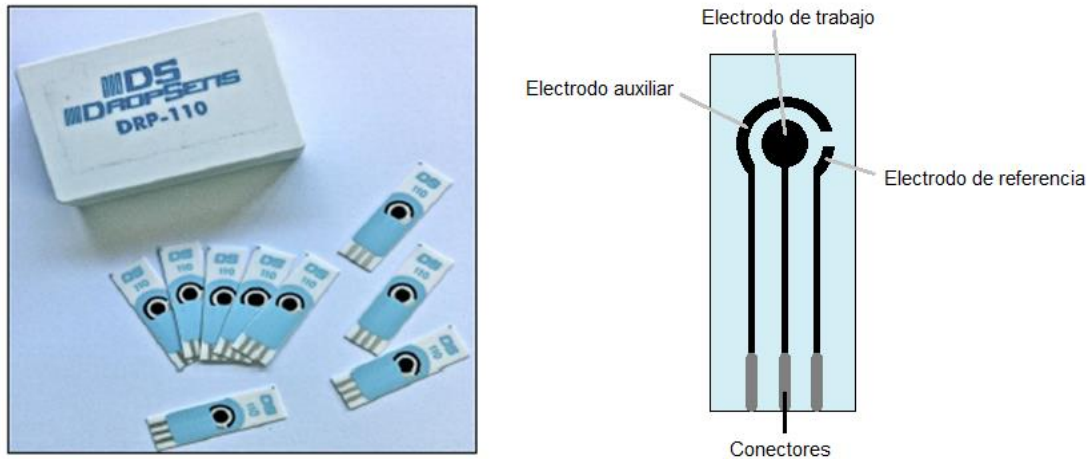


Figura 18. (IZQ) SPE comerciales (Moreno-Guzmán et al., 2013). (DCHA) Esquema de la disposición de los electrodos en un SPE.

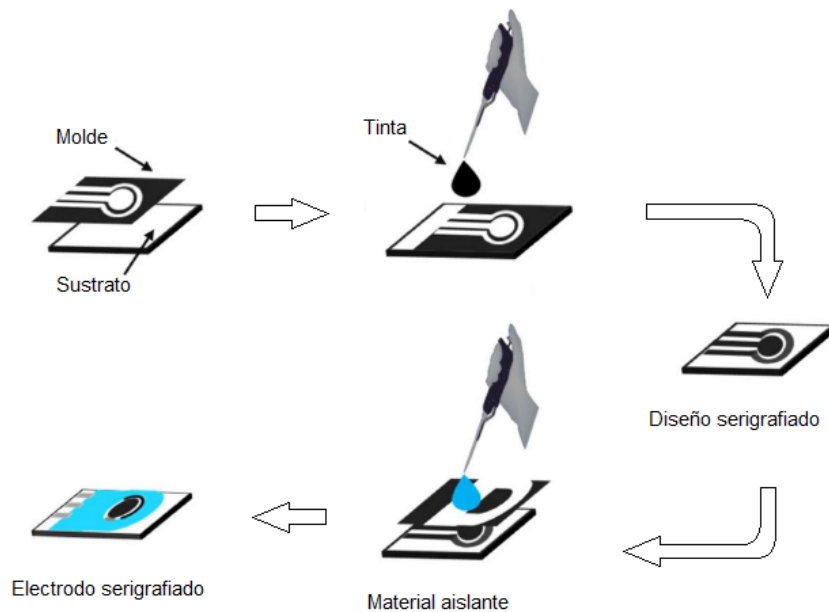


Figura 19. Proceso de fabricación de un SPE. Adaptado de Pérez-Fernández et al. (2020).

También existe otro tipo de electrodos, denominados interdigitados (IDEs). Estos electrodos están intercalados como las púas de dos peines, de manera que se forma una superficie con pequeños salientes. En el caso de biosensores, las biomoléculas de reconocimiento se pueden inmovilizar en los fosos entre electrodos. En esas regiones se crea un campo eléctrico que incrementa la intensidad de la señal, aumentando la sensibilidad de la detección. Este tipo de electrodos se utiliza en medidas de impedancia eléctrica.

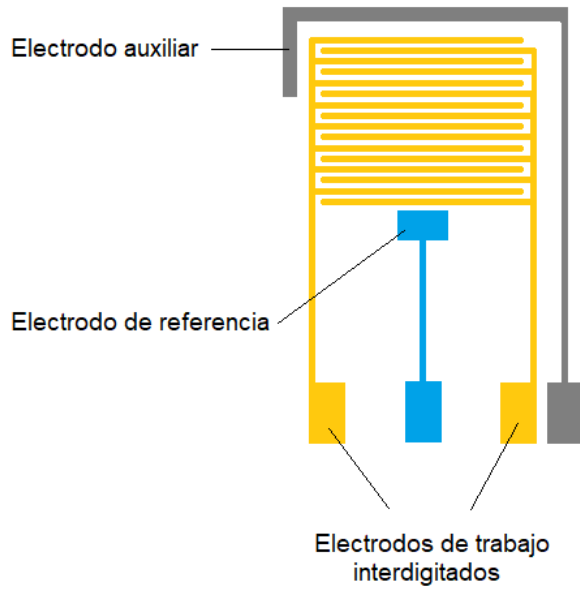


Figura 20. Esquema de un electrodo interdigitado (IDE).

Tabla 7. Tipo de electrodos encontrados en la bibliografía.

Electrodo	Material	Abreviatura
Electrodo de barra	Platino	Pt
	Oro	Au
	Diamante dopado con boro	BDD
	Carbono vítreo	GCE
Electrodo serigrafiado (SPE)	Carbono	SPCE
	Oro	SPAuE
Electrodo interdigitado (IDE)	Oro	Au-IDE

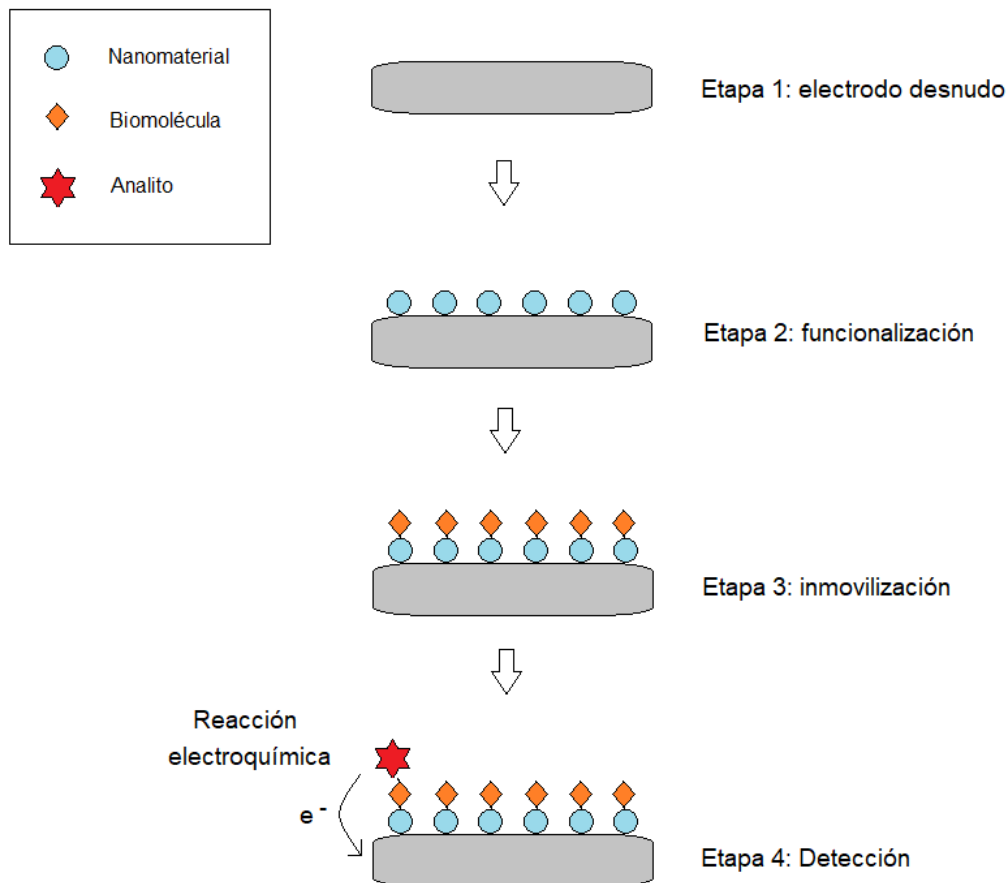


Figura 21. Esquema general del proceso de fabricación de un biosensor electroquímico.

5. BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN AGUAS

El uso de biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas se ha extendido debido a las excelentes propiedades de estos sensores que, como ya hemos visto anteriormente, incluyen entre otras la sencillez de su diseño y manejo, la posibilidad de miniaturización y su bajo coste.

Teniendo en cuenta la clasificación de estos biosensores según el mecanismo de reconocimiento utilizado, se va a realizar un resumen de las principales investigaciones realizadas durante los últimos 10 años en la determinación de pesticidas en aguas mediante

Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.

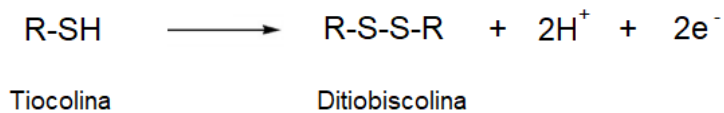
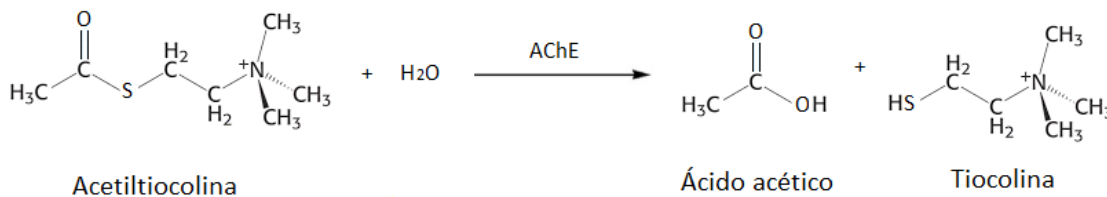
biosensores electroquímicos, ordenadas por año de publicación. Como ya se explicó en apartados anteriores, existen biosensores catalíticos y de afinidad.

5.1. Biosensores catalíticos

Comenzando con los biosensores catalíticos, numerosos investigadores basan sus biosensores en el poder de inhibición enzimática por parte de diferentes pesticidas.

En 2010 Firdoz et al., fabricaron un biosensor para la detección del pesticida Carbaril en muestras de agua de río. Para ello inmovilizaron la enzima acetilcolinesterasa (AChE) sobre un electrodo de carbono vítreo (GCE) funcionalizado con nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT).

La AChE es una enzima hidrolasa perteneciente a la familia de las colinesterasas. Firdoz et al. optaron por la acetiltiocolina como sustrato, obteniendo como productos ácido acético y tiocolina. Mediante detección amperométrica, midieron la señal de oxidación de la tiocolina producida por la enzima, formando un dímero por enlace disulfuro.



Los autores observaron que los nanotubos de carbono aumentaban la intensidad de corriente producida por la oxidación de la tiocolina, además de una disminución en el potencial aplicado respecto al electrodo sin modificar (0.37 V frente a 0.69 V). Sin embargo, los nanotubos de carbono formaban agregados impidiendo una distribución uniforme que permitiese la correcta inmovilización de la enzima. Para lograr la dispersión de los nanotubos, utilizaron un polímero soluble en agua. Emplearon el polímero PDDA (cloruro de poli(dialildimetilamonio)) que al estar cargado positivamente pudo interactuar electrostáticamente con la enzima, la cual a pH 7,4 se encontraba cargada negativamente.

Al poner en contacto el biosensor con concentraciones crecientes de pesticidas, observaron que la intensidad de la señal se reducía. Mediante estas medidas de intensidad, Firdoz et al. calcularon el porcentaje de inhibición sufrida por la enzima.

Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{I_0 - I_1}{I_0} * 100$$

donde I_0 es la corriente máxima de oxidación de la tiocolina sin pesticida y I_1 es la corriente de oxidación de la tiocolina con pesticida. Enfrentado los valores de inhibición frente al logaritmo negativo de la concentración obtuvieron una relación lineal cuya ecuación permite calcular la concentración de cada pesticida en las muestras reales de agua. Este procedimiento para calcular la inhibición enzimática y la concentración de pesticida, es similar en todos los trabajos recopilados sobre biosensores catalíticos.

Las características analíticas que obtuvieron, fueron un límite de detección de 5×10^{-6} nM y un intervalo lineal de 5×10^{-5} – 5 nM.

Más tarde, en 2011, Musameh y su equipo desarrollaron un biosensor para la detección de Paraoxón en agua de río. También inmovilizaron la enzima AChE en un electrodo de carbono vítreo sobre una interfase polimérica con nanotubos de carbono.

En este caso la inmovilización se realizó mediante entrecruzamiento con glutaraldehído. Debido a la unión covalente, el biosensor mostró mayor estabilidad permitiendo alargar la vida útil del dispositivo. Musameh observó los mismos comportamientos que Firdoz al modificar la superficie electroactiva con nanotubos de carbono. Sin embargo, destacó que una carga demasiado elevada de nanotubos conllevaba una disminución en la intensidad registrada.

El biosensor de Musameh ofreció un límite de detección de 1.0 nM y un intervalo lineal de 50-800 nM.

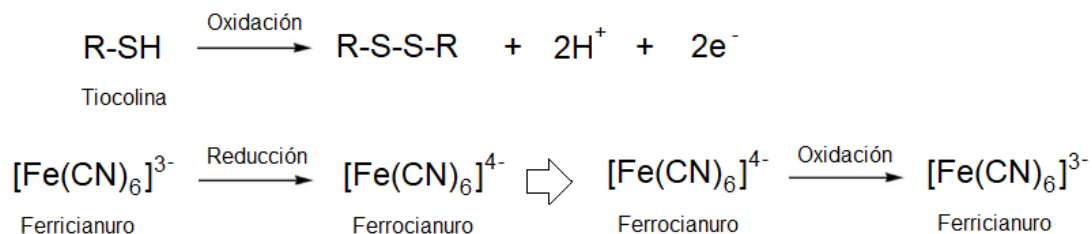
Arduini et al., en 2013, fabricaron un biosensor para detección de Paraoxón en muestras de agua de grifo. También se basaron en la actividad enzimática de la AChE. A diferencia de los ejemplos expuestos anteriormente, esta vez la autora inmovilizó la enzima sobre un electrodo serigrafado de oro, modificado con una capa de cisteamina. Arduini destaca que los electrodos serigrafados son más económicos y es posible desecharlos en lugar de intentar recuperar la actividad del dispositivo.

La detección se llevó a cabo amperométricamente utilizando un mediador electroquímico. Arduini comprobó que la presencia del ion ferricianuro ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) podía catalizar la oxidación de la tiocolina mediante su reducción a ferrocianuro ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$). Según se oxida

Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.

la tiocolina se produce ferrocianuro, el cual se oxida de nuevo sobre la superficie del electrodo incrementando la señal.

Las características analíticas del biosensor fueron un límite de detección de 7.27 nM y un intervalo lineal hasta 145 nM.



En 2015, Arduini desarrolló un biosensor similar aplicado de nuevo a la detección de Paraoxón, esta vez en aguas residuales. Mediante inmovilización por entrecruzamiento con glutaraldehído, inmovilizó la enzima butirilcolinesterasa (BChE) sobre un electrodo serigrafiado de carbono funcionalizado con nanopartículas de negro de carbón (CBNPs).

La enzima BChE es otra enzima de la familia de las colinesterasas, y al igual que la AChE, cataliza la formación de la molécula electroactiva tiocolina.

Como en otras investigaciones, Arduini observó que modificar la superficie del electrodo con materiales como nanopartículas de negro de carbón, conlleva un incremento en la intensidad de corriente y un descenso del potencial necesario para la oxidación de la tiocolina (0.3 V frente a 0.7 V sin CBNPs). Destaca que frente a otros materiales a base de carbono, como los nanotubos de carbono, se consiguen menores límites de detección.

Parece interesante destacar el procedimiento de “cambio de medio” que siguió Arduini en este trabajo para la determinación de los pesticidas. Los trabajos repasados hasta ahora, registraban el cambio de intensidad en la misma muestra contaminada con pesticida. Sin embargo, Arduini siguió tres sencillos pasos. Primero midió la actividad enzimática previa a la inhibición, registrando la corriente en una disolución tamponada y en ausencia de analito (únicamente con el sustrato de la enzima). Después introdujo el biosensor en la muestra contaminada y, trascurrido el tiempo necesario para inhibir la enzima, lavó el dispositivo con agua destilada. Finalmente, registró de nuevo la señal en una disolución tamponada. Con este procedimiento la autora consiguió eliminar posibles interferentes que pudieran producir inhibición reversible de la enzima, como metales.

De esta manera, obtuvo un límite de detección de 18 nM en un intervalo lineal entre 18 nM y 109 nM.

Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.

En 2016 se publicaron numerosas investigaciones sobre la determinación de pesticidas en agua con biosensores. Respecto a la utilización de AChE, Talarico, Mogha y sus equipos fabricaron dos dispositivos para la determinación en dos muestras de agua de Paraoxón y Clorpirifós, respectivamente.

Talarico utilizó partículas de negro de carbón sobre un electrodo serigrafiado en una muestra de agua potable. Observó que dispersando partículas de negro de carbón en una disolución polimérica de quitosano conseguía eliminar las aglomeraciones de las partículas, como observaron unos años antes Firdoz (2010) y Musameh (2011) en sus trabajos. Talarico destacó que el empleo de soluciones poliméricas, elimina la necesidad de utilizar disolventes orgánicos o ultrasonidos y mejora la carga de partículas presentes en la dispersión. El límite de detección obtenido por Talarico fue de 0.18 nM con un intervalo lineal de 0.36 – 1.8 nM.

Mogha et al., utilizaron otro material a base de carbono para el soporte de la enzima. Esta vez el electrodo utilizado consistió en un cristal de óxido de indio y estaño (ITO) recubierto por un nanocompuesto de óxido de grafeno reducido modificado con partículas de óxido de zirconio (ZrO_2/rGO). El autor observó que sin modificar la interfase la intensidad de corriente registrada era menor. El límite de detección obtenido por este dispositivo fue de 10^{-4} nM. Algo novedoso que no habíamos encontrado hasta ahora, es la presencia de dos intervalos lineales, de 10^{-4} – 1 nM y 1 – 10^5 nM.

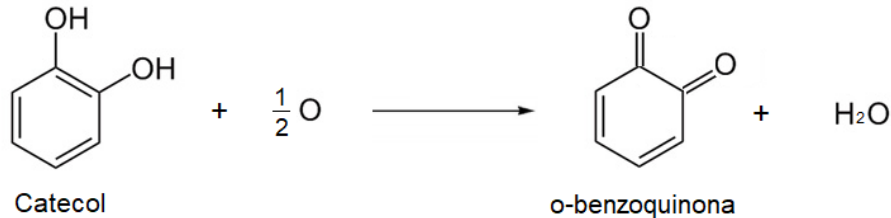
Turan et al. (2016) inmovilizaron la enzima BChE sobre un electrodo de grafito. Para la modificación de la superficie del electrodo utilizaron un material metálico. Nanofilamentos de plata (AgNWs) fueron depositados sobre una interfase de polímero conductor poli(TTBO), el cual otorgó un ambiente hidrofóbico a la enzima, mejorando la actividad y estabilidad. Mediante electropolimerización consiguieron controlar la morfología y espesor del polímero. Estos aspectos son importantes pues afectan a la inmovilización de la enzima y al mantenimiento de su estructura activa.

Aplicando este biosensor a la detección de Paraoxón en agua del grifo, obtuvieron un límite de detección de 212 nM y dos intervalos lineales entre 0.5-8 μ M y 10-120 μ M.

Tortolini et al., en 2016, utilizaron otra enzima para la fabricación de su biosensor. Inmovilizaron la enzima tirosidasa (Tyr) sobre electrodos serigrafiados para monitorear la presencia de Atrazina en muestras de agua de consumo.

Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.

La tirosinasa es una enzima que cataliza la oxidación de fenoles en presencia de oxígeno y ve reducida su actividad en presencia de pesticidas como el herbicida Atrazina. Como sustrato a esta enzima utilizaron catecol, el cual se oxidó a o-benzoquinona, siendo la reducción de la o-benzoquinona la reacción monitoreada mediante amperometría.



Tortolini et al., ensayaron las propiedades de diferentes electrodos serigrafiados, resultando el más apropiado el electrodo serigrafiado de carbono modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple mediante inmovilización por entrecruzamiento de la tirosinasa con un alcohol polivinílico (PVA-SbQ).

Las características técnicas del dispositivo fueron un límite de detección de $1.39 \mu M$ y un intervalo lineal de $2.32 - 92.7 \mu M$.

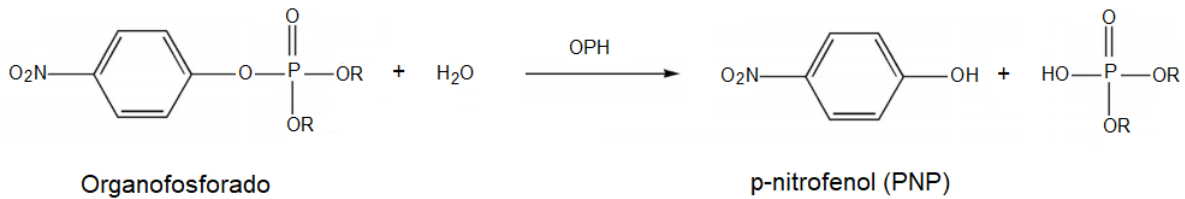
También en 2016, Vicentini et al. desarrollaron un biosensor similar inmovilizando la enzima tirosinasa esta vez para analizar Atrazina en muestras de agua de río. Obtuvo un límite de detección menor al de Tortolini ($0.17 \mu M$ frente a $1.39 \mu M$) con un intervalo lineal parecido ($2.5 - 95 \mu M$). La diferencia entre estos dos biosensores reside en el electrodo elegido y el agente inmovilizador. Mientras que Tortolini utilizó un electrodo serigrafiado de carbono funcionalizado con nanotubos de carbono de pared múltiple y con entrecruzamiento con un alcohol polivinílico, Vicentini utilizó un electrodo de carbono vítreo funcionalizado con nanopartículas de oro con entrecruzamiento con cisteamina y glutaraldehído. Vicentini y su equipo observaron así que las partículas metálicas parecían ofrecer mejores propiedades que los nanotubos de carbono.

Bao et al. (2016), fabricaron un biosensor que aplicaron a la detección de Paratión y Metil Paratión en muestras de agua de un lago. Para la elaboración de este dispositivo, se basaron en actividad catalítica de la enzima organofósforo hidrolasa (OPH) inmovilizada sobre un electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono.

La OPH hidroliza enlaces éster, causando la hidrólisis de pesticidas con sustituyentes p-nitrofenilo como paratión, metil paratión o paraoxón, y libera p-nitrofenol (PNP) como

Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.

producto. Bao et al. observaron que la oxidación del PNP se producía a 0.96 V con una intensidad de corriente muy débil. Para mejorar la señal, funcionalizaron la superficie de un electrodo de carbono vítreo con una capa de nanotubos de carbono de pared múltiple modificados con grupos carboxilo. Esta modificación de los nanotubos permitió una unión covalente y estable con la enzima.



Aunque la OPH se puede obtener a partir de bacterias como *Escherichia Coli* (Lee et al., 2010), Bao y su equipo observaron que purificar la OPH producida por estos organismos es costoso. Por este motivo, propuso combinar la enzima con un polipéptido (ELP) obteniendo una purificación más sencilla y rápida.

Bao y su equipo representaron la intensidad de corriente de la oxidación del PNP frente a la concentración de pesticida, obteniendo una recta de calibrado con la que determinar la concentración en la muestra real.

Las características analíticas obtenidas por este biosensor, fueron mejoradas mediante la adsorción de partículas de óxido de titanio (TiO₂) sobre los nanotubos de carbono de pared múltiple. De esta manera obtuvieron límites de detección de 10 nM para el Paratión y 12 nM para el Metil Paratión y un intervalo lineal hasta 36.4 μM en ambos casos.

Bao consiguió mejorar los resultados que autores como Deo et al., en 2005, consiguieron antes que él. Deo y su equipo desarrollaron un biosensor basándose en la actividad de la OPH. Sobre un electrodo de carbono vítreo funcionalizado con nanotubos de carbono y el polímero Nafion, inmovilizaron la enzima OPH. Lo aplicaron en la determinación de Paraoxón y Metil Paratión en muestras de aguas naturales. Sin embargo, los límites de detección obtenidos fueron 0.15 μM y 0.80 μM para el Paraoxón y el Metil Paratión, respectivamente, lo que demuestra que la introducción de partículas de óxido de titanio de Bao mejora el comportamiento del biosensor.

Jiang et al., en 2018, desarrollaron un biosensor para detectar Malatión y Metil Paratión en muestras de agua de grifo y agua de pozo. Para ello inmovilizaron AChE en un electrodo de carbono vítreo, sobre nanopartículas de oro depositadas en una interfase polimérica.

Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.

Las nanopartículas de oro se depositaron en el interior de una multicapa compuesta por los polímeros p-ABSA (p-acetamidobencenosulfonilo) y DAR (diazoresina). Dicha multicapa unida mediante fuerzas electrostáticas no proporcionaba la estabilidad necesaria para el correcto funcionamiento del biosensor, por lo que mediante tratamiento con luz UV, los autores consiguieron enlaces covalentes dotando al biosensor de mayor estabilidad.

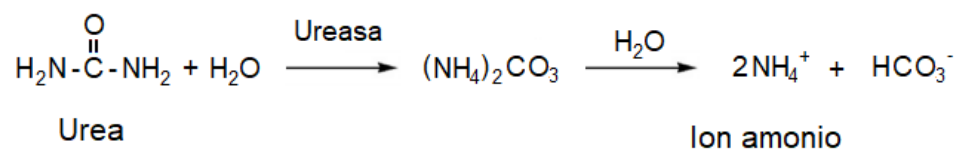
Consiguieron obtener límites de detección de 1.60×10^{-6} nM y 2.20×10^{-6} nM para el Malatión y Metil Paratión respectivamente, en un intervalo lineal entre 3.8×10^{-6} y 0.03 nM.

Por su parte, Rodrigues et al., también en 2018, publicaron su trabajo mostrando el desarrollo de un biosensor para la detección de Malatión en agua de un estanque. Este biosensor está basado en la inhibición de la AChE pero en esta ocasión inmovilizada sobre partículas metálicas de Fe_3O_4 (magnetita) recubiertas con quitosano sobre un electrodo serigrafiado de carbono. El recubrimiento con quitosano permitió utilizar glutaraldehído para una inmovilización covalente de la enzima por entrecruzamiento.

La opción elegida por Rodrigues y su equipo aportó interesantes ventajas. Primeramente, al trabajar con partículas magnéticas, éstas pudieron ser depositadas sobre el electrodo mediante el campo magnético creado por un imán. Esto permitió que la exposición de la enzima a los pesticidas se hiciese en disolución. Además, poder separar la interfase de la superficie del electrodo permitió lavar los componentes y evitar desechar el dispositivo, con el consiguiente beneficio económico y de residuos que supone.

Las características analíticas del biosensor fabricado por Rodrigues fueron un límite de detección de 0.3 nM y un intervalo lineal de 5 a 20 nM.

Vaghela et al., en 2018, analizaron la presencia de Glifosato en aguas de grifo con un biosensor basado en la inhibición de la enzima ureasa. En este caso la enzima se encarga de degradar el sustrato (urea) en iones amonio y bicarbonato. Vaghela et al. utilizaron la determinación potenciométrica mediante un electrodo selectivo de iones amonio para el seguimiento de la reacción.



Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.

Mediante atrapamiento de un agregado de ureasa y nanopartículas de oro sobre una película polimérica de agarosa, modificaron la membrana selectiva del electrodo. Los autores observaron que introducir nanopartículas metálicas a este tipo de electrodo también mejoraba la señal detectada, consiguiendo mejores límites de detección (5 μM con nanoconjugado y 10 μM solo con ureasa).

En cuanto al porcentaje de inhibición, Vaghela y su equipo lo calcularon de manera similar a las determinaciones amperométricas:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{V_0 - V_1}{V_0} * 100$$

donde V_0 es el potencial registrado antes de la exposición y V_1 es el potencial tras la exposición a Glifosato.

El biosensor mostró un comportamiento lineal en el intervalo 2.96 – 296 μM con un límite de detección de 2.96 μM .

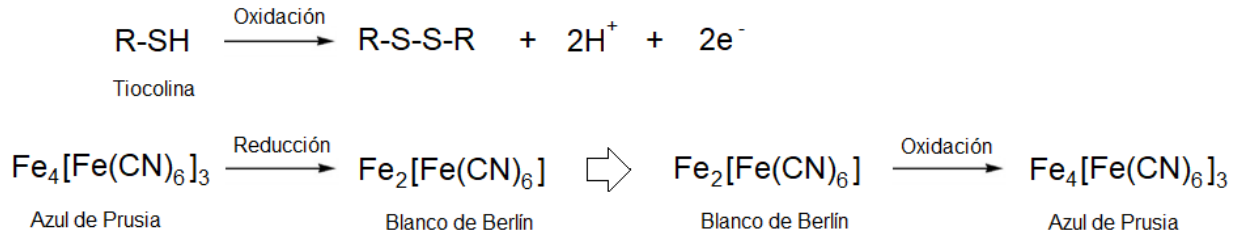
En 2019 Arduini et al. desarrollaron un biosensor aplicable a la detección de tres pesticidas, empleando una forma de fabricación diferente a las repasadas hasta ahora. Fabricaron un electrodo serigrafiado pero empleando papel como soporte. Se imprimió sobre papel un modelo con cera, aportando una zona hidrofóbica sobre la que se serigrafiaron los electrodos con pasta de carbono. Con este biosensor detectaron la presencia de Paraoxón, Ácido 2,4-diclorofenoxiacético y Atrazina en muestras de agua de río.

Para la detección de Paraoxón se inmovilizó BChE sobre una interfase de partículas de negro de carbón recubiertas con azul de Prusia (PB). El PB ($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$) es un mediador electroquímico similar al que Arduini utilizó en su trabajo de 2013 (ferrocianuro). El PB se reduce a Blanco de Berlín ($\text{Fe}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), catalizando la oxidación de la tiocolina aportando las ventajas que ya se comentaron anteriormente.

Para la detección del ácido 2,4-diclorofenoxiacético y Atrazina se inmovilizó la enzima fosfatasa alcalina y tirosidasa respectivamente. En ambos casos la autora no utilizó mediador y solo funcionalizó la superficie con partículas de negro de carbón.

El hecho de emplear papel como soporte para el diseño de un electrodo serigrafiado reduce gastos pudiendo desechar el biosensor tras cada uso.

Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.



Thakkar et al. (2019), fabricaron un biosensor para la detección de Paraoxón en muestras de agua del grifo. Utilizaron nanotubos de carbono de pared múltiple funcionalizados con grupos carboxilo. El autor observó que esta modificación de los nanotubos permitía omitir la necesidad de un agente intermedio con el que inmovilizar la enzima por entrecruzamiento. Mediante un enlace amida, Thakkar consiguió inmovilizar la AChE a los nanotubos sobre un electrodo de carbono vítreo.

Obtuvo un límite de detección de 0.1 nM con un intervalo lineal de 10-50 nM.

En el caso de Zhang et al (2019), fabricaron un biosensor basado en la inmovilización de AChE en un nanocompuesto de óxido de grafito reducido funcionalizado con grupos amina. Observaron que modificando el compuesto rGO-NH₂ con partículas de plata (Ag-rGO-NH₂), la corriente de fondo aumentaba, lo que significaba que las partículas mejoraban la transferencia de cargas a través del electrodo.

Estudiaron la aplicación de este biosensor sobre muestras de agua de grifo para la determinación de Malatión y Triclorfón. Las características analíticas de este dispositivo se analizaron mediante amperometría y obtuvo un límite de detección de 0.097 nM y 0.0039 nM para dichos pesticidas respectivamente, en un intervalo de lineal entre 0.3 y 30 nM para el Malatión y 0.08 y 8 nM para el Triclorfón.

Bao et al., también en 2019, innovaron en el empleo de materiales a base de carbono, creando una estructura 3D de grafito sobre la que depositaron partículas de óxido de cobre. Fabricaron un biosensor inmovilizando AChE sobre 3DG-CuO en un electrodo de carbono vítreo para la determinación de Malatión en agua de río.

Al igual que en otros casos, las partículas del óxido metálico podrían haber sido depositadas directamente sobre la superficie del electrodo. Sin embargo, los autores observaron que la estructura de grafito aportaba gran porosidad, lo que permitía la inmovilización de más carga enzimática y por lo tanto se mejoraba la señal producida.

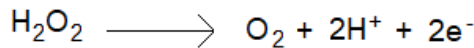
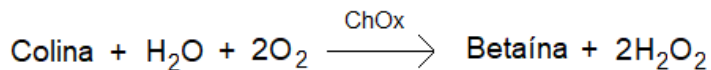
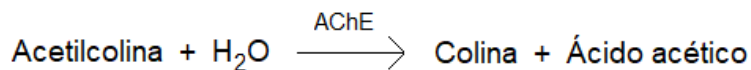
Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.

Las características analíticas obtenidas fueron un límite de detección de 9.2×10^{-4} nM y un rango lineal entre 0.003 y 47 nM.

Da Silva et al. (2019) desarrollan un biosensor basado en la inhibición de la colina oxidasa (ChOx). Como ya conocemos, la colina es uno de los productos de la hidrólisis de la acetilcolina. En presencia de ChOx, la colina puede ser catalizada en betaína y H_2O_2 , siendo la oxidación del peróxido de hidrógeno la señal detectada por el electrodo.

Con un electrodo de carbono vítreo funcionalizado con nanotubos de carbono y una película polimérica de PBCB (poli azul de cresilo brillante) consiguió detectar Diclorvos con un límite de detección de 1.59 nM en un rango lineal de 2.5-60 nM.

Sin embargo, pese a los buenos resultados obtenidos por Da Silva, no se han encontrado otros trabajos donde la ChOx sea la enzima escogida para la detección de pesticidas en muestras de agua.



5.2. Biosensores de afinidad

Como se explicó en apartados anteriores, se pueden emplear otras biomoléculas distintas a las enzimas como receptores en un biosensor. Al contrario de lo que ocurre en los biosensores catalíticos, en los biosensores de afinidad la biomolécula no intervendrá en ninguna reacción de hidrólisis o de descomposición de un sustrato. En estos casos, la biomolécula interactuará con el analito de diferentes maneras modificando la señal medida en cada caso.

En este ámbito, se han encontrados trabajos que emplean biomoléculas como los anticuerpos o ácidos nucleicos como sistema de reconocimiento de un biosensor.

Uno de esos trabajos es el de Ionescu et al en 2010, quienes fabricaron un inmunosensor para la detección de Atrazina en muestras de aguas naturales. Mediante la inmovilización de un anticuerpo afín a la Atrazina unido a una película polimérica de poli NTA (polipirrol

Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.

modificado con ácido nitrilotriacético) electropolimerizada sobre un electrodo de oro, consiguieron registrar cambios en la resistencia a la transferencia de carga. Los autores observaron que la unión directa de la Atrazina al anticuerpo desencadenaba un aumento en la resistencia de carga, mostrando una relación entre la impedancia y la afinidad para la formación de complejo. La inmovilización del anticuerpo la consiguieron mediante una unión histidina-Cu²⁺, marcando el anticuerpo con histidina e introduciendo iones Cu²⁺ coordinados en los centros quelantes del polímero.

Para la determinación del pesticida, registraron la resistencia a la transferencia de carga en presencia y ausencia de Atrazina. Estas diferencias las representaron frente a la concentración de Atrazina, obteniendo una curva de calibrado. Las características técnicas conseguidas con este biosensor fueron un límite de detección de 0.046 nM.

En 2011, Mai y su equipo fabricaron un biosensor inmovilizando una molécula de ADN para la detección amperométrica de Paraquat en aguas de río y subterráneas. Elaboraron un electrodo formado por pasta de carbono y un líquido iónico (CILE). Sobre la superficie de este electrodo electrodepositaron una doble hebra de ADN unida mediante enlaces covalentes a la superficie del electrodo. La base del funcionamiento del biosensor se centró en la interacción de la molécula de ADN inmovilizada, con la molécula de pesticida para llevar a cabo su reducción. Este mecanismo puede recordar a los mecanismos que se han explicado en los biosensores catalíticos. Sin embargo, a diferencia de los catalíticos, en este biosensor no es necesaria ninguna reacción catalítica, sino que la interacción directa del ADN con el Paraquat es la que desencadena la reacción redox y por tanto la responsable de la señal analítica. Los autores observaron que la presencia de la molécula de ADN mejoraba la conductividad en la superficie del electrodo, permitiendo aumentar la intensidad del pico de reducción del pesticida Paraquat.

Las características analíticas obtenidas fueron un límite de detección de 3.6 nM y un intervalo lineal de 50 a 7x10⁴ nM.

En 2013, Ensafi et al. desarrollaron un biosensor amperométrico para el análisis del herbicida Amitrol en distintas muestra de agua (del grifo, residual y de río). También utilizaron una doble hebra de ADN la cual depositaron sobre un electrodo de barra de grafito (PGE) modificado con nanotubos de carbono recubiertos de quitosano (MWCNTs-CS).

Ensafi et al. estudiaron la interacción del Amitrol con la doble hebra de ADN. Los autores observaron que la molécula de pesticida se unía covalente intercalándose entre las bases

Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.

nitrogenadas de la hélice. Si la hebra no estaba inmovilizada sobre la superficie del electrodo, se obtenía una disminución de la intensidad de corriente, sumada a un incremento en el potencial de oxidación, resultado de la lenta difusión del complejo ADN-Amitrol hacia el electrodo. Para suprimir estos inconvenientes, decidieron inmovilizar el ADN y modificar su superficie con nanotubos de carbono. Además, investigaron el comportamiento del biosensor con una hebra simple de ADN y observaron que los resultados no eran tan adecuados como con la hebra doble.

Las características técnicas fueron un límite de detección de 0.2 nM y un intervalo lineal entre 0.3 y 28 nM.

Liu et al., en 2014, desarrollaron un inmunosensor amperométrico para la detección simultánea de dos analitos, Endosulfán y Paraoxón, en aguas de un lago. Esta detección simultánea la consiguieron creando canales diferentes en un mismo electrodo.

De manera sencilla, se puede explicar el trabajo de Liu y su equipo de la siguiente manera:

- Primero crearon unos canales sobre un electrodo de carbono vítreo mediante un estampado de sal de diazonio.
- Después inmovilizaron sobre esos canales nanotubos de carbono de pared simple y los funcionalizaron con una molécula electroactiva (sonda redox) y un epítipo. Cada canal es específico para cada pesticida, por lo que a unos canales enlazaron FDMA y epítipo de endosulfán, mientras que a los otros canales enlazaron PQQ y epítipo de Paraoxón. (FDMA: ferrocenodimetilamina; PQQ: pirroloquinolina quinona)
- Finalmente, a cada canal se unió un anticuerpo específico para cada pesticida.

El mecanismo de este biosensor se basa en una unión competitiva entre el epítipo inmovilizado de cada analito y la molécula de pesticida. Observaron que, al unir el anticuerpo específico a cada epítipo, la intensidad de corriente disminuía, pues los contraiones no podían llegar hasta las sondas inmovilizadas para producir la reacción redox. Cuando el inmunosensor se puso en contacto con una muestra con ambos pesticidas, la intensidad de corriente aumentó, mostrando dos picos redox a -0.2 V y 0.3 V. Estos picos corresponden a la respuesta electroquímica de FDMA y PQQ y demuestran que el anticuerpo presenta mayor afinidad por el pesticida que por el epítipo inmovilizado. Cuanto mayor sea la concentración de pesticidas, mayor será el aumento de intensidad registrado.

Las características técnicas obtenidas fueron un límite de detección de 7.27 nM y 0.12 nM para el Paraoxón y el Endosulfán respectivamente. El intervalo lineal del Paraoxón estuvo

Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.

comprendido entre 7.27 y 9×10^3 nM, mientras que el del Endosulfan se encontró entre 0.12 y 246 nM.

En 2017, Taghdisi et al. fabricaron un biosensor inmovilizando de nuevo moléculas de ácidos nucleicos, aplicado a la detección amperométrica de Acetamiprid en muestras de agua. Esta vez, en lugar de una molécula de ADN, inmovilizaron una secuencia sencilla de nucleótidos sobre la superficie de un electrodo serigrafiado de oro. A estas moléculas de ácidos nucleicos se las denomina aptámeros. Los autores atraparon una molécula electroactiva en el interior del aptámero. En presencia de moléculas de pesticida y mediante un mecanismo competitivo, la mayor afinidad del aptámero por el pesticida, hizo que se desprendiese dicha molécula electroactiva, permitiendo registrar la intensidad de corriente producida por la oxidación de la molécula liberada.

Las características analíticas obtenidas fueron un límite de detección de 0.161 nM y un intervalo lineal entre 0,5 – 650 nM.

En 2018, Madianos et al. fabricaron un biosensor para la detección de Acetamiprid y Atrazina en agua de consumo (del grifo y embotellada). Para ello desarrollaron un biosensor con electrodos interdigitados (IDEs) de oro modificados con nanofibras de platino (PtNWs). Sobre esos electrodos inmovilizaron covalentemente un aptámero, al igual que Taghdisi en 2017. El mecanismo de detección es similar al que empleó Ionescu en 2010. Se trata de la formación de un complejo por afinidad entre el aptámero y el pesticida. Los autores registraron cambios en la impedancia, y observaron que ésta aumentaba notablemente en presencia de pesticidas. También observaron cómo la resistencia a la transferencia de carga era mayor en el electrodo sin modificar que en presencia de nanofibras de platino. Madianos destaca que otras investigaciones lograron límites de detección más bajos en lo que respecta al Acetamiprid. No obstante, defiende que la reducción en costes para el desarrollo de biosensores con aptámeros, merece asumir esos resultados, pues aunque menos sensibles mantienen unas características analíticas suficientes.

Las características analíticas de este biosensor fueron un límite de detección de 0.01 nM en un rango lineal de 0.1 a 1000 nM para la Atrazina, y 0.001 nM en un rango lineal de 0.01 a 100 nM para el Acetamiprid.

Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.

También en 2018, Arvand et al. fabricaron un biosensor similar al que desarrollaron Mai et al. en 2011. Esta vez inmovilizaron una molécula de ADN sobre un electrodo de carbono vítreo modificado con una interfase de óxido de grafeno (GO). Arvand explica que mediante un enlace covalente, grupos oxigenados del óxido de grafeno (hidroxilos, carboxilos o epóxidos) se unen con los grupos amida de la molécula de ADN. Esta molécula de ADN fue funcionalizada de tal manera que presentaba grupos tiol. Esto permitió que la superficie del electrodo fabricado se pudiese modificar con nanorods de oro mediante enlace covalente S-Au.

El dispositivo fabricado por Arvand y su equipo fue aplicado a la detección de Diazinon en muestras de agua de río, con un límite de detección de 190 nM en un intervalo lineal entre 1.9×10^3 y 5.6×10^4 nM.

Recientemente, Pérez-Fernández et al. (2020) han desarrollado un inmunosensor amperométrico para el análisis de Imidacloprid en agua de grifo. Este biosensor está basado en un mecanismo competitivo entre el analito sin marcar y el analito marcado. Mediante nanopartículas de oro consiguen inmovilizar los anticuerpos a la superficie de un electrodo serigrafiado de carbono. Esos anticuerpos se unen a moléculas de Imidacloprid libres o marcadas con una enzima peroxidasa (concretamente HRP). Tras la formación de los complejos anticuerpo-analito, añaden TMB (tetrametilbencinida) la cual es oxidada por la enzima HRP para ser reducida de nuevo sobre la superficie del electrodo. El límite de detección obtenido fue de 22 pM en un intervalo lineal 0.05-10 nM.

Tras mostrar los últimos avances que se han ido realizando y explicar brevemente las diferentes alternativas disponibles para el diseño y desarrollo de biosensores, y su aplicación a diferentes muestras de agua, la Tabla 8 recoge a modo de resumen todos los trabajos recopilados.

Tabla 8. Resumen de los distintos biosensores electroquímicos aplicados a diferentes muestras de agua para la detección de pesticidas.

Pesticida	Detección	Elemento de reconocimiento	Inmovilización	Electrodo	LOD (nM)	Intervalo lineal (nM)	Muestra	Ref.
Paraoxón	Amp.	OPH	----	OPH/CNT/GCE	150	No especifica	Agua Natural	Deo et al., 2005
	Amp.	AChE	Entrecruz.	CNT/Nafion/GCE	1	50-800	Agua de río	Musameh et al., 2011
	Amp.	AChE	Entrecruz	Cyst/Au-SPE	7,27	Hasta 145	Agua de grifo	Arduini et al., 2013
	Amp.	Anticuerpo	Enl. Cov.	hapteno/PQQ/SWCNT/GCE	7,27	7,27-9x10 ³	Agua de lago	Liu et al., 2014
	Amp.	BChE	Entrecruz	CBNPs/SPCE	18	18-109	Agua residual	Arduini et al., 2015
	Amp.	AChE	Adsorción	CS/CB/SPCE	0,18	0,36 - 1,8	Agua potable	Talarico et al., 2016
	Amp.	BChE	Entrecruz	poli(TTBO)/AgNW/GE	212	500–8000 y 10 ⁴ –12x10 ⁴	agua del grifo	Turan et al., 2016
	Amp.	BChE	Entrecruz	CB/PB/SPCE	7,27	7.27-72,7	Agua de rio	Arduini et al., 2019
	Amp.	AChE	Enl. Cov.	MWCNT/GCE	0,1	10-50	Agua del grifo	Thakkar et al., 2019
Malatión	Amp.	AChE	Enl. Cov.	DAR/AuNP/DAR/P-ABSA/GCE	1,6x10 ⁻⁶	3x10 ⁻⁵ - 0,03	Grifo y pozo	Jiang et al., 2018
	Amp.	AChE	Entrecruz.	CS/Fe ₃ O ₄ /SPCE	0,3	5 - 20	Estanque	Rodrigues et al., 2018
	Amp.	AChE	Entrecruz.	pol(FBThF)/Ag-rGO-NH ₂ /GCE	0,097	0,30 - 30	Agua del grifo	Zhang et al., 2019
	Amp.	AChE	-----	3DG-CuO NFs/GCE	9,2x10 ⁻⁴	0,003 - 47	Agua de rio	Bao et al., 2019

Tabla 8. (Continuación) Resumen de los distintos biosensores electroquímicos aplicados a diferentes muestras de agua para la detección de pesticidas.

Pesticida	Detección	Elemento de reconocimiento	Inmovilización	Electrodo	LOD (nM)	Intervalo lineal (nM)	Muestra	Ref.
Metil Paratión	Amp	OPH	----	OPH/CNT/GCE	800	No especifica	Agua Natural	Deo et al., 2005
	Amp	OPH	Entrecruz	BSA/TiO ₂ NFs/ c-MWCNTs/GCE	12	Hasta 3.6x10 ⁴	Agua lago	Bao et al., 2016
	Amp	AChE	Enl. Cov.	DAR/AuNP/DAR/ P-ABS/GCE	2,20x10 ⁻⁶	3,8x10 ⁻⁶ - 0,038	Grifo y pozo	Jiang et al., 2018
Paratión	Amp	OPH	Entrecruz	BSA/TiO ₂ NFs/ c-MWCNTs/GCE	10,0	Hasta 3.6x10 ⁴	Agua lago	Bao et al., 2016
Atrazina	Imp.	Anticuerpo	----	Poli NTA-Au	0,046	No especifica	Agua natural	Ionescu et al., 2010
	Amp	Tyr	Entrecruz	MWCNT/PVA-SbQ/ SPCE	1390	2,3x10 ³ – 9,3x10 ⁴	Agua potable	Totolini et al., 2016
	Amp	Tyr	Entrecruz	AuNP/GCE	170	2,5x10 ³ – 9,5x10 ⁴	Natural y de grifo	Vicentini et al., 2016
	Imp.	Aptámero	Enl. Cov.	PtNWs/Au-EIDs	0,01	0,1 - 1000	Grifo y embotellada	Madianos et al., 2018
	Amp	Tyr	----	CB/SPCE	---	46 - 463	Agua de rio	Arduini et al., 2019
Glifosato	Pot.	Ureasa	Atrap.	ureasa-AuNP	2960	2960 – 2,96x10 ⁵	Agua potable	Vaghela et al., 2018
Carbaril	Amp	AChE	Electrost.	(PDDA-SWCNT) ₅ / GCE	5x10 ⁻⁶	5x10 ⁻⁵ - 5	Agua de río	Firoz et al., 2010
Clorpirifos	Amp	AChE	Adsorción	ZrO ₂ /rGO/ITO	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴ -1 y 1-10 ⁵	No especifica	Mogha et al., 2016
2,4-D	Amp	Fosfatasa alcalina	----	CB/SPCE	226	Hasta 905	Agua de rio	Arduini et al., 2019

Tabla 8. (Continuación) Resumen de los distintos biosensores electroquímicos aplicados a diferentes muestras de agua para la detección de pesticidas.

Pesticida	Detección	Elemento de reconocimiento	Inmovilización	Electrodo	LOD (nM)	Intervalo lineal (nM)	Muestra	Ref
Triclorfón	Amp.	AChE	Entrecruz.	pol(FBThF)/ Ag-rGO-NH ₂ /GCE	0,0039	0.08 – 8	Agua del grifo	Zhang et al., 2019
Diclorvos	Amp.	ChOx	Entrecruz.	PBCB/MWCNT/ GCE	1,6	2.5-60	No específica	Da Silva et al., 2019
Diazinon	Amp.	ADN	Enl. Cov.	GNRs/ ds-DNA/GO/GCE	190	1900 y 5,6x10 ⁴	Agua de río	Arvand et al., 2018
Paraquat	Amp.	ADN	Enl. Cov.	CILE	3,6	50 - 7x10 ⁴	Río y subterráneas	Mai et al., 2011
Endosulfán	Amp.	Anticuerpo	Enl. Cov.	hapteno/FDMA/ SWCNT/GCE	0,12	0.12 - 246	Agua de lago	Liu et al., 2014
Imidacloprid	Amp.	Anticuerpo	----	AuNP/SPCE	0,022	0,05 - 10	Agua del grifo	Pérez-Fernandez et al., 2020
Acetamiprid	Imp.	Aptámero	Enl. Cov.	PtNWs/Au-EIDs	0,001	0,01 - 100	Grifo y embotellada	Madianos et al., 2018
	Amp.	Aptámero	----	Au-SPE	0,161	0,5 - 650	No específica	Taghdisi et al., 2017
Amitrol	Amp.	ADN	----	MWCNTs-CS/PGE	0,2	0,30 - 28	Grifo, residual, de río	Ensafi et al., 2013

Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.

Después de repasar los trabajos más relevantes que se han encontrado en la bibliografía y observando los datos recogidos en la Tabla 8, se pueden obtener los siguientes resultados.

En primer lugar se observa que hay mayor interés en la determinación de pesticidas organofosforados en aguas, siendo más numerosos los estudios que se basan en la presencia de estos analitos que en otros pesticidas como organoclorados, carbamatos y demás familias.

En cuanto al sistema de transducción empleado, una gran parte de los investigadores emplean detectores amperométricos.

En cuanto al sistema de reconocimiento, la mayoría de trabajos desarrollan biosensores enzimáticos. Dentro de este grupo, los biosensores fundamentados en la inhibición enzimática parecen más extendidos que los basados en la catálisis directa del analito. Los biosensores enzimáticos inhibidores presentan algunas desventajas frente a otros tipos de biosensores, pues son más lentos y no son específicos. Como ya se comentó, el porcentaje de inhibición calculado engloba todas aquellas sustancias capaces de disminuir la actividad enzimática. Por el contrario, biosensores basados en la catálisis directa del pesticida proporcionan más especificidad pues solo actúan frente a un tipo determinado de analito, como son los biosensores con OPH para los pesticidas organofosforados. Sin embargo, los biosensores inhibidores ofrecen mejores resultados en cuanto a sensibilidad. Biosensores basados en la inhibición de enzimas como AChE, BChE, Tyr, etc., ofrecen límites de detección menores que los conseguidos con biosensores basados en la actividad catalítica de OPH.

Entre todas las enzimas utilizadas en los trabajos consultados, la AChE parece ser la que mejores resultados de sensibilidad ofrece. Comparando los límites de detección obtenidos por ensayos con AChE y BChE, la primera puede reducir el valor en dos órdenes de magnitud.

Otras biomoléculas aplicadas a la detección de pesticidas en agua son ácidos nucleicos y anticuerpos. La alta especificidad que presentan los inmunosensores hace de este tipo de biosensores una gran opción para el análisis de pesticidas. Al igual que los biosensores catalíticos como los que emplean la enzima OPH, los inmunosensores forman uniones reversibles con el analito, al revés de lo que ocurre en biosensores inhibidores. Este hecho permite deshacer la unión tras el análisis, permitiendo reutilizar el dispositivo sin complicados procesos de reactivación.

Autores como Qiao y su equipo (2014) señalan que son numerosos los inmunosensores aplicados al análisis de muestras de agua. Sin embargo, los resultados tras buscar en

Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.

diferentes bases de datos parecen indicar que los inmunosensores con transducción electroquímica están menos desarrollados que los biosensores enzimáticos.

Por otro lado, todos los investigadores remarcan la importancia de la correcta inmovilización de la biomolécula de reconocimiento, ya sea enzima, anticuerpo o ácido nucleico. De esta etapa dependerán en gran parte su actividad, su sensibilidad y su estabilidad.

Para conseguir alargar la vida útil del dispositivo y conseguir mayor eficacia en la carga de biomoléculas, ya sean enzimas o cualquier otra, parece claro que la inmovilización mediante enlaces covalentes es la mejor opción. Entre todos los ejemplos recogidos en la Tabla 8, la inmovilización por entrecruzamiento es la más popular. De acuerdo con los procedimientos explicados a lo largo de este apartado, el glutaraldehído parece ser una molécula con excelentes propiedades para este fin.

En cuanto a los tipos de electrodos, los más sencillos y cómodos en su manejo, almacenamiento y transporte parecen ser los electrodos serigrafiados. Se han encontrado principalmente electrodos de carbono y oro, siendo éstos últimos menos comunes excepto en las detecciones impedimétricas, donde consiguen grandes resultados formando electrodos interdigitados. Destacar los trabajos de Taghdisi (2017) y Madianos (2018), ya que ambos utilizan electrodos de oro para la determinación del mismo analito mediante aptámeros. Mientras que Taghdisi emplea un electrodo serigrafiado, Madianos fabrica un electrodo interdigitado, demostrando la mayor sensibilidad de estos electrodos al reducir el límite de detección en dos órdenes de magnitud.

Casi la totalidad de los trabajos consultados, incorporan materiales adicionales a las superficies de los electrodos, independientemente del sistema de transducción y reconocimiento. Esto se debe principalmente a dos factores: incrementar la intensidad de la señal y reducir los potenciales necesarios para algunas determinaciones, por ejemplo la oxidación de la tiocolina. Los materiales más comunes en la funcionalización de los electrodos son materiales a base de carbono, partículas metálicas, polímeros y, frecuentemente, compósitos que albergan combinaciones de cualquiera de los anteriores.

Comenzando con los materiales de carbono, se pueden encontrar nanotubos de carbono, partículas de negro de carbón o compuestos de grafeno como óxidos o redes tridimensionales. En función de los resultados obtenidos por los investigadores, los nanotubos de carbono parecen aportar fantásticas propiedades eléctricas a los biosensores. Ya que todos los que utilizaron estos compuestos observaron incrementos de intensidad en la señal medida, parece que los nanotubos de carbono son excelentes conductores y mejoran la transferencia de electrones entre el receptor y la superficie del electrodo.

Biosensores electroquímicos para la determinación de pesticidas en aguas.

Profundizando en la estructura de estos nanotubos, se puede diferenciar entre nanotubos de pared simple y pared múltiple (SWCNT y MWCNT respectivamente). Considerando los límites de detección recogidos en la Tabla 8, parece que los SWCNT pueden aportar mayor sensibilidad que los MWCNT.

En cuanto a las partículas metálicas se pueden encontrar nanopartículas metálicas como las nanopartículas de oro y óxidos metálicos. Ambas parecen mejorar la conductividad y sensibilidad del dispositivo como los materiales de carbono. Sin embargo, debido a su pequeño tamaño, pueden ser depositadas sobre otros materiales como nanotubos u óxido de grafeno, incrementando la superficie sobre la que se pueden depositar las biomoléculas.

Los materiales poliméricos parecen estar muy presentes en la fabricación de biosensores. Son muchos los trabajos encontrados que polimerizan diversos materiales con el propósito de inmovilizar las biomoléculas, aportar una superficie aislante para aumentar la sensibilidad, o recubrir algunos de los nanomateriales para conseguir uniones más fuertes con el electrodo, las biomoléculas o incluso con el analito.

En muchas ocasiones se consiguen mejoras de estos materiales mediante su combinación. En el caso de Zhang (2019) el efecto sinérgico del óxido de grafeno, los átomos de plata y el polímero consiguen no solo incrementar la transferencia de cargas sino aportar un ambiente hidrofóbico que beneficia la unión y actividad enzimática.

Destacar que no se observan diferencias en el uso de estos nanomateriales en función del tipo de biosensor.

No solo aportan ventajas eléctricas mejorando la sensibilidad de los dispositivos, los nanomateriales también aportan a la selectividad, pues reduciendo el potencial necesario se pueden eliminar posibles interferencias en la detección.

Tras la caracterización de los dispositivos y la optimización de variables como el pH, el grosor de la interfase, tiempo de incubación, etc., casi todos los autores estudiaron la aplicabilidad de su biosensor a la detección de los pesticidas escogidos en diferentes tipos de agua. Todos coincidieron en que no existe efecto matriz, pues las pendientes de los calibrados son comparables a las de disoluciones tampón sin contaminar, y obtuvieron recuperaciones entre el 90% y el 113%, demostrando que todos los métodos tienen una adecuada exactitud para la aplicación en muestras de agua.

6. CONCLUSIONES

Como conclusiones finales a este trabajo podemos remarcar las siguientes:

- Todos los biosensores electroquímicos estudiados han demostrado su utilidad para la aplicación a muestras de agua reales.
- Entre los biosensores electroquímicos, los biosensores enzimáticos con detección amperométrica son los biosensores por excelencia, apareciendo en la mayor parte de los trabajos publicados. Esto es debido a su sencillez de fabricación y manejo junto con los buenos resultados ofrecidos en cuanto a sensibilidad se refiere.
- La composición de los electrodos es tan importante como la cantidad de componente biológico, de tal manera que, variaciones en esa composición, permiten obtener dispositivos más eficaces desde el punto de vista analítico.
- El empleo de superficies electródicas modificadas con nanopartículas de oro permite desarrollar biosensores electroquímicos con mejores características analíticas.
- La correcta inmovilización del componente biológico es esencial para mantener la actividad del mismo y conseguir una buena estabilidad del dispositivo.
- La tendencia observada en el número de publicaciones anuales hace pensar que en un futuro cercano las mejoras que se lleven a cabo en este tipo de dispositivos los convertirán en una más que prometedora tecnología para el análisis de pesticidas en muestras de agua.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Arduini, F.; Cinti, S.; Caratelli, V.; Amendola, L.; Palleschi, G. y Moscone, D. (2019). Origami multiple paper-based electrochemical biosensors for pesticide detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 126, 346-354.
2. Arduini, F.; Forchielli, M.; Amine, A.; Neagu, D.; Cacciotti, I.; Nanni, F.; Moscone, D. y Palleschi, G. (2015). Screen-printed biosensor modified with carbon black nanoparticles for the determination of paraoxon based on the inhibition of butyrylcholinesterase. *Microchimica Acta*, 182, 643-651.
3. Arduini, F.; Guidone, S.; Amine, A.; Palleschi, G. y Moscone, D. (2013). Acetylcholinesterase biosensor based on self-assembled monolayer-modified gold-screen printed electrodes for organophosphorus insecticide detection. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 179, 201-208.
4. Arvand, M. y Dehsaraei, M. (2018). Amperometric determination of diazinon by gold nanorods/ds-DNA/graphene oxide sandwich-modified electrode. *Ionics*, 24 (2), 2445-2454.
5. Badii, M.H. y Varela, S. (2008). Insecticidas Organofosforados: Efectos sobre la Salud y el Ambiente. *CULCyT*, 28, 5-17.
6. Bao, J.; Hou, C.; Dong, Q.; Ma, X.; Chen, J.; Huo, D.; Yang, M.; Galil, K.; Chen, W. y Lei, Y. (2016). ELP-OPH/BSA/TiO₂ nanofibers/c-MWCNTs based biosensor for sensitive and selective determination of p-nitrophenyl substituted organophosphate pesticides in aqueous system. *Biosensors and Bioelectronics*, 85, 935-942.
7. Bao, J.; Huang, T.; Wang, Z.; Yang, H.; Geng, X.; Xu, G.; Samalo, M.; Sakinati, M.; Huo, D. y Hou, C. (2019). 3D graphene/copper oxide nano-flowers based acetylcholinesterase biosensor for sensitive detection of organophosphate pesticides. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 279, 95-101.
8. Blanco, L.; Marquina, M. E. y Castro, Y. (2013). Respuestas a la aplicación de carbamatos en dos aislados rizobianos provenientes de Mucuchíes , Estado Mérida, Venezuela. *Bioagro*, 25 (2), 117-128.
9. Bonetto, M.C. Desarrollo de biosensores/bioensayos para la determinación rápida de parámetros indicadores de calidad de agua. Técnicas electroquímicas, BOD y toxicidad. Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires, diciembre de 2013.
10. Bucur, B.; Munteanu, F.D.; Marty, J.L. y Vasilescu, A. (2018). Advances in enzyme-based biosensors for pesticides detection. *Biosensors*, 8, 27.

11. Calvo-Pérez, A. Desarrollo y aplicación de sensores y biosensores electroquímicos para la determinación de contaminantes medioambientales y agroalimentarios. Tesis doctoral, Universidad de Burgos, enero de **2014**.
12. Cano-Luna, M. Diseño y aplicación de sensores electroquímicos basados en moléculas orgánicas conductoras. Tesis doctoral, Universidad de Córdoba, noviembre de **2008**.
13. Cao, Y.; Sun, X.; Guo, Y.; Zhao, W. y Wang, X. (**2015**). An electrochemical immunosensor based on interdigitated array microelectrode for the detection of chlorpyrifos. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38, 307-313.
14. Carod-Benedico, E. (**2002**). Insecticidas organofosforados. "De la guerra química al riesgo laboral y doméstico". *MEDIFAM*, 12 (5), 333-340.
15. Che Sulaiman, I. S.; Chieng, B. W.; Osman, M. J.; Ong, K. K.; Rashid, J. I. A.; Wan Yunus, W. M. Z.; Noor, S. A. M.; Kasim, N. A. M.; Halim, N. A. y Mohamad, A. (**2020**). A review on colorimetric methods for determination of organophosphate pesticides using gold and silver nanoparticles. *Microchim Acta*, 187, 131.
16. Da Silvia, W; Ghica, M. E. y Brett, C. M. A. (**2019**). Choline oxidase inhibition biosensor based on poly(brilliant cresyl blue) – deep eutectic solvent / carbon nanotube modified electrode for dichlorvos organophosphorus pesticide. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 298, 126862.
17. Deo, R. P.; Wang, J.; Block, I.; Mulchandani, A.; Joshi, K. A.; Trojanowicz, M.; Scholz, F.; Chen, W. y Lin, Y. (**2005**). Determination of organophosphate pesticides at a carbon nanotube/organophosphorus hydrolase electrochemical biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 530, 185-189.
18. Departamento de Asuntos Económicos y Sociales de las Naciones Unidas (ONU). World Population Prospects (**2019**).
<https://population.un.org/wpp/Graphs/Probabilistic/POP/TOT/900> (Visitado el 18/01/2020).
19. Díaz, O. y Betancourt-Aguilar, C. (**2018**). Los pesticidas; clasificación, necesidad de un manejo integrado y alternativas para reducir su consumo indebido: una revisión. *Agroecosistemas*, 6(2), 14-30.
20. Díez-Sánchez, P. Nuevos nanomateriales para el diseño de biosensores electroquímicos y sistemas de liberación controlada. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, octubre de **2016**.
21. Doménech, J. (**2004**). Plaguicidas: Sus efectos en la salud humana. *Elsevier*, 23 (7), 108-114.

22. Dou, J.; Ding, A.; Cheng, L.; Sekar, R.; Wang, H. y Li, S. (2012). A screen-printed, amperometric biosensor for the determination of organophosphorus pesticides in water samples. *Journal of Environmental Sciences*, 24 (5), 956-962.
23. Du, D.; Chen, S.; Cai, J. y Zhang, A. (2008). Electrochemical pesticide sensitivity test using acetylcholinesterase biosensor based on colloidal gold nanoparticle modified sol-gel interface. *Talanta*, 74, 766-772.
24. Ensafi, A. A. y Amini, M. y Rezaei, B. (2013). Biosensor based on ds-DNA decorated chitosan modified multiwall carbon nanotubes for voltammetric biodetection of herbicide amitrole. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 109, 45-51.
25. Feo, M. L.; Ginebreda, A.; Eljarrat, E. y Barceló, D. (2010). Presence of pyrethroid pesticides in water and sediments of Ebro River Delta. *Journal of Hydrology*, 393, 156-162.
26. Ferrer, A. (2003). Intoxicación por plaguicidas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26, 155-171.
27. Firdoz, S.; Ma, F.; Yue, X.; Dai, Z.; Kumar, A. y Jiang, B. (2010). A novel amperometric biosensor based on single walled carbon nanotubes with acetylcholine esterase for the detection of carbaryl pesticide in water. *Talanta*, 83, 269-273.
28. Fishel, Frederick M. (2018). Pesticidas y Colinesterasa. IFAS Extension, Universidad de Florida, PI242. Publicado online: <https://edis.ifas.ufl.edu/pi242> (Visitado el 04/03/2020).
29. Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database (FAOSTAT) (2019). Pesticides Uses. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/RP/visualize> (Visitado el 22 de mayo de 2020).
30. Freitas, J.; Oliveira, T.; Muñoz, R. A. y Richter, E. M. (2019). Boron doped diamond electrodes in flow-based systems. *Frontiers in Chemistry*, 7, 190.
31. Guler, M.; Turkoglu, V. y Kivrak, A. (2016). Electrochemical detection of malathion pesticide using acetylcholinesterase biosensor based on glassy carbon electrode modified with conducting polymer film. *Environ Sci Pollut Res*, 23, 12343–12351.
32. Hassani, S.; Momtaz, S.; Vakhshiteh, F.; Maghsoudi, A.S.; Ganjali, M.R.; Norouzi, P. y Abdollahi, M. (2016). Biosensors and their applications in detection of organophosphorus pesticides in the environment. *Arch Toxicol*, 91, 109–130.
33. Hernandez-Vargas, G., Sosa-Hernández, J.E., Saldarriaga-Hernandez, S., Villalba-Rodríguez, A.M., Parra-Saldivar, R. y Iqbal, H.M.N. (2018). Electrochemical biosensors: a solution to pollution detection with reference to environmental contaminants. *Biosensors*, 8, 29.

34. Hou, S.; Ou, Z.; Chen, Q. y Wu, B. (2012). Amperometric acetylcholine biosensor based on self-assembly of gold nanoparticles and acetylcholinesterase on the sol-gel/multi-walled carbon nanotubes/choline oxidase composite-modified platinum electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 33, 44-49.
35. Ionescu, R. E.; Gondran, C.; Bouffier, L.; Jaffrezic-Renault, N.; Martelet, C. y Cosnier, S. (2010). Label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of atrazine. *Electrochimica Acta*, 55, 6228-6232.
36. International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC (2014). <https://doi.org/10.1351/goldbook.B00663> (Visitado el 23/04/2020)
37. Jiang, B.; Dong, P. y Zheng, J. (2018). A novel amperometric biosensor based on covalently attached multilayer assemblies of gold nanoparticles, diazo-resins and acetylcholinesterase for the detection of organophosphorus pesticides. *Talanta*, 183, 114-121.
38. Justino, C. I. L., Duarte, A.C. y Rocha-Santos, T.A.P. (2017) Recent progress in biosensors for environmental monitoring: a review. *Sensors*, 17, 2918.
39. Kumar, T. H. V. y Sundramoorthy, A. K. (2019). Electrochemical biosensor for methyl parathion based on single-walled carbon nanotube/glutaraldehyde crosslinked acetylcholinesterase-wrapped bovine serum albumin nanocomposites. *Analytica Chimica Acta*, 1074, 131-141.
40. Lagarde, F. y Jaffrezic-Renault, N. (2011). Cell-based electrochemical biosensors for water quality assessment. *Anal Bioanal Chem*, 400, 947–964.
41. Laothanachareon, T.; Champreda, V.; Sritongkham, P.; Somasundrum, M. y Surareungchai, W. (2008). Cross-linked enzyme crystals of organophosphate hydrolase for electrochemical detection of organophosphorus compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 3049-3055.
42. Le Goff, A.; Holzinger, M. y Cosnier, S. (2011). Enzymatic biosensors based on SWCNT-conducting polymer electrodes. *Analyst*, 136, 1279-1287.
43. Lee, J. H.; Park, J. Y.; Min, K.; Cha, H. J.; Choi, S. S. y yoo, Y. J. (2010). A novel organophosphorus hydrolase-based biosensor using mesoporous carbons and carbon black for the detection of organophosphate nerve agents. *Biosensors and Bioelectronics*, 25, 1566-1570.
44. Liu, S.; Zheng, Z. y Li, X. (2013). Advances in pesticides biosensors: current status, challenges, and future perspectives. *Anal Bioanal Chem*, 405, 63-90.
45. Liu, G.; Guo, W. y Song, D. (2014). A multianalyte electrochemical immunosensor based on patterned carbon nanotubes modified substrates for detection of pesticides. *Biosensors and Bioelectronics*, 52, 360-366.

46. Lucas Viñuela, E. (2001) Características generales de los plaguicidas. Principios para el establecimiento de los LMR de plaguicidas según la reunión conjunta FAO/OMS sobre residuos de plaguicidas (JMPR). Publicado online: http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/comagric/codex/pdf/plagui.pdf (Visitado el 11 de enero 2020).
47. Madianos, L.; Tsekenis, G.; Skotadis, E.; Patsiouras, L. y Tsoukalas, D. (2018). A highly sensitive impedimetric aptasensor for the selective detection of acetamiprid and atrazine based on microwires formed by platinum nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 101, 268-274.
48. Mai, N.; Liu, X.; Wei, W.; Luo, S. y Liu, W. (2011). Electrochemical determination of paraquat using a DNA-modified carbon ionic liquid electrode. *Microchimica Acta*, 174, 89-95.
49. Moreno-Guzman, M. Biosensores electroquímicos para la detección de hormonas y sustancias dopantes. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, noviembre de 2012.
50. Mogha, N. K.; Sahu, V.; Sharma, M.; Sharma, R. K. y Masram, D. T. (2016). Biocompatible ZrO₂- reduced graphene oxide immobilized AChE biosensor for chlorpyrifos detection. *Materials and Design*, 111, 312-320.
51. Muckoya, V. A.; Nomngongo, P. N. y Ngila, J. C. (2020). Determination of organophosphorus pesticides in wastewater samples using vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-mass spectrometry. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 17, 2325-2336.
52. Musameh, M. M.; Hickey, M. y Kyratzis, I. L. (2011). Critical evaluation of electrode design and matrix effects on monitoring organophosphate pesticides using composite carbon nanotube-modified electrodes. *Research on Chemical Intermediates*, 37, 705-717.
53. Obiols-Quinto, J. (1999). NTP 512: Plaguicidas organofosforados (I): aspectos generales y toxicocinética. *Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo*. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. Gobierno de España.
54. Ortega, A.; Russo, B.; Acero, A.; Lorén, J. y Ruiz, O. Tecnologías de Biosensores en la medida de la calidad de agua. *IV Jornadas de Ingeniería del Agua*. Córdoba, octubre de 2015.
55. Pérez-Fernández, B.; Costa-García, A. y Muñiz, A. (2020). Electrochemical (Bio)Sensors for Pesticides Detection Using Screen-Printed Electrodes. *Biosensors*, 10, 32.

56. Pérez-Fernández, B.; Mercader, J. V.; Abad-Fuentes, A.; Checa-Orrego, B. I.; Costa-García, A. y Escosura-Muñiz, A. (2020). Direct competitive immunosensor for Imidacloprid pesticide detection on gold nanoparticle-modified electrodes. *Talanta*, 209, 120465.
57. Pundir, C. H. y Chauhan N. (2012). Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticides determination: A review. *Analytical Biochemistry*, 429, 19-31.
58. Rodrigues, N.F. M.; Yotsumoto-Neto, S., Silva-Luz, R., Santos-Damos, F. y Yamanaka, H. (2018). Ultrasensitive Determination of Malathion Using Acetylcholinesterase Immobilized on Chitosan-Functionalized Magnetic Iron Nanoparticles. *Biosensors*, 8, 16.
59. Sharma, A.; Kumar, V.; Shahzad, B.; Tanveer, M.; Sidhu, G. P. S.; Handa, N.; Kohli, S. K.; Yadav, P.; Bali, A. S.; Pariha, R. D.; Dar, O. I.; Singh, K.; Jasrotia, S.; Bakshi, P.; Ramakrishnan, M.; Kumar, S.; Bhardwaj, R. y Thukral, A. K. (2019). Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, 1,1446.
60. Silva, P.; Manganiello, L.; Mendoza, N. y Vega, C. (2013). Método rápido para la determinación de fenol y pentaclorofenol en agua potable mediante HPLC con detección UV Rapid method for the determination of phenol and pentachlorophenol in drinking water by HPLC with UV detection. *Revista Ingeniería UC*, 20 (3), 79-86.
61. Sinha, R.; Ganesana, M.; Andreescu, S. y Stanciu, L. (2010). AChE biosensor based on zinc oxide sol-gel for the detection of pesticides. *Analytica Chimica Acta*, 661, 195-199.
62. Song, Y.; Chen, J.; Sun, M.; Gong, C.; Shen, Y.; Song, Y. y Wang, L. (2016). A simple electrochemical biosensor based on AuNPs/MPS/Au electrode sensing layer for monitoring carbamate pesticides in real samples. *Journal of Hazardous Materials*, 304, 103-109.
63. Taghdisi, S. M.; Danesh, N. M.; Ramezani, M. y Abnous, K. (2017). Electrochemical aptamer based assay for the neonicotinoid insecticide acetamiprid based on the use of an unmodified gold electrode. *Microchimica Acta*, 184, 499-505.
64. Talarico, D.; Arduini, F.; Amine, A.; Cacciotti, I.; Moscone, D. y Palleschi, G. (2016). Screen-printed electrode modified with carbon black and chitosan: a novel platform for acetylcholinesterase biosensor development. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408, 7299-7309.
65. Tankiewicz, M., Fenik, J. y Biziuk, M. (2010). Determination of organophosphorus and organonitrogen pesticides in water samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 29 (9), 1050-1063.

66. Thakkar, J. B.; Gupta, S. y Prabha, C. R. (2019). Acetylcholine esterase enzyme doped multiwalled carbon nanotubes for the detection of organophosphorus pesticide using cyclic voltammetry. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137, 895-903.
67. Tortolini, C.; Bollella, P.; Antiochia, R.; Favero, G. y Mazzei, F. (2016). Inhibition-based biosensor for atrazine detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 224, 552-558.
68. Trojanowicz, M. y Hitchman, M. L. (2002). Determination of pesticides using electrochemical enzymatic biosensors. *Trends in analytical chemistry*, 15 (1), 38-41.
69. Turan, J.; Kesika, M.; Soylemeza, S.; Gokera, S.; Coskun, S.; Unalance, H. E. y Toppareabde, L. (2016). An effective surface design based on a conjugated polymer and silver nanowires for the detection of paraoxon in tap water and milk. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 228, 278-286.
70. Uniyal, S. y Sharma, R. K. (2018). Technological advancement in electrochemical biosensor based detection of Organophosphate pesticide chlorpyrifos in the environment: A review of status and prospects. *Biosensors and Bioelectronics*, 116, 37-50.
71. UTZ (2015). Lista de plaguicidas prohibidos y lista de plaguicidas en vigilancia, Publicado online: https://utz.org/?attachment_id=5810 (Visitado el 15/03/2020).
72. Vaghela, C.; Kulkarni, M.; Haram, S.; Aiyer, R. y Karve, M. (2018). A novel inhibition based biosensor using urease nanoconjugate entrapped biocomposite membrane for potentiometric glyphosate detection. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 32-40.
73. Verma, N. y Bhardwaj, A. (2015). Biosensor technology for pesticides - A review. *Appl Biochem Biotechnol*, 175, 3093-3119.
74. Vicentini, F. C.; Garcia, L. L.C.; Figueiredo-Filho, L. C.S.; Janegitz, B. C. y Fatibello-Filho, O. (2016). A biosensor based on gold nanoparticles, dihexadecylphosphate, and tyrosinase for the determination of catechol in natural water. *Enzyme and Microbial Technology*, 84, 17-23.
75. Wei, M. y Feng, S. (2017). Amperometric determination of organophosphate pesticides using a acetylcholinesterase based biosensor made from nitrogen-doped porous carbon deposited on a boron-doped diamond electrode. *Microchimica Acta*, 184, 3461-3468.
76. Wei, M.; Zeng, G. y Lu, Q. (2014). Determination of organophosphate pesticides using an acetylcholinesterase-based biosensor based on a boron-doped diamond electrode modified with gold nanoparticles and carbon spheres. *Microchimica Acta*, 181, 121-127.

77. Xiang, H.; Cai, Q.; Li, Y.; Zhang, Z.; Cao, L.; Li, K. y Yang, H. (2020). Sensors Applied for the Detection of Pesticides and Heavy Metals in Freshwaters, *Journal of Sensors*, 1-22.
78. Zhang, P., Sun, T., Rong, S., Zeng, D., Yu, H., Zhang, Z., Chang, D., Pan, H. (2019). A sensitive amperometric AChE-biosensor for organophosphate pesticides detection based on conjugate polymer and Ag-rGO-NH₂ nanocomposite. *Bioelectrochemistry*, 127, 163-170.